

**Untersuchungen an Populationen von *Gibbaeum nuciforme*
(Haw.) Glen & H.E.K. Hartmann (Aizoaceae)
und zur Phylogenie der Gattung *Gibbaeum* N.B. Br.**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
vorgelegt von
Gisela Bertram
aus Hamburg

Hamburg, Mai 2007
Drucklegung März 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. N. JÜRGENS
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. J. ROHWER
Tag der Disputation: 13. Juli 2007

Hamburg, den 28. Juni 2007



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Dank

Mein Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. N. Jürgens für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit Labor und molekulare Methoden zu etablieren.

An U. Schmiedel geht mein Dank für die Ideen und vielen Hinweise zu meinem Thema sowie für die gemeinsame Tour durch die Kleine Karoo in Südafrika, ohne ihre Kenntnis von Orten, Pflanzen und Menschen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Verschiedenen Landbesitzern in der Kleinen Karoo (Südafrika) danke ich für ihre Erlaubnis auf ihrem Land Pflanzen zu untersuchen und zu sammeln. Dem Western Cape Nature Conservation Board sei für die Genehmigung zum Sammeln und zur Ausfuhr von Pflanzenmaterial gedankt. Für einen Reisekostenzuschuss danke ich der Deutschen Kakteen Gesellschaft e.V.

Der gesamten Arbeitsgruppe Systematik und Vegetationsökologie am Biozentrum Klein Flottbek möchte ich für ihre großartige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken. Danke für Pipettieren, Plattenputzen, Primerbestellen, Pakete annehmen, PCR-Rausnehmen, Fehler-Beratungen, Organisieren, Diskutieren, Reparieren, schnell Antworten, Korrekturlesen, noch mal Lesen, Teekochen und so weiter - ich hoffe Ihr wisst, dass Ihr alle gemeint seid.

Zudem möchte ich mich bei A. Schierholt fürs Korrektur-Lesen bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Manfred Haacks bedanken: Danke für Deine umfassende Unterstützung und die nie versiegende Teeversorgung!

Mein abschließender Dank geht an meine Familie, Freunde und Kollegen, die hartnäckig genug waren, immer wieder nachzufragen, wann ich endlich meine Arbeit abgebe - hier ist sie.

Hamburg im Mai 2007

Gisela Bertram

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Gibbaeum</i>	1
1.2	Die Art <i>Gibbaeum nuciforme</i>	4
1.3	Untersuchungsgebiet Kleine Karoo.....	6
1.4	Quarzflächen.....	7
1.4.1	Vegetation und Ökologie von Quarzflächen im südlichen Afrika	7
1.4.2	Alter der Quarzflächen.....	8
1.5	Fragestellung.....	8
1.5.1	Populationsuntersuchungen bei <i>Gibbaeum nuciforme</i> , landscape genetics.....	9
1.5.1.1	Fragestellungen für die Untersuchung an Populationen.....	9
1.5.2	Phylogenie der Gattung <i>Gibbaeum</i>	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Blattmaterial	11
2.1.1	Die Gattung <i>Gibbaeum</i>	11
2.1.2	Blattmaterial aus Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	12
2.2	Bodenuntersuchungen.....	13
2.3	Vegetation.....	14
2.4	Habitataufnahme	14
2.5	Populationsgröße	14
2.6	Messungen an den Blattpaaren	15
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	15
2.7.1	DNA-Isolierung.....	16
2.7.1.1	Vorversuch zur Lagerung von gesammeltem Blattmaterial auf Reisen	16
2.7.2	DNA-Isolierung.....	16
2.7.3	„bulk“ DNA.....	17
2.7.4	Chloroplasten PCR - Restriktionsanalyse	18
2.7.5	Random Amplified Polymorphic DNA Analysen, RAPD Analysen.....	20
2.7.6	Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP-Analysen.....	21
2.7.7	Inter Simple Sequence Repeats, ISSR-Analysen.....	24
2.7.8	Consensus Chloroplast Simple Sequence Repeat-Analysen (ccSSR).....	25
2.7.9	ITS Sequenzen	26
2.8	Auswertungsmethoden	28
2.8.1	Normalverteilung und Gruppenunterschiede	28
2.8.2	Gruppierungen	28
2.8.2.1	Cluster-Analysen.....	28
2.8.2.2	Diskriminanzanalysen	29
2.8.3	Varianzanalyse.....	29
2.8.4	Genetische Diversität	29
2.8.5	Distanzberechnungen.....	30

2.8.6	AMOVA.....	30
2.8.7	Mantel-Test.....	30
2.8.8	Sequenzen.....	31
2.8.9	Phylogenetische Auswertung.....	31
3	Ergebnisse	31
3.1	Bodenanalysen in den Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	31
3.2	Vegetation in den Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	32
3.3	Habitataufnahme für Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	33
3.4	Populationsgröße der Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	34
3.5	Messungen an Pflanzen und Blattpaaren von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	37
3.5.1	Anzahl Früchte.....	37
3.5.2	Höhe der Blätter über dem Boden	39
3.5.3	Blattform	40
3.5.4	Transparenter Bereich in Blattspitze	41
3.5.5	Behaarung der Blätter	41
3.6	Überprüfung von Ost-West-Gruppierung anhand der Merkmale der Individuen	44
3.6.1	Zusammenfassung für die Überprüfung der Ost- und der West-Gruppe mit Feld-Merkmalen 46	
3.7	Blühende Pflanzen von <i>Gibbaeum nuciforme</i> im Gewächshaus	47
3.8	Molekulare Untersuchungen	48
3.8.1	Ergebnisse der Vorversuche zur Lagerung von Blattmaterial zur DNA- Gewinnung..	48
3.8.2	Ergebnisse der molekularen Populationsuntersuchungen	49
3.8.2.1	Ergebnisse der Chloroplasten PCR Restriktion,.....	49
3.8.2.2	Ergebnisse der AFLP Populationsuntersuchungen	51
3.8.2.3	Testen der Zuordnung von Individuen an drei Populationen	51
3.8.2.4	Abgrenzung von Individuen und Populationen mit AFLPs.....	54
3.8.2.5	Untersuchung der Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i> mit AFLPs	56
3.8.2.6	Populations-Untersuchungen mit AFLPs und „bulked“ DNA.....	64
3.8.2.7	Genetische Struktur	67
3.8.2.8	Mantel Test.....	69
3.8.2.9	ISSRs	70
3.8.2.10	ccSSRs.....	70
3.8.3	Ergebnisse der Untersuchungen der Gattung <i>Gibbaeum</i>	71
3.8.3.1	ITS.....	71
3.8.3.2	Anwendung und Reproduzierbarkeit der AFLPs für die Gattung <i>Gibbaeum</i>	73
3.8.3.3	AFLPs für die Erstellung der Gattungsphylogenie - <i>Gibbaeum</i>	74
3.8.3.4	ccSSR als Marker für die Gattungsphylogenie von <i>Gibbaeum</i>	76
3.8.3.5	RAPDs.....	78
3.8.3.6	ISSR.....	79
4	Diskussion.....	81

4.1	Populationsuntersuchungen an <i>Gibbaeum nuciforme</i>	81
4.1.1	Populationskonzepte	81
4.1.2	Abgleich der Habitatparameter	81
4.1.2.1	Bodenanalysen in Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	82
4.1.2.2	Pflanzensoziologische Einordnung der Vegetation in den Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i> und Analyse der Vegetationsaufnahmen.....	82
4.1.2.3	Gesteinsbedeckung des Bodens und Hangneigung.....	84
4.1.3	Abschätzung der Populationsgrößen	85
4.1.4	Korrelation von Dichte der Individuen und Quarzbedeckung	85
4.1.5	Gruppierung der Individuen und Populationen anhand von Feld-Merkmalen	86
4.1.5.1	Anzahl der Früchte.....	86
4.1.5.2	Behaarung der Blätter - <i>Gibbaeum pilosulum</i>	87
4.1.5.3	Blatthöhe über dem Boden.....	88
4.1.5.4	Transparente Bereiche der Blattspitze.....	89
4.1.5.5	Weitere Merkmale.....	92
4.1.6	Einsatz von AFLPs zur Untersuchung von Populationen.....	92
4.1.7	Marker im Chloroplastengenom.....	92
4.1.8	Molekulare Varianz der Populationen	93
4.1.8.1	Fragmentation der Habitate und Verlust von Standorten.....	94
4.1.9	Diskontinuität zwischen Populationen	96
4.1.9.1	Klimaveränderungen im Gebiet des südlichen Afrikas	96
4.1.9.2	Diskontinuitäten zwischen den Populationen im Verbreitungsgebiet	97
4.1.9.3	Welche Ursachen kann die Diskontinuität der Populationen im Verbreitungsgebiet haben?	98
4.1.9.4	Potenzielle Refugien von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	102
4.1.9.5	Quellen für Besiedlung der Quarzflächen	105
4.1.10	Naturschutzaspekte.....	105
4.1.10.1	Schutz von Evolutionsprozessen und genetischer Diversität.....	105
4.1.10.2	Sanbona Wildlife Reserve.....	107
4.1.10.3	Die Sukkulente Karoo als Hotspot der Biodiversität	108
4.1.11	Zusammenfassende Beantwortung der Fragen zu den Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	108
4.2	Untersuchungen zur Phylogenie der Gattung <i>Gibbaeum</i>	110
4.2.1	ITS Sequenzen	111
4.2.1.1	ITS-Phylogenie	111
4.2.1.2	ITS-Sequenzen für Gattungs-Phylogenien.....	111
4.2.2	AFLP-Untersuchungen zur Gattungs-Phylogenie.....	113
4.2.3	ccSSR.....	115
4.2.4	ISSR	115
4.2.5	Kombination der verschiedenen molekularen Marker.....	116

4.2.6	Zusammenfassende Beantwortung der Fragen zur Untersuchung der Phylogenie der Gattung <i>Gibbaeum</i>	116
4.3	Methodendiskussion.....	116
4.3.1	Kontamination als mögliche Fehlerquelle.....	116
4.3.2	Einsatz von „bulked“ DNA.....	117
5	Ausblick.....	119
5.1	Populationsuntersuchungen.....	119
5.1.1	Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	119
5.1.2	Untersuchung weiterer Taxa.....	119
5.1.3	Weitere Marker für die Erstellung einer Gattungsphylogenie.....	119
6	Zusammenfassung.....	120
7	Abstract.....	122
8	Literatur.....	124
9	Anhang.....	132
9.1	Daten aus den Populationsuntersuchungen an <i>Gibbaeum nuciforme</i>	132
9.2	Daten und Ergebnisse der Untersuchungen an der Gattung <i>Gibbaeum</i>	146

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1: Übersicht über die Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i>	2
Tabelle 2-1: Material der Gattung <i>Gibbaeum</i>	11
Tabelle 2-2: Material von Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	13
Tabelle 2-3: Übersicht aufgenommenen Merkmale am Blattpaar von <i>G. nuciforme</i>	15
Tabelle 2-4: Übersicht der eingesetzten universellen Chloroplastenprimer,.....	18
Tabelle 2-5: Sequenzen der IFG RAPD-Primer.....	20
Tabelle 2-6: Sequenzen von Adaptern und Primern für AFLPs nach Vos et al. (1995)....	24
Tabelle 2-7: Namen und Sequenz der verwendeten ISSR Primer	24
Tabelle 2-8: Sequenzen der verwendeten ccSSR-Primer nach Chung & Staub (2003)...	26
Tabelle 2-9: Eingesetzte Primer für ITS-Sequenzierung nach White et al. (1990)	27
Tabelle 3-1: Ergebnisse der Untersuchung der Bodenmischproben der Populationen	32
Tabelle 3-2: Vorkommen von Arten in den Populationsflächen	32
Tabelle 3-3: Bodenbedeckung mit Gestein sowie Hangneigung.....	34
Tabelle 3-4: Dichte der Pflanzen von <i>G. nuciforme</i> ,	34
Tabelle 3-5: Länge und Breite der Populationsflächen von <i>Gibbaeum nuciforme</i>	35
Tabelle 3-6: Ergebnisse der statistischen Auswertung für verschiedene skalierte Merkmale in den Populationen von <i>G. nuciforme</i>	37
Tabelle 3-7: Ergebnisse der statistischen Auswertung für skalierte Merkmale der Populationen von <i>G. nuciforme</i> nach West- und Ost-Gruppe unterteilt.....	44
Tabelle 3-8: Anzahl der Blüten pro Individuum von <i>G. nuciforme</i> im Gewächshaus d	47
Tabelle 3-9: Lagerungsweise und Ergebnisse der DNA Isolierung aus Vorversuchen zur Lagerung von Blattmaterial.....	48
Tabelle 3-10: Erfolgreich eingesetzte Primerkombinationen für Chloroplasten PCR.....	50
Tabelle 3-11: Übersicht über die Ergebnisse der PCR Amplifikation	50
Tabelle 3-12: Ergebnisse der Restriktion von Chloroplasten PCR-Produkten mit verschiedenen Restriktionsenzymen	51
Tabelle 3-13: Selektive Basen der eingesetzten selektiven AFLP-Primer (Vos et al., 1995) für die Populationsuntersuchungen.....	51
Tabelle 3-14: Primerkombinationen und ausgewertete Banden für die drei Populationen	52
Tabelle 3-15: AFLP Ergebnisse für 3-Populationen-Voruntersuchung.....	52
Tabelle 3-16: Eingesetzte AFLP Primerkombinationen für drei Teilläufe A, B und C.	57
Tabelle 3-17 Genetische Diversität: AFLP-Ergebnisse für Kombinierte Matrix.....	60
Tabelle 3-18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Clusteranalysen.....	63
Tabelle 3-19: Ergebnisse der AMOVA, basierend auf den AFLP-Daten des kombinierten Datensatzes von A, B und C für je sieben Individuen pro Population	64
Tabelle 3-20: Übersicht über die eingesetzten selektiven Primerkombinationen.....	64
Tabelle 3-21: Genetische Diversität: Ergebnisse für je 2 „bulked“ DNA von 15 Populationen,	65
Tabelle 3-22: Genetische Struktur der Populationen untereinander (Lynch & Milligan, 1994) für Teildatensatz A.....	68
Tabelle 3-23: Genetische Struktur der Populationen untereinander (nach Lynch & Milligan, 1994) für den kombinierten AFLP-Datensatz	68

Tabelle 3-24: Genetische Struktur der Populationen untereinander berechnet auf Grundlage von AFLP-Daten der „bulked“ DNA für alle Populationen, West-Gruppe und Ost-Gruppe	68
Tabelle 3-25: Ergebnisse des Mantel Tests.....	70
Tabelle 3-26: AFLP Primerkombinationen für Gattung <i>Gibbaeum</i>	75
Tabelle 9-1: Angaben zur Matrix-Vegetation, Quarzbedeckung in der Population, Individuendichte und Populationsgröße der Populationen von <i>G. nuciforme</i>	132
Tabelle 9-2: Feld-Daten und Messungen an den einzelnen Individuen von <i>G. nuciforme</i>	133
Tabelle 9-3: Matrix der AFLP Daten für Populationsuntersuchungen, Teildatensatz A..	139
Tabelle 9-4: Matrix der AFLP Daten für Populationsuntersuchungen, Teildatensatz B..	140
Tabelle 9-5: Matrix der AFLP Daten für Populationsuntersuchungen, Teildatensatz C..	141
Tabelle 9-6: Kombinierte AFLP-Datenmatrix aus den Teildatensätzen A, B, und C für drei Primerkombinationen.....	142
Tabelle 9-7: AFLP-Datenmatrix für die Populationsuntersuchungen mit “bulked“ DNA..	145
Tabelle 9-8: AFLP-Matrix für die untersuchten Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i>	152
Tabelle 9-9: Ergebnistabelle der ccSSR Untersuchungen für die Gattung <i>Gibbaeum</i>	157
Tabelle 9-10: Auswertungstabelle Primer ISSR 5 und 4 für die Gattung <i>Gibbaeum</i>	158

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: <i>Gibbaeum nuciforme</i> mit mehreren Blattpaaren	5
Abbildung 1-2: Lage der Kleinen Karoo in Südafrika	6
Abbildung 1-3: Quarzfläche in der Kleinen Karoo.....	8
Abbildung 2-1: Lage der Populationen von <i>Gibbaeum nuciforme</i> in der Kleinen Karoo ...	13
Abbildung 3-1: Cluster-Analyse für die Probeflächen der Populationen G3 bis G15.....	33
Abbildung 3-2: Mittlere paarweise genetische Distanz je Population mit Individuen/m ² ...	35
Abbildung 3-3: Mittlere paarweise genetische Distanz je Population	35
Abbildung 3-4: Mittlere paarweise genetische Distanz je Population mit Flächenbezug...	36
Abbildung 3-5: Säulendiagramm, Summe der Früchte pro 10 Individuen einer Population	38
Abbildung 3-6: Fruchtende Pflanzen pro Populationen	39
Abbildung 3-7: Box and Whisker Plot der Blatthöhen	40
Abbildung 3-8: Säulendiagramm Blattspitzen der Blätter rund oder abgeflacht	40
Abbildung 3-9: Auftreten von transparentem Bereich in der Blattspitzen	41
Abbildung 3-10: Behaarung der Blätter nach Populationen getrennt	42
Abbildung 3-11: PCA der Messergebnisse an Individuen von <i>G. nuciforme</i>	43
Abbildung 3-12: Blatthöhen über dem Boden, nach Ost und West Gruppe	45
Abbildung 3-13: Tiefe des Spaltes im Blattpaar, nach Ost- und West.....	45
Abbildung 3-14: Verhältnis von jungen und alten Früchten in Ost und West-Gruppe	45
Abbildung 3-15: Säulendiagramm zur Behaarung in den Gruppen West und Ost.....	46
Abbildung 3-16: Säulendiagramm zu transparenten Blattspitzen in den Gruppen	46
Abbildung 3-17: DNA aus unterschiedlich gelagertem Blattmaterial, Agarose Gel	49
Abbildung 3-18: PCO zweite Auswertung drei Primerkombinationen	53
Abbildung 3-19: Dendrogramm basierend auf AFLP Daten für Population G5, G6 und G10 von <i>G. nuciforme</i>	54
Abbildung 3-20: Dendrogramm aus AFLP Daten von je zwei Individuen pro Population,	55
Abbildung 3-21: PCO, je zwei Individuen aus 15 Populationen	56
Abbildung 3-22: Dendrogramm der AFLP-Daten für den Teildatensatz A.....	58
Abbildung 3-23: PCO für den kombinierten AFLP Datensatz, Population	61
Abbildung 3-24: PCO für den kombinierten AFLP Datensatz nach Ost und West	61
Abbildung 3-25: Dendrogramm basierend AFLP Daten des kombinierten Datensatzes für 15 Populationen von <i>G. nuciforme</i>	62
Abbildung 3-26: Dendrogramm der Cluster-Analyse der AFLP Ergebnisse aus 7 Primerkombinationen für je zwei „bulked“ DNAs je Population.....	66
Abbildung 3-27: PCO Darstellung der AFLP Ergebnisse aus 7 Primerkombinationen für je zwei „bulkes“ je Population, aufgeteilt nach Ost und West	67
Abbildung 3-28: Consensus tree basierend auf den ITS-Daten für die Gattung <i>Gibbaeum</i>	72
Abbildung 3-29: Dendrogramm für Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i> mit AFLP Daten aus zwei Primerkombinationen	74
Abbildung 3-30: Consensus aus zwei Dendrogramm mit AFLP Daten für <i>Gibbaeum</i>	76
Abbildung 3-31: Agarosegel der PCR mit der Primerkombination ccSSR9 für verschiedene Taxa der Gattung <i>Gibbaeum</i>	77
Abbildung 3-32: UPGMA-Cluster basierend auf ccSSR Daten für die Gattung <i>Gibbaeum</i>	78

Abbildung 3-33: Agarosegel-Ausschnitt mit PCR-Produkten von Primer ISSR 5 für Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i>	79
Abbildung 3-34: Dendrogramm auf Basis der Ergebnisse der ISSR-Primer 4 und 5 für Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i>	80
Abbildung 4-1: PCO der AFLP Daten für die drei Teildatensätze A, B und kombiniert.....	88
Abbildung 4-2: Kleine Karoo mit Kreisdiagrammen für transparente Bereiche in den Blattspitzen bei <i>G. nuciforme</i>	91
Abbildung 4-3: Höhenmodell der Kleinen Karoo	97
Abbildung 9-1: Chloroplasten PCRs	137
Abbildung 9-2: Geschnittene Chloroplasten PCR-Produkte	138
Abbildung 9-3: ITS Sequenz-Alingment.....	151

Im Text häufig verwendete Abkürzungen:

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
ANOVA	Analysis of Variance
bp	Basenpaare
CAM	Crassulaceen Acid Metabolism
ccSSR	Consensus Chloroplast Simple Sequence Repeats
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiotreitol
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
G.	<i>Gibbaeum</i>
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
ITS	Internal Transcribed Spacers
kb	Kilobasenpaare
PCA	Principal Component Analysis
PCO	Principle Coordinate Analysis
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Analysis

1 Einleitung

Im südlichen Afrika gibt es eine große pflanzliche Artenvielfalt, die Bereiche der Kapflora und der Sukkulenten Karoo werden von Myers et al. (2000) als zwei von 25 weltweiten Biodiversitäts-Hotspots identifiziert. Auch Linder (2003) stellt die Artenvielfalt dieser Region heraus. In den Trockengebieten des südlichen Afrikas haben die Vertreter der Familie der Mittagsblumengewächse (Aizoaceae) einen großen Anteil an dieser Vielfalt (Jürgens, 1986). In einigen Bereichen, wie der Knersvlakte, stellen sie über 50 % der dort vorkommenden Pflanzenarten (Schmiedel, 2002, Klak et al., 2004). Die Aizoaceae haben eine schnelle und junge Radiation durchlaufen, so dass diese Pflanzenfamilie derzeit 127 Gattungen und etwa 1.750 Arten umfasst (Klak et al., 2004). Die Anzahl der Arten pro Gattung variiert von monotypischen Gattungen bis hin zu Gattungen wie *Ruschia* mit etwa 400 Arten (Klak, 2000). Die Familie ist im südlichen Afrika beheimatet. Einige Arten haben, zum Teil unter Mithilfe des Menschen, andere Kontinente besiedelt, so z. B. *Carpobrotus edulis* (Neuseeland, Kalifornien) (Gallagher et al., 1997) und *Mesembryanthemum crystallinum* (Mittelmeerraum, Australien, Kalifornien) (Vivrette & Muller, 1977, Bittrich, 1986). Viele Arten sind jedoch in ihrer Verbreitung auf ein relativ kleines Gebiet im südlichen Afrika beschränkt. So gibt es innerhalb der Aizoaceae viele Endemiten auf Artebene wie z. B. *Conophytum*-Arten (Hartmann, 2001) und auch auf Gattungsebene, wie z. B. die Gattungen *Argyroderma* und *Oophytum* in der Knersvlakte und die Gattung *Gibbaeum* im Bereich der Kleinen Karoo (Schmiedel, 2002, Ellis et al., 2006).

Neben der Vielfalt der Pflanzen gibt es im südlichen Afrika auch eine Vielfalt spezieller Lebensbedingungen für Organismen. Es herrschen u. a. aride oder semiaride Klimabedingungen. Unterschiedliche Niederschlagsregime von reinem Winterregen über Übergangsbereiche mit Niederschlägen zu unterschiedlichen Jahreszeiten zu reinem Sommerregen prägen das Gebiet. Kleinflächige Mosaik aus unterschiedlichen Bodenbeschaffenheiten und Oberflächen wie u. a. Quarzflächen sowie Habitatnischen in unterschiedlichen Höhenlagen prägen die Habitatvielfalt (Ihlenfeldt, 1994).

1.1 Die Gattung *Gibbaeum*

Die Gattung *Gibbaeum* wird in die Unterfamilie Ruschioideae der Familie der Aizoaceae (Mittagsblumengewächse) eingeordnet. Die Unterfamilie umfasst etwa 1.563 Arten (Klak et al., 2004). Nach Klak et al. (2004) begann die Radiation der Ruschioideae in einem Zeitraum vor 3,8 - 8,7 Millionen Jahren, demnach fand bei den Ruschioideae, eine extrem schnelle und vielfältige Artbildung statt. Diese schnelle und starke Radiation der Ruschioideae ist ein wichtiger Hinweis auf adaptive Radiation (Ellis & Weis, 2006). Neben den Ruschioideae umfasst die Familie der Aizoaceae die Unterfamilien Sesuvioideae, Aizooideae und Mesembryanthemoideae (Klak et al., 2003b, Thiede, 2004). Die Familienumschreibung von Bittrich & Hartmann (1988) enthält noch eine fünfte Unterfamilie, die Tetragonioideae; diese wird von den vorgenannten Autoren aufgrund der Ergebnisse molekularphylogenetischer Untersuchungen nicht mehr zu den Aizoaceae gestellt.

Nach Klak (2000) umfasst die Gattung *Gibbaeum* 17 Arten, wobei hier die monotypische Gattung *Muiria* als *Gibbaeum hortenseae* mit einbezogen wurde. Die nachfolgend genannten Autoren haben *Muiria* nicht in die Gattung *Gibbaeum* einbezogen (Tabelle 1-1). Nach Hartmann (2001) umfasst die Gattung *Gibbaeum* 27 gültig beschriebene Arten. Glen (1974) führt in seiner unveröffentlichten Masterarbeit 15 Arten auf, wobei eine Art (*G. pubescens*) in zwei Unterarten (ssp. *pubescens* und ssp. *shandii*) untergliedert wird. Zudem weist Glen (1974) 10 von Hartmann (2001) angeführte Arten als Synonyme aus. Klak (2000) folgt in der Florenliste weitgehend den Vorschlägen von Glen (1974).

Tabelle 1-1: Übersicht über die Arten der Gattung *Gibbaeum* nach Klak (2000), Hartmann (2001) und Glen (1974) sowie Angaben zur Anzahl der Chromosomen. ? = keine Angaben, Grau hinterlegte Namen sind Arten der obligaten Quarzflächenflora (Schmiedel 2002), Fett geschriebene Arten standen für die Untersuchungen zur Verfügung, * *G. pilosulum* wurde von Schmiedel (2002) aufgrund von mündlicher Mitteilung von J. Thiede in *G. cryptopodium* (= *G. nuciforme*) gestellt und nicht getrennt untersucht

Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i> nach Klak (2000)	Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i> nach Hartmann (2001)	Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i> nach Glen (1974)	Anzahl der Chromosomen, aus Hartmann (2001)
<i>G. album</i> N.E.Br.	<i>G. album</i> N.E.Br.	<i>G. album</i> N.E.Br.	2n=18
<i>G. angulipes</i> (L.Bolus) N.E.Br.	<i>G. angulipes</i> (L.Bolus) N.E.Br.	<i>G. angulipes</i> (L.Bolus) N.E.Br.	2n=18, nach Glen (1974) 2n=18,36
<i>G. cryptopodium</i> (Kensit) L.Bolus	<i>G. nuciforme</i> (Haw.) Glen & H.E.K. Hartmann	<i>G. nuciforme</i> (Haw.) Glen	2n=18
<i>G. dispar</i> N.E.Br.	<i>G. dispar</i> N.E.Br.	<i>G. dispar</i> N.E.Br.	2n=18
<i>G. esterhuyseniae</i> L. Bolus	<i>G. esterhuyseniae</i> L. Bolus	<i>G. esterhuyseniae</i> L. Bolus	?
<i>G. geminum</i> N.E.Br.	<i>G. geminum</i> N.E.Br.	<i>G. geminum</i> N.E.Br.	2n=36,54
<i>G. gibbosum</i> (Haw.) N.E.Br	<i>G. gibbosum</i> (Haw.) N.E.Br	<i>G. gibbosum</i> (Lettsom ex Haw.) N.E.Br	2n=18
<i>G. haagei</i> Schwantes	<i>G. haaglennii</i> H.E.K.Hartmann	<i>G. austricolum</i> Glen	?
<i>G. heathii</i> (N.E.Br.) L.Bolus)	<i>G. heathii</i> (N.E.Br.) L.Bolus)	<i>G. heathii</i> (N.E.Br.) L.Bolus)	2n=18
<i>G. hortenseae</i> (N.E.Br.) Thiede & Klak	<i>Muiria hortenseae</i> N.E.Br.	<i>Muiria hortenseae</i> N.E.Br.	2n=18
<i>G. nebrownii</i> Tischer (inklusive <i>G. johnstonii</i> Van Jaarsv. & S.A. Hammer)	<i>G. nebrownii</i> Tischer	<i>G. nebrownii</i> Tisch.	2n=18
<i>G. pachypodium</i> (Kensit) L.Bolus	<i>G. pachypodium</i> (Kensit) L.Bolus	<i>G. pachypodium</i> (Kensit) L.Bolus	2n=18, 36
<i>G. petrense</i> (N.E.Br.) Tischer	<i>G. petrense</i> (N.E.Br.) Tischer	<i>G. petrense</i> (N.E.Br.) Tisch.	2n=18, 36
* <i>G. pilosulum</i> (N.E.Br.) N.E.Br.	* <i>G. pilosulum</i> (N.E.Br.) N.E.Br.	* <i>G. pilosulum</i> (N.E.Br.) N.E.Br.	2n=18
<i>G. pubescens</i> (Haw.) N.E.Br	<i>G. pubescens</i> (Haw.) N.E.Br	<i>G. pubescens</i> (Lettsom ex Haw.) N.E.Br. ssp. <i>pubescens</i>	2n=18

Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i> nach Klak (2000)	Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i> nach Hartmann (2001)	Arten der Gattung <i>Gibbaeum</i> nach Glen (1974)	Anzahl der Chromosomen, aus Hartmann (2001)
<i>G. shandii</i> N.E.Br.	<i>G. shandii</i> N.E.Br.	<i>G. pubescens</i> (Lettsom ex Haw.) N.E.Br. ssp. <i>shandii</i> (N.E.Br.) Glen	2n=36
<i>G. velutinum</i> (L.Bolus) Schwantes	<i>G. velutinum</i> (L.Bolus) Schwantes	<i>G. velutinum</i> (L.Bolus) Schwantes	2n=36
	<i>G. blackburniae</i> L.Bolus	syn. <i>G. heathii</i>	2n=18
	<i>G. comptonii</i> (L.Bolus) L. Bolus	syn. <i>G. heathii</i>	2n=18
	<i>G. helmiae</i> L.Bolus	syn. <i>G. pilosulum</i>	2n=18
<i>G. nebrownii</i> umfasst <i>G. johnstonii</i>	<i>G. johnstonii</i> van Jaarsveld & S.A. Hammer		?
	<i>G. luckhoffii</i> L.Bolus	syn. <i>G. heathii</i>	2n=18
	<i>G. luteoviride</i> (Haw.) N.E.Br.	syn. <i>G. gibbosum</i>	2n=18
	<i>G. marlothii</i> N.E.Br.	syn. <i>G. gibbosum</i>	?
	<i>G. molle</i> N.E.Br.	syn. <i>G. pilosulum</i>	2n=18
	<i>G. muirii</i> N.E.Br.	syn. <i>G. gibbosum</i>	?
	<i>G. perviride</i> (Haw.) N.E.Br.	syn. <i>G. pilosulum</i>	2n=18
	<i>G. schwantesii</i> Tischer	syn. <i>G. velutinum</i>	2n=36

Die Wuchsformen innerhalb der Gattung *Gibbaeum* reichen von kleinen Sträuchern bis hin zu Pflanzen, deren Blätter in den Boden eingesenkt sind, und die als Nano-Chamaephyten bezeichnet werden. Alle Arten der Gattung weisen hochsukkulente Blätter auf, viele Arten weisen Anisophyllie auf. Die Blüten sind weiß bis pinkfarben. Die Früchte sind sechsfährige Kapseln, die von Hartmann (1988) dem Drosanthemum-Typ zugeordnet wurden. Dieser Fruchttyp wird als ein eher ursprünglich einzuordnender Typ beschrieben, da abgeleitete Merkmale, wie u. a. Verschlusskörper, fehlen (Hartmann, 1988).

Die Gattung *Gibbaeum* hat ihren Verbreitungsschwerpunkt in der Kleinen Karoo in der Republik Südafrika. In den nördlich und südlich an die Kleine Karoo angrenzenden Gebieten sind Vertreter der Gattung noch selten zu finden. Im Süden ist das Verbreitungsgebiet durch die Langeberge begrenzt. Von *Gibbaeum gibbosum* sind einige Standorte südlich der Langeberge (Glen, 1974) und nördlich der Swartberge (Schmiedel, 2002) bekannt. Von *G. haageii* (= *G. haaglennii* bzw. *austricolum*) (Glen, 1974) und *G. esterhuyseniae* ist nur ein Standort bekannt, dieser befindet sich südlich der Langeberge (Schmiedel, 2002). Die nördliche Verbreitungsgrenze der Gattung verläuft etwa in der Höhe von Laingsburg. Hier bilden Höhenzüge wie die Swartberge und Witberge mit ihrer Ost-West Erstreckung eine geografische Barriere. Im Osten und Westen grenzen an das Gebiet höher gelegene Bereiche an, so dass es sich bei dem Verbreitungsgebiet der Gattung *Gibbaeum* um ein Becken mit einigen flacheren Bergzügen handelt.

Die Kleine Karoo, und somit das Hauptverbreitungsgebiet der Gattung *Gibbaeum*, liegt im Übergang zwischen Sommer- und Winterregengebiet. Der Jahresniederschlag liegt zwischen 125 und 250 mm, die Hauptniederschlagsmonate sind März und November (Schmiedel, 2002, Weather-Bureau, 1988), (Hartmann, 2006). Die geringe Niederschlagsmenge erklärt sich dadurch, dass die meisten Wolken ihre Feuchtigkeit durch Steigungsregen an den Bergflanken, die die Kleine Karoo umgeben, abregnen.

Die Gattung *Gibbaeum* ist für die Quarzflächenflora der Kleinen Karoo bedeutend, da sie in den meisten Pflanzengesellschaften der Quarzflächen die dominanten als auch die diagnostischen Arten stellt (Schmiedel, 2002), (Schmiedel & Mucina, 2006). Neun der 17 von Klak (2000) aufgeführten Arten sind Bestandteil der obligaten Quarzflächenflora (Schmiedel, 2002) (Tabelle 1-1). Nicht alle Arten der Gattung kommen jedoch ausschließlich auf Quarzflächen vor, auch andere Standorte mit zum Teil speziellen edaphischen Bedingungen werden durch das Taxon besiedelt. Schmiedel (2002) nimmt an, dass die Gattung *Gibbaeum* auf den Quarzflächen der Kleinen Karoo eine adaptive Radiation durchlaufen hat.

Schmiedel konnte in ihren Arbeiten (Schmiedel, 2002), (Schmiedel & Jürgens, 2002), (Schmiedel & Jürgens, 2004), (Schmiedel & Mucina, 2006) zeigen, dass die Arten der Gattung *Gibbaeum* verschiedene ökologische Ansprüche aufweisen. So bilden Steingehalt des Bodens, Quarzbedeckung der Oberfläche, Bodentiefe, Bodenreaktion (pH-Wert), Leitfähigkeit und Hangneigung Parameter, die einen Einfluss auf das Auftreten der verschiedenen Arten der Gattung *Gibbaeum* haben. Auch lässt sich ableiten, dass gleiche oder ähnliche Wuchsformen auch ähnliche Umweltbedingungen bevorzugen (Schmiedel & Jürgens, 2002). Ob diese Wuchsformen einmal oder mehrfach in Anpassung an ähnliche bzw. gleiche Umweltbedingungen entstanden sind, ist eine zentrale Frage. Schmiedel (2004) beschreibt neun Arten der Gattung *Gibbaeum* (inklusive *Muiria hortenseae*) als Bestandteile der obligaten Quarzflächenflora der Kleinen Karoo. Die phylogenetische Untersuchung der Gattung kann Aufschluss darüber geben, ob die Besiedlung der Quarzflächen ein einmaliges Ereignis war, an welches sich dann die Radiation auf den Flächen anschloss, oder ob die Besiedlung der Flächen mehrfach unabhängig voneinander in dieser Gattung auftrat.

1.2 Die Art *Gibbaeum nuciforme*

Die Art *Gibbaeum nuciforme* ist in der Kleinen Karoo auf Quarzflächen endemisch und ist Bestandteil der obligaten Quarzflächenflora des Gebietes (Schmiedel, 2002). Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich in etwa zwischen den Orten Laingsburg im Norden und Barrydale im Süden und von Montagu im Westen bis in den Bereich von Calitzdorp im Osten. Das Gebiet stellt eine Ebene dar, die teilweise von kleineren Höhenzügen strukturiert ist.

Die Pflanzen von *G. nuciforme* sind teilweise in den Boden eingesenkt. In der Gattung tritt dies nach Hartmann (2006) noch bei zwei weiteren Arten auf, *G. nebrownii* und *G. johnstonii*, die von Klak (2000) als synonym angesehen werden. Häufig ragen bei *G. nuciforme* nur noch die obersten Bereiche der Blattpaare über die Bodenoberfläche hinaus. Von dieser Tatsache wurde vermutlich das ehemalige Artepithet „cryptopodium“ abgeleitet. Es stammt aus dem

Griechischen und setzt sich aus den Worten Kryptos = verborgen und pous = Fuß zusammen, bedeutet also etwa: „Verborgener Fuß“. Das aktuell gültige Epithet „nuciforme“ ist aus dem Lateinischen abgeleitet: Nux = Nuss, nuciforme = nussförmig. Es bezieht sich auf die Blattpaare, die in der Form nussähnlich aussehen. Die Art *Gibbaeum nuciforme* (Haw.) Glen & H.E.K.Hartmann (2001) hieß vor der Veröffentlichung der Neukombination des Namens durch Glen & Hartmann (Hartmann, 2001) *Gibbaeum cryptopodium* (Kensit) L.Bolus (1933). Glen hatte diese Neukombination schon 1974 in seiner Masterarbeit zur Revision der Gattung *Gibbaeum* vorgeschlagen, diese jedoch nicht gültig veröffentlicht (Glen, 1974).

Da Brown (Glen, 1974) die Arten *Mesembryanthemum nuciforme* Haw. (1795) und *Mesembryanthemum cryptopodium* Kensit als identisch erkannte und Bolus 1933 *Mesembryanthemum cryptopodium* Kensit in die Gattung *Gibbaeum* überführte (*Gibbaeum cryptopodium* (Kensit) L.Bol), ergibt sich aufgrund des älteren Artepithets *nuciforme* durch Haworth von 1795, die Neukombination des Namens, wie sie durch Glen & Hartmann (Hartmann, 2001) veröffentlicht wurde.

Die Blätter von *G. nuciforme* sind hochsukkulent und weisen meist eine hellgrüne bis gelblich-grüne Farbe auf. Die Blattpaare sind anisophyll, sie weisen ein längeres und ein kürzeres Blatt auf. Jedes Blattpaar bildet einen rundlichen Körper, an dem im oberen Bereich ein kleiner Spalt (meist kürzer als ein Zentimeter) noch daran erinnert, dass es sich hier um zwei Blätter eines Blattpaares handelt. Eine Pflanze von *G. nuciforme* kann aus mehr als 200 Blattpaaren bestehen. In der Blütezeit im Juli (Glen, 1975) erscheint jeweils eine pinkfarbene Blüte in dem kleinen Spalt zwischen den Blättern eines Blattpaares.



Abbildung 1-1: Ein Individuum von *Gibbaeum nuciforme* mit mehreren Blattpaaren. Deutlich ist der Spalt zwischen den Blättern eines Blattpaares zu erkennen. Die Pflanze ist von Quarzsteinchen umgeben.

1.3 Untersuchungsgebiet Kleine Karoo

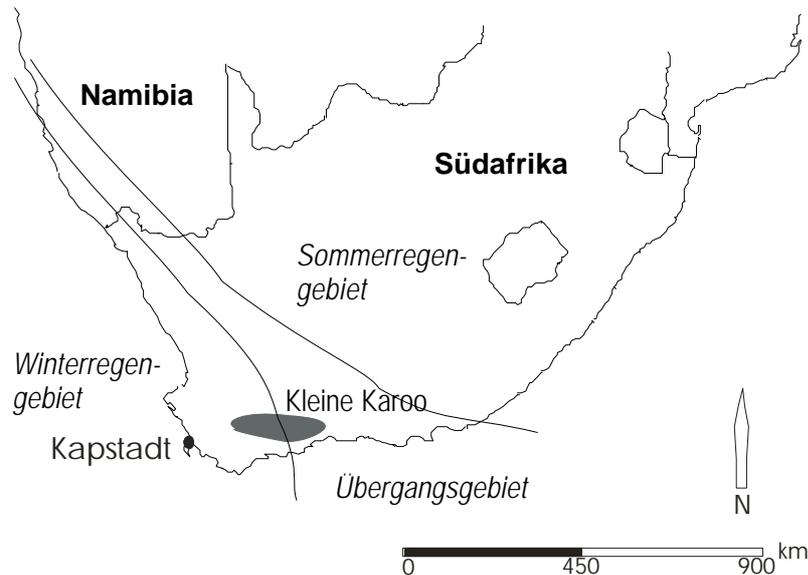


Abbildung 1-2: Lage der Kleinen Karoo in Südafrika, zudem sind die Grenzen der unterschiedlichen Niederschlagsregime eingezeichnet, Karte nach Schmiedel (2002) verändert

Die Kleine Karoo liegt in der Republik Südafrika und hier in der Western Cape Province ($33^{\circ}25' - 55'S$ und $20^{\circ}10' - 22^{\circ}30'O$). Sie besteht aus einer Abfolge von Tälern und kleineren Höhenzügen. Umgeben ist das Gebiet von den sich in Ost-West-Richtung erstreckenden Antiklinen des ‚Cape Folded Belt‘. Zum größten Teil gehört die Kleine Karoo zur Southern Karoo Domain der Sukkulente Karoo Region (Jürgens, 1991, Van Wyk & Smith, 2001). Goldblatt & Manning (2000) ordnen das Gebiet der Kleinen Karoo der Cape Floristic Region zu. Der jährliche Niederschlag in der westlichen Kleinen Karoo beträgt in etwa 200 mm (Weather-Bureau, 1988) und fällt zwischen März und Oktober. Im östlichen Teil der Kleinen Karoo kann ein Teil des Niederschlags zudem als Sommerregen im November fallen. Daher wird der Bereich auch als Übergangsbereich zwischen Sukkulente- und Nama- Karoo bezeichnet (Cowling & Hilton-Taylor, 1999). Durch Bergzüge in Ost-Weststreckung werden Teile der Winterniederschläge und auch der Sommerniederschläge vom Gebiet abgehalten (Desmet & Cowling, 1999). In Teilen der Kleinen Karoo, hauptsächlich in dem Dreieck zwischen Barrydale, Ladismith und Van Wyksdorp, verwittern Quarzadern, die in einigen Bereichen an die Oberfläche treten. Die Oberfläche ist dann von kantigem Quarzgrus bedeckt und bildet markante Quarzflächen. Die zonale Vegetation der Kleinen Karoo setzt sich aus sehr unterschiedlichen Typen zusammen. So treten in den Berglagen Fynbos- und Renosterveld-Vegetation auf, in flacheren Lagen und am Talboden überwiegt die Vegetation der Sukkulente Karoo.

1.4 Quarzflächen

1.4.1 Vegetation und Ökologie von Quarzflächen im südlichen Afrika

Quarzflächen werden von Schmiedel (2002) und Schmiedel & Jürgens (1999) als azonale Habitat-Inseln in einer Matrix aus zonalen Habitaten beschrieben. Die Azonalität der Flächen wird durch Faktoren wie geringe Bodentiefe, hohe Salinität, alkalische pH-Werte und hohe Quarzbedeckung bedingt, die sie von den umgebenden Habitaten unterscheiden. Quarzflächen beherbergen eine spezielle Flora, die ein bestimmtes Wuchstypenspektrum umfasst: häufig sind die perennierenden Pflanzen klein, niedrigwüchsig und sukkulent. (Schmiedel, 2002), (Schmiedel & Jürgens, 1999). Bei den kompakten und abgerundeten sukkulenten Pflanzenkörpern ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen den ariden Bedingungen optimal angepasst (Ihlenfeldt, 1978).

Pflanzenarten, die die charakteristischen Elemente der Quarzflächenflora (QFF) bilden, können in den angrenzenden Habitaten häufig kaum wachsen, da sie dort von konkurrenzstärkeren Arten verdrängt werden (Kruckeberg & Rabinowitz, 1985, Ware, 1990). Auf den Quarzflächen im südlichen Afrika kommen etwa 800 Pflanzenarten vor, von denen ca. 150 Taxa Endemiten der Quarzflächen darstellen. Jeder Bereich im südlichen Afrika, in dem Quarzflächen vorkommen, beherbergt eine eigenständige Flora der Quarzflächen (Schmiedel, 2002). Viele Arten aus den verschiedenen Quarzflächenbereichen weisen ähnliche Wuchsformen auf. Da die Taxa vermutlich nicht unmittelbar verwandt sind, wird hier die konvergente Evolution der Wuchsformen angenommen (Jürgens, 1986), (Schmiedel & Jürgens, 1999). Auf den Quarzflächen der Kleinen Karoo sind 9 Arten endemisch (Schmiedel, 2002). In den Arbeiten von Schmiedel (2002), (2004) und Schmiedel & Jürgens (1999), (2004) sind die heutigen Erkenntnisse über Quarzflächen und deren Vegetation im südlichen Afrika umfassend dargestellt.



Abbildung 1-3: Quarzfläche in der Kleinen Karoo; im Vordergrund sind zwischen den Quarzsteinen niedrige Pflanzen von *Gibbaeum nuciforme* erkennbar. Bei der strauchartigen Pflanze handelt es sich um *Pteronia pallens*.

1.4.2 Alter der Quarzflächen

Schmiedel (2002) diskutiert in ihrer Arbeit über die Quarzflächen des südlichen Afrikas das mögliche Alter dieser Flächen. Danach können sich Quarzflächen im Holozän entwickelt haben oder während des letzten Interglazials. Eine wichtige Vorbedingung für die Entstehung der Flächen sind weitestgehend vegetationsfreie Bereiche. Die rezenten klimatischen Bedingungen im westlichen Bereich des südlichen Afrikas ermöglichen die heutige Entstehung von Quarzflächen. Wären die Flächen älteren Ursprungs, dann müssten ähnliche Bedingungen schon in der Vergangenheit aufgetreten sein. Aufgrund von Rekonstruktionen des Paläo-Klimas (Midgley et al., 2001) können die Quarzflächen sowohl älteren als auch rezenten Ursprungs sein (Schmiedel, 2002). Wenn die Annahmen von Midgley et al. (2001) zutreffen, dann ist zumindest die heutige *Verbreitung* der Quarzflächen**flora** rezenten Ursprungs.

1.5 Fragestellung

Das Auftreten von Arten der Gattung *Gibbaeum* auf Quarzflächen ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zum einen werden anhand von Populationsuntersuchungen an *G. nuciforme* Muster in der Verbreitung gesucht sowie der Effekt der inselartigen Verteilung der Quarzflächen in der Kleinen Karoo auf die Individuen der verschiedenen Populationen untersucht. Zum anderen wird die Gattung *Gibbaeum* betrachtet und versucht, die Etablierung von Arten auf Quarzflächen in der Phylogenie der Gattung abzubilden.

1.5.1 Populationsuntersuchungen bei *Gibbaeum nuciforme*, landscape genetics

Da *G. nuciforme* nur auf speziellen Habitatinseln, eben den oben genannten Quarzflächen, auftritt, könnten sich bestimmte Ausprägungen und Genotypen als Muster möglicherweise eher etabliert und erhalten haben, als bei Arten, die weiter verbreitet auftreten.

Der Begriff „landscape genetics“ wurde von Manel et al. (2003) geprägt und von Biogeografie und Phylogeografie abgegrenzt. „Landscape genetics“ untersucht, ob und wie geografische und Umwelteinflüsse die genetische Variation strukturieren. Dies geschieht auf der Populationsebene als auch auf der Ebene der Individuen. Es können kryptische (verborgene) Grenzen und Muster innerhalb von Arten entdeckt werden, die auf Unterbrechungen im Genfluß ohne offensichtlichen Grund oder auf Kontaktzonen von vorher isolierten Populationen hindeuten. Es können Populationssubstrukturen auf verschiedenen geografischen Ebenen aufgelöst werden und entscheidend zum Verständnis von mikroevolutionären Prozessen beitragen. „Landscape genetics“ hat sich aus der Interpretation von beobachteten räumlichen Mustern entwickelt. Häufige Muster waren: Entwicklungen entlang von Gradienten, Isolierung über Distanzen oder genetische Grenzen (Diskontinuitäten) für den Genfluß. Die Idee, räumliche genetische Muster auf der Ebene von Individuen zu erheben, geht zurück auf Wright (1943) und sein Konzept von Nachbarschaften in einer kontinuierlich verbreiteten Population.

1.5.1.1 Fragestellungen für die Untersuchung der Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Können im Feld Merkmale an den Individuen erhoben werden, die eine Zuordnung zu Populationen zulässt oder diese zumindest wahrscheinlich macht?

Lässt sich die Verteilung der Merkmale vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus den molekularen Untersuchungen interpretieren?

Kann mit molekularen Markern die Hypothese unterstützt werden, dass es sich bei den Individuen von *G. nuciforme*, die eine Quarzfläche besiedeln, um die Individuen jeweils einer Population handelt? Können die Individuen von *G. nuciforme* demnach über molekulare Merkmale den Herkunftspopulationen zugeordnet werden?

Sind AFLPs ein angemessenes Markersystem für die Untersuchungen der Populationen?

Sind geografisch benachbarte Populationen auch genetisch benachbart? Sind genetische Distanzen und geografische Distanzen miteinander korreliert?

Sind Muster in den Daten erkennbar und lassen sich die Muster räumlich abbilden? Sind solche Muster durch Hintergrundinformationen wie Vegetationszusammensetzung oder Klimageschichte interpretierbar?

- Lassen sich aus den Antworten auf die vorangestellten Fragen Schlussfolgerungen ableiten, inwieweit das Vorkommen der Art auf den speziellen azonalen Quarzflächen einen Einfluss auf die Populationsstruktur der Art hat?
- Können aus den Ergebnissen der Populationsuntersuchungen Hinweise für den Schutz der Art und allgemeine Hinweise für den Naturschutz abgeleitet werden?

1.5.2 Phylogenie der Gattung *Gibbaeum*

- Sind die eingesetzten molekularen Marker wie ITS-Sequenzen oder AFLPs angemessene Markersysteme, um eine Phylogenie der Gattung *Gibbaeum* zu erstellen?
- Lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungen aussagen, ob sich die verschiedenen Arten der Gattung *Gibbaeum* unabhängig voneinander auf Quarzflächen etabliert haben und inwieweit sich Wuchsformtypen mehrfach entwickelt haben?

2 Material und Methoden

2.1 Blattmaterial

2.1.1 Die Gattung *Gibbaeum*

Das Blattmaterial für Untersuchungen der Gattung *Gibbaeum* stammt von Pflanzen aus der Sammlung im Botanischen Garten Hamburg. Es handelt sich durchgehend um Material, welches von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Systematik der Universität Hamburg am Standort in Südafrika gesammelt wurde (vorwiegend von U. Schmiedel & J. Thiede). Die in Tabelle 2-1 aufgeführten Sammelnummern beziehen sich auf die Datenbank der Arbeitsgruppe Jürgens (Universität Hamburg). Hier sind Sammeljahr und genauer Fundort vermerkt, die angegebenen Labornummern beziehen sich auf fortlaufend nummerierte DNA-Isolierungen.

Arten aus den Gattungen *Corpuscularia*, *Delosperma*, *Lithops* und *Jacobsenia* wurden als Außengruppen in die Untersuchungen mit einbezogen. Diese Taxa gehören nach Klak et al. (2003b) wie die Gattung *Gibbaeum* in die Unterfamilie der Ruschioideae und hier in die so genannten „core-Ruschioideae“.

Tabelle 2-1: Material der Gattung *Gibbaeum* und Außengruppen, Sammelnummer, Labornummern (mehrere Labornummern beziehen sich auf verschiedene DNA-Isolierungen). Übersicht welche Arten bei verschiedenen Markeruntersuchungen (ITS, AFLP, ISSR, ccSSR) eingesetzt wurden: x= untersucht, o= nicht untersucht, alle Pflanzen stammen aus der Lebendsammlung des Botanischen Garten Hamburg

Art	Sammelnummer	Labornummern	ITS	AFLP	ISSR	ccSSR
<i>Gibbaeum album</i>	110138	25	x	x	x	x
<i>Gibbaeum album</i>	109877	108	o	o	o	o
<i>Gibbaeum angulipes</i>	104725	104, 64, 46	x	o	x	x
<i>Gibbaeum angulipes</i>	110161	60	o	x	o	x
<i>Gibbaeum austricola</i>	109788	30, 103	x	o	x	x
<i>Gibbaeum austricola</i>	110200	39	o	o	x	x
<i>Gibbaeum nuciforme</i>	110130	2	o	x	o	o/x
<i>Gibbaeum nuciforme</i>	104754	14, 69	o	x	o	o
<i>Gibbaeum nuciforme</i>	110144	12	o	x	o	o
<i>Gibbaeum nuciforme</i>	122068	11'-10	x	o	x	o
<i>Gibbaeum dispar</i>	109850	32, 83, 84	x	x	x	x
<i>Gibbaeum dispar</i>	109868	85	o	o	o	x
<i>Gibbaeum esterhuyseniae</i>	PvB/1	40, 65, 105	x	x	x	x
<i>Gibbaeum geminum</i>	110158	34, 71	o	x	x	x
<i>Gibbaeum geminum</i>	110151	35, 102	x	o	x	x
<i>Gibbaeum geminum</i>	109862	109	o	o	o	o
<i>Gibbaeum gibbosum</i>	110368	31, 100	x	o	x	x
<i>Gibbaeum gibbosum</i> (süd)	110191	27, 70	x	x	x	x

Art	Sammelnummer	Labornummern	ITS	AFLP	ISSR	ccSSR
<i>Gibbaeum gibbosum</i> (süd)	110192	28	o	o	x	x
<i>Gibbaeum gibbosum</i>	110185	67	o	x	o	x
<i>Gibbaeum heathii</i>	110174	1, 98	x	x	x	x
<i>Gibbaeum nebrownii</i>	110183	20	o	x	o	x
<i>Gibbaeum nebrownii</i>	102185	92	x	o	x	x
<i>Gibbaeum pachypodium</i>	109863	47, 58	o	x	x	x
<i>Gibbaeum pachypodium</i>	110159	43, 62, 100	x	x	x	x
<i>Gibbaeum petrense</i>	104991	36, 99	x	o	x	x
<i>Gibbaeum petrense</i>	110137	37, 73, 91	o	x	x	x
<i>Gibbaeum pubescens</i>	109887	45, 63, 88	x	o	x	x
<i>Gibbaeum pubescens</i>	110181	44	o	x	o	x
<i>Gibbaeum shandii</i>	110146	23	x	x	o	x
<i>Gibbaeum shandii</i>	110153	24	o	o	x	x
<i>Gibbaeum velutinum</i>	Barydale 1	42, 59	o	x	o	x
<i>Gibbaeum velutinum</i>	109804	89	x	o	x	x
<i>Gibbaeum hortenseae</i>	109878	52, 61	x	o	x	x
<i>Gibbaeum hortenseae</i>	104993	7A, Mh2	o	x	o	x
<i>Corpuscularia lehmannii</i>	33672	51	o	o	o	x
<i>Corpuscularia lehmannii</i>	33693	74	o	x	o	x
<i>Corpuscularia gracilis</i>	33825	48, 49	x	o	x	x
<i>Jacobsenia vaginata</i>	102417	54	o	x	o	x
<i>Lithops herrei</i> var. <i>geyeri</i>	102238	55	o	x	o	x
<i>Delosperma echinatum</i>	34106	75	o	x	o	o
<i>Delospermum echinatum</i>	Klak	57	o	x	o	o

2.1.2 Blattmaterial aus Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Das Material für die Populationsuntersuchungen an *G. nuciforme* wurde während eines Feldaufenthaltes im September und Oktober 2001 in Kooperation mit U. Schmiedel gesammelt. Die Sammlung des Materials wurde durch die Erlaubnis Nummer 43/2001 des Western Cape Nature Conservation Board und durch Genehmigungen der Landbesitzer ermöglicht. Es wurden Blattpaare gesammelt.

Für jede Population wurde eine Sammelnummer vergeben siehe Tabelle 2-2, die besammelten Individuen wurden für jede Population von eins bis zehn durchnummeriert. Für die Laborarbeiten wurde eine Labornummer vergeben, indem jede Population nummeriert und mit dem Buchstaben G präfixiert wurde. Nachgestellt wurden die Ziffern 1 bis 10 vergeben, um das jeweilige Individuum der Population zu kennzeichnen. Somit handelt es sich bei Probe G3-5 um das fünfte Individuum aus der Population mit der Labornummer 3.

Tabelle 2-2: Material von Populationen von *G. nuciforme* mit Sammelnummer, Labornummer, Breiten- und Längengrad sowie Lokalität des Sammelortes

Sammelnummer	Labornummer	Breite Süd	Länge Ost	Lokalität
122058	G1	33°27'27,6"	20°34'59,1"	Anysberg Damm
122059	G2	33°27'27,8"	20°35'01,2"	Anysberg Damm
122060	G3	33°28'03,8"	20°42'18,2"	Goodehoop (bei Anysberg)
122061	G4	33°21'54,4"	20°44'16,5"	Spreeufontein
122062	G5	33°15'11,6"	20°50'10,5"	östlich Varsbokkral
122063	G6	33°49'48,9"	21°05'18,9"	südlich Miertjieskraal
122064	G7	33°37'01,1"	21°09'42,5"	Ockertskraal/Waaisand
122065	G8	33°49'39,5"	20°51'25,2"	Warmwaterberg/Lucerne
122066	G9	33°35'55,6"	21°08'13,1"	Tigerkop
122067	G10	33°37'09,6"	21°43'09,6"	südlich Calitzdorp
122068	G11	33°41'15,3"	20°43'04,3"	Middelpass
122069	G12	33°39'47,5"	20°33'35,9"	Eierpoort
122070	G13	33°35'23,8"	20°39'15,9"	Karreevlakte
122071	G14	33°33'42,0"	20°17'23,1"	Melkboskoope/Kruisrivier
122072	G15	33°39'48,7"	20°33'19,4"	Eierpoort

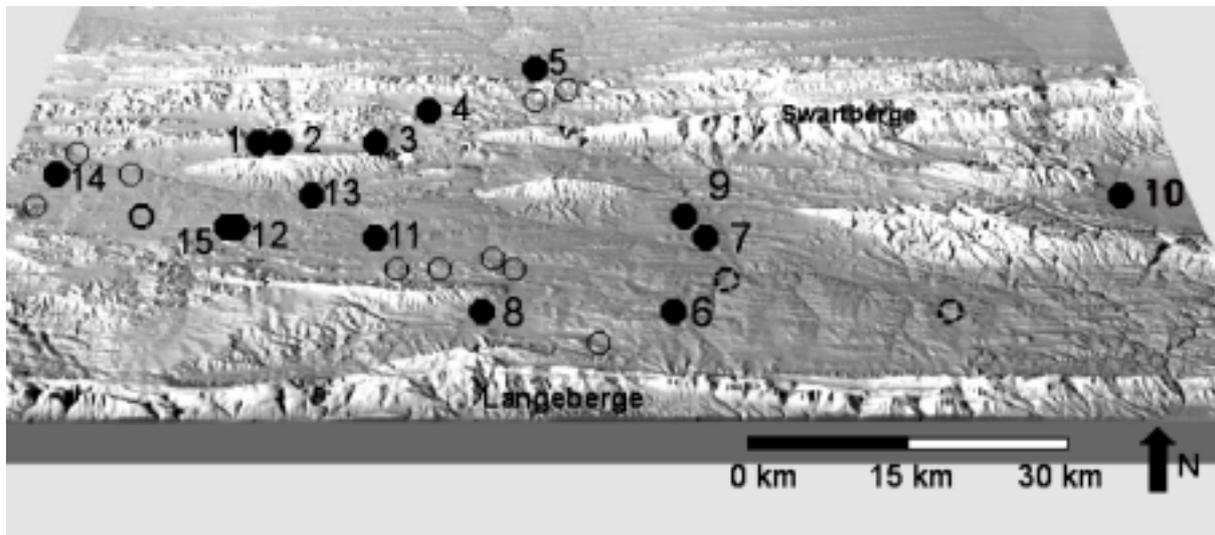


Abbildung 2-1: Lage der Populationen von *Gibbaeum nuciforme* in der Kleinen Karoo, Populationen mit gefülltem schwarzem Kreis und Ziffer wurden für die Untersuchung beprobt, ungefüllte Kreise mit unterbrochener Linie bezeichnen Populationen die aufgesucht - jedoch nicht aufgefunden wurden, ungefüllte Kreise mit durchgehender Linie bezeichnen Populationen, deren Standorte aus mündlicher Überlieferung oder Literaturdaten stammen, deren Standorte jedoch nicht aufgesucht wurden

2.2 Bodenuntersuchungen

Für jede besammelte Population von *G. nuciforme* wurde eine Mischprobe des Bodens entnommen. Dazu wurde neben jeder beprobten Pflanze eine definierte Menge an Oberboden (0 - 5 cm) entnommen. Alle Proben einer Population wurden zu einer Sammelprobe vereinigt.

Für die Populationen G1, G2 und G3 liegen keine Bodenproben vor, da anfangs eine zu geringe Menge Boden gesammelt wurde, um diese untersuchen zu können. Jede Bodenprobe einer Population wurde im Gelände gut durchgemischt und die anschließenden Untersuchungen im Labor der Universität Hamburg durchgeführt.

Die Bodenart wurde mittels Fingerprobe nach der Bodenkartieranleitung (AG-Boden, 1994) ermittelt. Die Methodik der Bodenanalyse entspricht derjenigen, die Schmiedel (2002) in ihrer Arbeit zu den Quarzflächen in Südafrika angewandt hat, um den Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen. Die Messung des pH-Wertes erfolgte in einer 1: 2,5 Suspension der luftgetrockneten Bodenprobe in 0,01 M CaCl₂ Lösung. Hier wurden 4 g der Bodenprobe mit 10 ml CaCl₂-Lösung versetzt, gerührt und für eine Stunde inkubiert. Das pH-Meter (TetraCon®325, WTW) wurde nach den Gerätevorschriften geeicht und der pH-Wert mit einer Genauigkeit von einer Nachkommastelle abgelesen.

Die Leitfähigkeit wurde in einer 1 : 5 Suspension der luftgetrockneten Bodenprobe in H₂O gemessen. Es wurden 3 g Bodenprobe mit 15 ml Wasser versetzt und für 30 min inkubiert. Die Leitfähigkeit wurde mit dem Gerät LF537 (WTW) im mS / cm gemessen.

Der Carbonat-Gehalt des Bodens wurde semi-quantitativ mit dem HCl-Test ermittelt. Dabei wurde der Bodenprobe 10%ige HCl zugeben und die Freisetzung von CO₂ optisch und akustisch quantifiziert und in eine Skala von 0 bis 6 eingeordnet (AG-Boden, 1994).

2.3 Vegetation

Die Begleitvegetation auf den Quarzflächen wurde erfasst, in dem eine Liste der vorkommenden Arten erstellt wurde. Ebenso wurden die Arten der umgebenden Vegetation, außerhalb der Quarzfläche, im näheren Umkreis notiert. Die Ansprache der Arten im Gelände wurde durch U. Schmiedel unterstützt.

2.4 Habitataufnahme

Die Quarzbedeckung der Oberfläche am Standort von *G. nuciforme* wurde in Prozent geschätzt, zusätzlich wurde die Bedeckung der Bodenoberfläche mit Sandsteinschotter in Prozent abgeschätzt. Die Neigung der Fläche, auf der die jeweilige Population von *G. nuciforme* wuchs, wurde mit einem Neigungsmesser (SUUNTO) gemessen.

2.5 Populationsgröße

Auf fünf zufällig ausgewählten Flächen von jeweils einem Quadratmeter innerhalb der Population wurde die Dichte der Individuen von *G. nuciforme* ermittelt. Die Zufälligkeit der Flächen wurde durch das Rückwärtsworfen eines Gegenstandes innerhalb der Population erreicht, dieser Gegenstand diente als Mittelpunkt des Quadratmeters.

Die Gesamtzahl der Individuen wurde in absoluten Zahlen geschätzt und in drei Klassen (Klasse 1 = 200 Individuen, Klasse 2 201 - 500 Individuen, Klasse 3 > 501 Individuen) eingeordnet. Maximale Länge und Breite der Ausdehnung der Population wurden in Metern gemessen.

2.6 Messungen an den Blattpaaren

Die Auswahl der beprobten Individuen erfolgte je nach Größe der Population in unterschiedlichen Abständen: Sieben Individuen wurden entlang eines Transektes in regelmäßigen Abständen auf der Längsachse der Population gewählt. Die übrigen drei Individuen wurden nach subjektiven Kriterien (auffällig, da besonders groß, klein oder dick) aufgenommen. An diesen zehn Individuen einer Population wurden Messungen durchgeführt. Dafür wurde ein Blattpaar ausgewählt, das sich am äußeren Rand des Individuums befand, damit die Pflanzen so wenig wie möglich beschädigt wurden. Dieses Blattpaar wurde anschließend für die DNA-Extraktion entnommen.

Für jedes Individuum wurden der Durchmesser, die Anzahl der Blattpaare, die Anzahl der frischen (diesjährigen) Kapseln und die Anzahl der alten, mindestens letztjährigen, Fruchtkapseln ermittelt. Die Blattpaare von *G. nuciforme* sind asymmetrisch, daher wurden beide Blätter eines Blattpaares bei den Messungen berücksichtigt. Für das ausgewählte Blattpaar einer Pflanze wurden die in Tabelle 2-3 aufgeführten Parameter aufgenommen.

Tabelle 2-3: Übersicht aufgenommener Merkmale am Blattpaar von *G. nuciforme*

Höhe vom Boden bis zur Spitze in mm
Breite des Blattpaares in Aufsicht in mm
Länge des langen Blattes in mm (Spalt bis Spitze)
Länge kurzes Blatt in mm (Spalt bis Spitze)
Länge des Spaltes in mm
Tiefe des Spaltes in mm
Blätter oberseits rund oder abgeflacht
Durchscheinende Stellen auf dem Blatt vorhanden ja / nein
Behaarung der Blätter: vorhanden / kahl

Das Merkmal „Durchscheinende Bereiche auf dem Blatt vorhanden ja/ nein“ wurde in Aufsicht auf die Blätter erhoben.

2.7 Molekularbiologische Methoden

Alle hitzestabilen Geräte und Lösungen wurden für 20 Minuten bei 121 °C und 2×10^5 Pa zur Nukleaseninaktivierung autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden steril filtriert.

Das verwendete Wasser wurde mit der Wasseraufbereitungsanlage „Milli-RX 45 Water Purifikation System“ (Millipore Corporation Bedford, MA, USA) destilliert und anschließend autoklaviert. Die verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „pro analysis“. Die verwendeten unmarkierten Primer wurden von den Firmen MWG Biotech AG (Ebersberg) und Sigma-ARK (Steinheim) synthetisiert, die Cy5-markierten Primer wurden von der Firma Sigma-ARK (Steinheim) synthetisiert. Die Lösungen für TE- und TBE-Puffer wurden nach Sambrook & Russell (2001) hergestellt.

Die Methoden werden im Folgenden gemeinsam für die Gattungsuntersuchungen der Gattung *Gibbaeum* und die Populationsuntersuchungen an *G. nuciforme* beschrieben, unterschiedliche Anwendungen werden im Text erwähnt.

2.7.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde für die Untersuchungen zur Gattung *Gibbaeum* mit frischem Blattmaterial aus dem Gewächshaus und für die Populationsuntersuchungen an *G. nuciforme* mit gelagertem und dann tiefgefrorenem (-20 °C) Blattmaterial durchgeführt. Die sukkulenten Blattpaare von *G. nuciforme* wurden im September und Oktober 2001 in der Kleinen Karoo in Südafrika gesammelt. Die Blattpaare wurden möglichst unverletzt gesammelt und vor Ort in Papiertüten bis zu drei Wochen bei Umgebungstemperatur gelagert. Zur weiteren Lagerung im Institut wurden die Blätter einzeln verpackt und bis zur Analyse bei -20 °C eingelagert.

2.7.1.1 Vorversuch zur Lagerung von gesammeltem Blattmaterial auf Reisen

Da in Südafrika in der Kleinen Karoo Blattmaterial für molekulare Untersuchungen gesammelt werden sollte, war es wichtig zu wissen, wie die gesammelten Blätter gelagert werden können, um später eine möglichst gute DNA Menge und Qualität zu erhalten. Da ein Tieffrieren vor Ort, direkt nach dem Sammeln, nicht möglich war, wurden praktikable „Feldlösungen“ vorab getestet. Da es sich um hochsukkulente Blätter handelt, kamen verschiedene Ansätze in Frage:

- vollständiger Erhalt der Blätter und die Nutzung des guten Verdunstungsschutzes der Blätter durch Lagerung in Plastik- oder Papiertüten
- schnelle Trocknung der Blätter mittels Silikagel Orange
- Überführung der Blätter in den Puffer RNAlater®, der laut Hersteller (SIGMA, München) auch DNasen hemmen soll.

Die Blattpaare jeweils eines Individuums von *Gibbaeum heathii*, *Gibbaeum pubescens*, *Gibbaeum shandii* und von *Cheridopsis robusta* wurden aus dem Gewächshaus entnommen und für vier Wochen bei Raumtemperatur von etwa 20 °C, gelagert. Die Blätter wurden unterschiedlich für die Lagerung vorbereitet:

- Blattpaar unverletzt in geschlossener Plastiktüte
- Blattpaar unverletzt in Papiertüte, zusätzlich ein Blattpaar in Scheiben geschnitten in Papiertüte
- Blattpaar unverletzt auf ca. 25 g Silica Gel Orange (ROTH, Karlsruhe) in geschlossener Plastiktüte, zusätzlich ein Blattpaar von Epidermis befreit
- Blattpaar von Epidermis befreit in RNAlater® (SIGMA, München) Puffer gelagert, Blattstücke nicht dicker als 0,5 cm, in mindestens 5 Volumen Puffer
- Zum Vergleich: Blattpaar direkt bei -20 °C eingelagert

Die Lagerung in den verschiedenen Tüten wurde regelmäßig überprüft, nach 2 Wochen wurden von den Blättern in der Plastiktüte Schimmel entfernt. Nach vier Wochen Lagerung wurde von dem Blattmaterial DNA isoliert.

2.7.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Dumolin et al. (1995), welches eine Modifikation der Methode von Doyle & Doyle (1990) darstellt. Die Methode beinhaltet das Aufschließen des Pflanzenmaterials durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff, Aufnehmen in

Puffer, Zentrifugieren und Fällern der DNA. Das Protokoll von Dumolin et al. (1995) wurde für das verwendete Pflanzenmaterial modifiziert. Ein Stück Blattmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu feinem Pulver vermahlen. Etwa 0,4 - 0,6 g des Pulvers wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, 1 ml des 65 °C warmen Puffers und 50 µl 1 M DTT wurden zugegeben und gemischt (Vortex). Die Suspension wurde für 10 min bei 65 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wurden 400 µl Dichlormethan zugegeben und durch Schütteln gemischt, bis sich eine weiße, milchige Suspension bildete. Bei 4 °C und 16.000 g, wurde 10 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß (1,5 ml Reaktionsgefäß) überführt. Zum Fällern der DNA wurde 2/3 Volumen eiskaltes Isopropanol zugegeben und gemischt. Erneut wurde bei 4 °C und 16.000 g für 10 min zentrifugiert. Zum Präzipitat wurde 76 %iger Ethanol gegeben und wiederum bei 4 °C und 16.000 g für 10 min zentrifugiert. Die Proben wurden so lange im Abzug oder im Vakuum getrocknet, bis kein Ethanol mehr vorhanden war. In 50 µl H₂O (inklusive RNase aus dem NucleoSpin Plant-Kit, Clontech) wurde die DNA über Nacht bei ca. 8 °C gelöst und dann für eine Stunde zum Verdau der RNA bei 37 °C inkubiert. Auf einem 0,8 %igem Agarosegel wurde die DNA (1 µl) kontrolliert. Im Photometer (BIOPhotometer, Eppendorf Hamburg) wurde der DNA Gehalt der Proben gemessen und daraufhin die DNA-Probe auf etwa 50 ng DNA/µl mit Wasser eingestellt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Überprüfung der DNA-Isolation erfolgte in einem 0,8 %igen Agarosegel, angesetzt in 0,5 x TBE. Verwendet wurden die Elektrophorese-Zellen Mini-Sub@Cell GT (BioRad Laboratories GmbH Karlsruhe). Als Laufpuffer diente ebenfalls 0,5 x TBE. Pro Tasche wurden jeweils 2 µl Probe zusammen mit 2 µl Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin) aufgetragen. Als Längenstandard wurden alternativ Smart Ladder (Eurogentec, Seraing) oder 1 kb-Ladder (Gene Craft, Münster) verwendet. Der Lauf erfolgte bei 35 V für ca. 1 h oder alternativ bei 70 V für 30 min. Anschließend wurde im Ethidiumbromidbad (0,003 mg/ml Ethidiumbromid in Wasser) ca. 10 Minuten gefärbt und im Wasserbad 10 Minuten entfärbt. Das Ergebnis wurde bei UV-Licht (UV-Transilluminator, UVP) begutachtet und per Digitalkamera (Olympus CAMEDIA C5050 Zoom) dokumentiert.

2.7.3 „bulked“ DNA

Für einen Teil der Untersuchungen an Populationen von *G. nuciforme* wurde die DNA der Individuen einer Population nach Michelmore et al. (1991) zu „bulked“ DNA zusammengefasst. Dieser Vorgang des Zusammenfassens der DNA wird auch als „poolen“ bezeichnet. Für die „bulked“ DNA von *G. nuciforme*-Populationen wurde jeweils die isolierte und quantifizierte DNA von fünf Individuen zu gleichen Teilen zusammengegeben, so dass pro Population zwei „bulked“ DNA (A und B) zur Verfügung standen. Diese „bulked“ DNA wurden anschließend, genau wie die DNA von Einzelindividuen, in die AFLP Untersuchung eingesetzt.

2.7.4 Chloroplasten PCR - Restriktionsanalyse

Dieser Ansatz ist angelehnt an die RFLP Methode (Restriction Fragment Length Polymorphism); die Detektion erfolgt hier über ein Agarosegel und nicht - wie bei den RFLPs - über Hybridisierung mittels markierter DNA-Sonden. Die Gesamt DNA wird in eine Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction PCR) eingesetzt. Als Primer werden universelle Chloroplasten-Primer eingesetzt (Tabelle 2-4), deren Sequenzen von verschiedenen Autoren veröffentlicht wurden. Einen guten Überblick über die Primer erlaubt die Zusammenstellung von Heinze (2001). Diese Primer inserieren in konservierten Bereichen des Chloroplastengenoms. Dies sind häufig Exons von Genen und sind daher für nahezu alle Gruppen grüner Landpflanzen einsetzbar. Da die Primer einer Primerkombination in den Exons verschiedener Gene inserieren, wird der zwischen den Genen befindliche Abschnitt amplifiziert.

Tabelle 2-4: Übersicht der eingesetzten universellen Chloroplastenprimer, mit folgenden Angaben: Benennung der Primerkombination , Namen der Primer, Sequenz in 5' - 3' Richtung, verwendete Annealingtemperatur in °C, erwartete Länge in Basenpaaren (bp) unter Angabe des untersuchten Taxons (soweit verfügbar), Autor

Primer-kombination	Primer	Sequenz 5'-3'	Annealing-temperatur [°C]	Erwartete Fragment Länge [bp] und Taxon	Autor
A	trnK2	TAA AAG CCG AGT ACT CTA CCG TTG	47,5		(Dumolin-Lapegue et al., 1997)
	trnQr	CTA TTC GGA GGT TCG AAT CCT TCC			
B	trnT1	GCC CTT TTA ACT CAG TGG TA	52,5		(Dumolin-Lapegue et al., 1997)
	psbCr	GAG CTT GAG AAG CTT CTG GT			
C	trnF	CTC GTG TCA CCA GTT CAA AT	57,5		(Dumolin-Lapegue et al., 1997)
	trnVr	CCG AGA AGG TCT ACG GTT CG			
D	trnV	CGA ACC GTA GAC CTT CTC GG	57,5		(Dumolin-Lapegue et al., 1997)
	rbcLr	GCT TTA GTC TCT GTT TGT GG			
E	trnH	ACG GGA ATT GAA CCC GCG CA	62	1690	(Demesure et al., 1995)
	trnK	CCG ACT AGT TCC GGG TTC GA			
F	trnD	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC	54,5	1800	(Demesure et al., 1995)
	trnT2	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG			
G	psbC	GGT CGT GAC CAA GAA ACC AC	57	1680	(Demesure et al., 1995)
	trnS	GGT TCG AAT CCC TCT CTC TC			
Pk1	rpoC2	TAG ACA TCG GTA CTC CAG TGC	55	4105	(Liston, 1992)
	rpoC1	AAG CGG AAT TTG TGC TTG TG			
Pk3	trnM	TGC TTT CAT ACG GCG GGA GT	55	3005	(Demesure et al., 1995)

Primer-kombination	Primer	Sequenz 5'-3'	Annealing-temperatur [°C]	Erwartete Fragment Länge [bp] und Taxon	Autor
	rbcl	GCT TTA GTC TCT GTT TGT GG			
Pk4	aB48557 fA50272	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	53	1500	(Taberlet et al., 1991)
H	trnK2r trnK1	CAA CGG TAG AGT ACT CGG CTT TTA GGG TTG CCC GGG ACT CGA AC	53,5	2580 Quercus	(Demesure et al., 1995)
J	trnF (d) trnL (f)	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	57		(Taberlet et al., 1991)
K	psa Ar trnf M	ATT CGT TCG CCG GAA CCA GAA GT GAA CCC GTG ACC TCA AGG TTA TG			(Dumolin-Lapegue et al., 1997)
M	trn Q trn Rr	GGG ACG GAA GGA TTC GAA CC ATT GCG TCC AAT AGG ATT TGA A	56,5		(Dumolin-Lapegue et al., 1997)
N	trnf Mr trn S	CAT AAC CTT GAG GTC ACG GG GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC	62		(Demesure et al., 1995)
O	trn Sr psaA	AAC CAC TCG GCC ATC TCT CCT ACT TCT GGT TCC GGC GAA CGA A	58		(Demesure et al., 1995)

Mit einer Primerkombination wurde, unter Einsatz der DNA der zu untersuchenden Taxa, eine PCR durchgeführt. Ein PCR Ansatz setzte sich aus 2,5 µl 10 x Puffer (entsprechend zur Polymerase, Genecraft, Münster), 2,5 µl dNTPs (2 mM), je 0,25 µl Primer (50 pmol) und 0,5 Units Polymerase (BioTherm™ DNA Polymerase, Genecraft, Münster) zusammen. Zu jedem Ansatz wurde 50 ng DNA zugeben und mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde in Thermocyclern (TGradient, Biometra, Göttingen) mit dem folgenden Profil durchgeführt: Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Annealing bei der in der Tabelle 2-4 angegebenen Temperatur für 30 sec, Elongation bei 70 °C für 1 min 30 sec. Bei Fragmenten mit mehr als 2.000 bp wurde die Elongationszeit auf 2 min verlängert. Insgesamt wurden 35 Zyklen durchlaufen und bei 4 °C die Proben im Thermocycler bis zur Entnahme gekühlt. Um das Ergebnis der PCR zu überprüfen, wurden 4 µl der PCR-Reaktion auf ein 0,8 %iges Agarosegel, mit einem Längenstandard (z. B. Smartladder, Eurogenetec, Köln) aufgetragen und nach der Elektrophorese in Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert (Siehe Abschnitt 2.7.2). Die Restriktion der PCR-Produkte wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Bei allen handelte es sich um ‚four-base-cutter‘, also um Enzyme, die eine aus vier Basen bestehende Erkennungssequenz benötigen. Sie werden auch als „frequent cutter“ bezeichnet, da sie relativ häufig im Genom ansetzen. Es wurden folgende Enzyme bei der in Klammern

angegebenen Temperatur eingesetzt: *AluI* (37 °C), *BsuRI* (37 °C), *TaqI* (65 °C), *RsaI* (37 °C), alle Enzyme von der Firma Genecraft (Münster). Ein Ansatz (25 µl) für die Restriktion setzte sich aus 2,5 µl 10 x Puffer (entsprechend zum Restriktionsenzym, Genecraft, Münster), 8 Units eines der angegebenen Restriktionsenzyme und 10 µl des PCR-Produktes eines universellen Chloroplastenprimerpaars zusammen. Dieser Ansatz wurde mindestens 2 h, besser über Nacht, bei der angegebenen Temperatur (z. B. im Heizblock) inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Proben bei -20 °C gelagert oder sofort auf ein hochprozentiges (Agarose 2 % oder Metaphoragarose 4,5 %, Biozym, Hessisch Oldendorf) Gel aufgetragen. Das Gießen des Gels erfolgte mit Hilfe eines Wasserbades, da sich hochprozentige Agarose sonst schwer verarbeiten lässt. Auf dem Agarosegel wurde ein Längenstandard (Smartladder, Eurogenetec, Köln) mit aufgetragen. Das Gel wurde in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend unter UV-Licht fotografiert (Siehe Abschnitt 2.7.2). Die Auswertung erfolgte anhand der Fotos.

2.7.5 Random Amplified Polymorphic DNA Analysen, RAPD Analysen

Bei RAPD Analysen (Williams et al., 1990) werden Primer eingesetzt, die mit einer Länge von zumeist 10 bp zufällig im Genom binden. Da jeweils nur ein Primer in eine Reaktion eingesetzt wird, muss der jeweilige Primer mindestens an zwei Stellen binden, um in der PCR-Reaktion ein Produkt zu amplifizieren. Die RAPD-Primer mit dem Präfix IFG (Tabelle 2-5) wurden freundlicherweise von T. Markussen (Institut für Forstgenetik, Großhansdorf) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2-5: Sequenzen der IFG RAPD-Primer

Primer Name	Sequenz 5' - 3'
IFG1	CAG GCC CTT C
IFG2	TGC CGA GCT G
IFG3	AGT CAG CCA C
IFG4	AAT CGG GCT G
IFG5	AGG GGT CTT G
IFG6	GGT CCC TGA C
IFG7	GAA ACG GGT G
IFG9	GGG TAA CGC C
IFG10	GTG ATC GCA G
IFG11	CAA TCG CCG T
IFG12	TCG GCG ATA G
IFG13	CAG CAC CCA C
IFG14	TCT GTG CTG G
IFG15	TTC CGA ACC C
IFG16	CAA ACG TCG G
IFG17	GTT GCG ATC C
IFG18	GTT TCG CTC C
IFG19	TGA TCC CTG G
IFG20	CAT CCC CCT G
IFG22	GTT GCG ATC CAT GTC C
IFG23	CCA CGC ATG CAA CAG C
IFG24	CTG ACC GTA CTA GCT G

Primer Name	Sequenz 5' - 3'
IFG25	CGC ACG CAT GCC GCA GC
IFG26	CTG GCC GAT CGT GTC GC

Ein PCR-Ansatz (25 µl) setzte sich aus 1 x PCR-Puffer mit MgCl₂ (MgCl₂-Gehalt wurde nach Bedarf verändert), 0,25 µM dNTPs, 0,2 µM Primer, 0,5 Units Polymerase (BioTherm™ DNA polymerase, Genecraft, Münster) und 50 ng DNA zusammen. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) mit folgendem PCR-Profil durchgeführt: Dem ersten Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min schlossen sich 5 Zyklen mit 95 °C 1 min, 32 °C 1 min, 72 °C 1 min an. Danach folgten 35 Zyklen mit 95 °C 30 sec, 32 °C 30 sec, 72 °C 30 sec. Im Anschluss erfolgte ein Elongationsschritt bei 72 °C für 3 min sowie eine Kühlung bei 4 °C.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,75 %igem Agarosegel in 0,5 x TBE aufgetrennt, ein Längenstandard wurde an den Rändern aufgetragen (1 kb ladder von Genecraft, Münster), das Gel in Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert (Siehe Abschnitt 2.7.2).

Für einige Primer wurde die optimale Annealingtemperatur mittels Gradienten-PCR in dem Thermocycler TGradient (Biometra, Göttingen) ermittelt. Innerhalb des Heizblockes werden dabei an verschiedenen Positionen unterschiedliche Annealingtemperaturen angelegt. Die Temperatur wurde meist um bis zu 5 °C unter bzw. über die vom Hersteller vorgeschlagene Temperatur (T_m -2 °C) erniedrigt bzw. erhöht. Die MgCl₂-Konzentrationen wurden zum Teil erniedrigt, um eine spezifischere PCR zu erreichen. Die Auswertung erfolgte anhand eines vergrößerten Ausdrucks des Gelfotos, zum Teil auch am Bildschirm.

2.7.6 Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP-Analysen

Fluoreszenzmarkierte AFLP-Analysen, die auf der radioaktiv markierten AFLP Technologie von Vos et al. (1995) basieren, wurden für die Untersuchung der Populationen sowie für die Gattungsuntersuchungen eingesetzt. Die AFLP-Analyse setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Diese umfassen das Schneiden der DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen, die Ligation von Adaptern sowie zweimalige PCR Amplifikationen mit selektiven Primern (Präamplifikation und selektive Endreaktion) und Detektion mit einem automatischen Sequenzierer. Hier wurde die Enzymkombination *EcoRI/Tru9I* und *Pst/Tru9I* eingesetzt. Die Sequenzen der Adapter und Primer wurden nach Vos et al. (1995) ausgewählt (Tabelle 2-6).

Für die Restriktion mit dem Enzym *EcoRI* (alle Enzyme und entsprechende Puffer von der Firma Genecraft, Münster) wurden für einen 25 µl Ansatz 2,5 µl 10 x Puffer H, 20 U *EcoRI* und 500 ng DNA eingesetzt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die zweite Restriktion wurden 10 U *Tru9I* und 4 µl H₂O zugegeben und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Das Enzym *Tru9I* schneidet die DNA an der identischen Erkennungssequenz wie das Enzym *MseI* (Isoschizomer). Da Vos et al. (1995) mit *MseI* gearbeitet haben, wird im folgenden Text von *MseI* gesprochen, wenn auf die Schnittstelle von *Tru9I* Bezug genommen wird.

Für die Ligation der Adapter an die Restriktionsenden der DNA, wurden einzelsträngige Adapter mit bekannter Sequenz (Vos et al., 1995) hergestellt (Sigma ARK, München) und diese komplementär aneinander gebunden. Es wurden *EcoRI*-Adapter, *Pst*-Adapter und *MseI*-Adapter eingesetzt. Für die einzelnen Adapterstränge (O = oben, U = unten) ergaben sich

folgende Verhältnisse: Für AdEcoO+U, (5 pMol): 7,6 µl AdEcoO (100 pmol/ µl) + 7,6 µl (100 pmol/ µl) +128µl H₂O. Für AdPstO+U (5pMol): je 7,7 µl AdPstO, bzw. U + 128 µl H₂O. Für AdMseO+U (50 pMol): 15 µl AdMseO (100 pmol/ µl) +15,5µl MseU. Diese Ansätze wurden für 5 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert und langsam über Nacht abgekühlt. Der Ansatz für die Ligation der Adapter an die mit *EcoRI* und *MseI* geschnittene DNA setzte sich aus 0,5 µl Adapter-EcoRI (5 pMol) sowie 0,5 µl Adapter-MseI (50pMol), 2,4 µl 10 x T4 Ligasepuffer incl. ATP (Genecraft, Münster) und 0,5 U T4 Ligase (Genecraft, Münster) zusammen, die mit H₂O auf 6,3 µl aufgefüllt und der geschnittenen DNA zugegeben wurden. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 3,5 h inkubiert.

In der Präamplifikationsreaktion werden Primer eingesetzt, die an den Adaptern inserieren. Zusätzlich zur Sequenz der Adapter besteht der Präamplifikationsprimer noch aus einer weiteren Base, in der vorliegenden Untersuchung aus einem zusätzlichen Adenin (A). Diese selektive Base ermöglicht eine Verringerung der Anzahl unterschiedlicher PCR-Produkte in der Präamplifikation genannten PCR-Reaktion etwa um das 16 fache. Der Reaktionsansatz der Präamplifikation setzte sich aus 10 µl der geschnittenen und mit Adaptern versehenen DNA, jeweils 1,5 µl der Präamplifikationsprimer von PEcoRI+A (100 pmol/ µl) und PMseI+A (100 pmol/ µl), 5 µl dNTPs (2 mM), 2,5 Units Polymerase (BioTherm™ DNA Polymerase, Genecraft, Münster) 5 µl 10x Puffer (entsprechend der Polymerase, mit MgCl₂) zusammen, der mit H₂O auf 54 µl Volumen aufgefüllt wurde. Der Ansatz wurde auf Eis angesetzt, in 0,2 ml Reaktionsgefäße gegeben und im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) unter folgendem Programm ausgeführt: Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Annealing bei 60 °C für 30 sec und Elongation bei 72 °C für 60 sec. Davon wurden 20 Zyklen durchlaufen. Die Kühlung erfolgte bei 10 °C. Im Anschluss an die Präamplifikation standen mehrere EcoRI/MseI-Primerkombinationen für die selektive Amplifikation zur Verfügung, diese Amplifikation reduziert die möglichen PCR-Fragmente weiter, da hier beide Primer zwei weitere selektive Basen tragen. Für diese beiden Basen stehen nachfolgend die Buchstaben X und Y. Der selektive EcoRI Primer ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der eine spätere Laserdetektion ermöglicht. Der 10 µl Ansatz für eine selektive Amplifikation setzte sich zusammen aus: 2,5 µl selektiver Primer Eco+XY (50ng/ µl), 0,3 µl selektiver Primer Mse+XY (50ng/ µl), 1 µl dNTPs (2 mM), 0,3 Units Polymerase (BioTherm™ DNA Polymerase, Genecraft, Münster) 1 µl 10 x Puffer (zur Polymerase, mit MgCl₂) und 1 µl des Präamplifikationsproduktes als Template. Im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) wurde folgendes „touch-down“ PCR-Profil für die selektive Amplifikation programmiert:

1 Zyklus: 1 min 94 °C, 1 min 65°C, 1 min 30 sec 72 °C
1 Zyklus: 1 min 94 °C, 1 min 64°C, 1 min 30 sec 72 °C
2 Zyklen: 1 min 94 °C, 1 min 63°C, 1 min 30 sec 72 °C
1 Zyklus: 1 min 94 °C, 1 min 62°C, 1 min 30 sec 72 °C
2 Zyklen: 1 min 94 °C, 1 min 61°C, 1 min 30 sec 72 °C
1 Zyklus: 1 min 94 °C, 1 min 60°C, 1 min 30 sec 72 °C
2 Zyklen: 1 min 94 °C, 1 min 59°C, 1 min 30 sec 72 °C
1 Zyklus: 1 min 94 °C, 1 min 58°C, 1 min 30 sec 72 °C
1 Zyklus: 1 min 94 °C, 1 min 57°C, 1 min 30 sec 72 °C
24 Zyklen: 1 min 94 °C, 1 min 56°C, 1 min 30 sec 72 °C

Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Die Trennung der PCR-Produkte und Detektion der Fragmente erfolgte am automatischen Sequenzierer ALFexpress (GE Healthcare, Upland LA, USA). Das Polyacrylamidgel für die Elektrophorese am ALFexpress wurde mit dem „ReproGel™ High Resolution Kit“ (Amersham Biosciences) nach Anweisungen des Herstellers in 0,3 mm Dicke gegossen und unter UV-Licht polymerisiert. Die Geltaschen wurden mit 0,5 x TE Puffer gespült, dieser wurde auch als Puffer für den Gellauf eingesetzt. Zu den PCR-Produkten der selektiven Amplifikation wurden 10 µl Formamid-Ladepuffer (5 mg Dextranblau in 1 ml deionisiertem Formamid gelöst) gegeben. Dem Ladepuffer wurde vorher nach Herstellerangaben ein 100 bp Standard und ein 300 bp Standard (beide GE Healthcare, Upland LA, USA) zugefügt oder es wurde ein interner Standard nach Rudolph (2001) hergestellt und dem Ladepuffer zugegeben. Dieser interne Standard umfasst drei Banden mit den Längen 71, 140 und 300 bp.

Als externer Standard wurde der 50 bis 500 bp Standard von GE Healthcare (Upland LA, USA) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Proben und der externe Standard wurden für 2 Minuten bei 94 °C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert. In die Gel-Taschen am ALFexpress wurden je 6 µl des mit Ladepuffer versetzten denaturierten PCR-Produkts aufgetragen, vom externen Standard wurden 5,5 µl aufgetragen.

Für den Gellauf auf dem ALFexpress wurden folgende Laufparameter gewählt: Spannung 1.500 Volt, Stromstärke 60 mA, Leistung 24 W, Laufzeit 600 min, Temperatur 55 °C, Probenintervall 2 sec, Detektion alle 2 sec.

Nach dem Gellauf wurde das Gelbild gespeichert. Die Banden wurden in dem Programm Fragment Analyzer™ (GE Healthcare, Upland LA, USA) markiert, ausgewertet und in eine 0/1-Matrix überführt. Vorhandene Banden (auch Fragmente genannt) wurden mit „1“ kodiert, auf selber Höhe fehlende mit „0“. Die Benennung der Bande erfolgte nach der errechneten Basenpaarlänge aufgrund der internen und externen Standards. Es wurden nur eindeutige Fragmente ausgewertet. Es wurden zudem Fragmente berücksichtigt, die nur bei einem Individuum vorkamen bis hin zu Banden, die bei allen Individuen auftraten. Banden mit leichten Abweichungen, vermutlich aufgrund von technischen Anomalien („shifts“), wie sie bei Gelelektrophoresen vorkommen (Ziegenhagen et al., 2003), wurden unter zu Hilfenahme der externen und internen Standards und der Längenberechnungsfunktion des Fragment Analysers™ gleichen Bandenpositionen zugeordnet.

Tabelle 2-6: Übersicht der Sequenzen von Adaptern und Primern für AFLPs nach Vos et al. (1995), mit + selektive Basen

	Sequenz 5'-->3'	Modifikation	Hersteller
Adapter			
AdEcoO	CTC GTA GAC TGC GTA CC	-	MWG
AdEcoU	AAT TGG TAC GCA GTC TAC	-	MWG
AdPstO	CTC GTA GAC TGC GTA CAT GCA	-	MWG
AdPstU	TGT ACG CAG TCT AC	-	MWG
AdMseO	GAC GAT GAG TCC TGA G	-	MWG
AdMseU	TAC TCA GGA CTC AT	-	MWG
Primer für Präamplifikation			
PEco+A	GAC TGC GTA CCA ATT CA	-	MWG
PPst+C	GAC TGC GTA CAT GCA GC	-	MWG
PMse+A	GAT GAG TCC TGA GTA AA	-	MWG
Primer für Selektive Amplifikation			
SMse+GT	GAT GAG TCC TGA GTA AAG T	-	MWG
SMse+AT	GAT GAG TCC TGA GTA AAA T	-	MWG
SMse+CA	GAT GAG TCC TGA GTA AAC A	-	MWG
SMse+GG	GAT GAG TCC TGA GTA AAG G	-	MWG
SMse+TG	GAT GAG TCC TGA GTA AAT G	-	MWG
C5Eco+TG	GAC TGC GTA CCA ATT CAT G	Cy5	SigmaARK
C5Pst+AC	GAC TGC GTA CAT GCA GCA C	Cy5	SigmaARK
C5Eco+CG	GAC TGC GTA CCA ATT CAC G	Cy5	SigmaARK

2.7.7 Inter Simple Sequence Repeats, ISSR-Analysen

Mit dem Einsatz von ISSR-Primern werden hochvariable Bereiche im Genom, die eine bestimmte Basenabfolge als Motiv haben und diese wiederholen - sie werden auch als Mikrosatelliten bezeichnet - untersucht. ISSR Primer (Tabelle 2-7) werden in eine PCR eingesetzt (Kimball et al., 2001, Wolfe, 2000). Diese Primer bestehen aus einem Motiv von zwei oder drei Basen, das sich siebenmal wiederholt. Am 3' Ende des Primers sind zwei weitere Basen eingebaut, um den Primer am 3'-Ende des Mikrosatelliten zu verankern.

Tabelle 2-7: Namen und Sequenz der verwendeten ISSR Primer, Y = T oder C, R = G oder A

Primer	5'-3' Sequenz
ISSR 1	(GT)7YG
ISSR 2	(CTC)7RC
ISSR 3	(GA)7RG
ISSR 4	(AG)7RG
ISSR 5	(GT)7AY
ISSR 6	(GA)7YG

Es wurde ein Primer pro Reaktion eingesetzt. Ein Reaktionsansatz von 9,3 µl Volumen beinhaltete: 1 µl dNTPs (2 mM), 0,5 µl MgCl₂ (50 mM), 0,25 Units Polymerase (BioTherm™ DNA Polymerase, Genecraft, Münster) 1 µl 10 x Puffer (zur Polymerase, mit MgCl₂), 0,8 µl Primer (10 ng/ µl) sowie ca. 20 ng DNA. Die PCR-Reaktion fand im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) zu folgenden Bedingungen statt: Denaturierung bei 94 °C für 2 min, dann 36 Zyklen mit 94 °C für 40 sec, 45 °C für 45 sec, 72 °C für 1 min 30 sec, 72 °C für 5 min und Kühlung bei 10 °C.

Es wurden 8 µl der PCR-Reaktion auf ein 1,7 %iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 Volt für ca. 2 h. Eine 1 kb „ladder“ (Genecraft, Münster) wurde zu beiden Seiten als Größenstandard aufgetragen. Auftrennung und Dokumentation erfolgte wie oben (2.7.2) beschrieben. Die digitalen Fotos der Gele wurden am Computer und im Ausdruck manuell ausgewertet.

2.7.8 Consensus Chloroplast Simple Sequence Repeat-Analysen (ccSSR)

Chung & Staub (2003) haben universelle Primer für Chloroplasten Simple Sequence Repeats (ccSSRs) veröffentlicht. Hier handelt es sich um Primer, die außerhalb von den Wiederholungsbereichen des Chloroplastengenoms in konservierten Regionen inserieren. Zwischen den Primerbindungsstellen befinden sich Wiederholungen, so genannte „repeats“, die häufig hochvariable Bereiche darstellen. Die ccSSRs können als hochauflösende Marker mittels PCR-Analyse verwendet werden. Die PCR Bedingungen und das PCR-Profil wurden von Chung & Staub (2003) übernommen.

Eine Reaktion mit 15 µl Volumen setzte sich wie folgt zusammen: 2,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dNTPs, 0,45 µM Primer F, 0,45 µM Primer H, 1x Puffer (zur Polymerase, mit MgCl₂), 0,2 Units Polymerase (BioTherm™ DNA Polymerase, Genecraft, Münster), 15 ng DNA. Das PCR-Profil im Thermocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) hatte folgende Parameter: Denaturierung bei 94 °C für 5 min, 35 Zyklen mit: 94 °C für 1 min, 50 °C für 1 min und 72 °C für 1 min und ein abschließender Elongationsschritt bei 72 °C für 6 min. Die Proben wurden bei 4 °C gekühlt. Die PCR Produkte wurden auf ein 1,7 %iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 ca. 2 h. Eine 1 kb „ladder“ (Genecraft, Münster) wurde zu beiden Seiten als Größenvergleich mit aufgetragen. Die Gele wurden, wie oben (2.7.2) beschrieben, gefärbt und dokumentiert. Die digitalen Fotos der Gele wurden am Computer und im Ausdruck ausgewertet. Es wurden die Primer mit den Nummern 3, 7, 9, 11, 12, 16, 17, 19, 21 und 22 eingesetzt.

Tabelle 2-8: Primerkombinationen und Sequenzen der verwendeten ccSSR-Primer nach Chung & Staub (2003)

Primer Name	Sequenz in 5' -> 3' Richtung
ccSSR_3_F	CCA AAA GCT GAC ATA GAT GTT A
ccSSR_3_R	TTT CAT TCG GCT CCT TTA TG
ccSSR_7_F	CGG GAA GGG CTC GKG CAG
ccSSR_7_R	GTT CGA ATC CCT CTC TCT CCT TTT
ccSSR_9_F	GAG GAT ACA CGA CAG ARG GAR TTG
ccSSR_9_R	CCT ATT ACA GAG ATG GTG YGA TTT
ccSSR_11_F	TTG GCT ACT CTA ACC TTC CC
ccSSR_11_R	ACC ATA GAA ACG AWG GAA CCC ACT
ccSSR_12_F	CCA AAA ACT TGG AGA TCC AAC TAC
ccSSR_12_R	TTC CAT AGA TTC GAT CGT GGT TTA
ccSSR_16_F	TAC GAG ATC ACC CCT TTC ATT C
ccSSR_16_R	CCT GGC CCA ACC CTA GAC A
ccSSR_17_F	CAC ACC AAT CCA TCC CGA ACT
ccSSR_17_R	GGT GCG TTC CGR GGT GTG A
ccSSR_19_F	CTA TGC AGC TCT TTT ATG YGG ATC
ccSSR_19_R	TCC ARG TAA TAA ATG CCC AAG TT
ccSSR_21_F	CCA CCC CGT CTC SAC TGG ATC T
ccSSR_21_R	AAA AAT AGC TCG ACG CCA GGA T
ccSSR_22_F	CCG ACC TAG GAT AAT AAG CYC ATG
ccSSR_22_R	GGA AGG TGC GGC TGG ATC

2.7.9 ITS Sequenzen

Zur Sequenzierung des Internal Transcribed Spacers (ITS) wurden die Primer ITS1 und ITS 4 (White et al., 1990), (Tabelle 2-9) eingesetzt. Diese Primerkombination umfasst die Bereiche der 18S RNA, ITS1, 5.8S RNA, ITS2 und Teile der 26S RNA. Zusätzlich wurden nach Bedarf die Primer ITS2 und ITS3 (White et al., 1990), (Tabelle 2-9) eingesetzt, die in der Mitte der Sequenz, im 5.8S Bereich inserieren, um in problematischen Fällen die Sequenzen in kürzere Abschnitte zu unterteilen.

Tabelle 2-9: Eingesetzte Primer für ITS-Sequenzierung nach White et al. (1990)

Primer	5'-3' Sequenz
ITS1F	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC

Für die Amplifikation des ITS-Fragmentes wurden jeweils ca. 100 ng genomische DNA eingesetzt. Der PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: 1 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl 10 x Puffer (zur Polymerase, ohne MgCl₂), 1 µl dNTPs (2 mM), 1 µl DMSO (10%), je 0,1 µl Primer F und Primer R (10 ng/ µl), 0,25 Units Polymerase (BioTherm™ DNA Polymerase, Genecraft, Münster). Der Ansatz wurde mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Um eine „hot start PCR“ durchzuführen, wurde die Polymerase mit ca. 1,5µl des Reaktionsansatzes erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zur PCR-Reaktion im Thermocycler (TGradient Biometra, Göttingen) gegeben. Das PCR-Profil setzte sich aus den folgenden Schritten zusammen: Denaturierung bei 95 °C für 10 min, 37 Zyklen mit 95 °C für 45 sec, 50 °C für 24 sec, wobei in jedem Zyklus die Temperatur um 0,05°C erniedrigt wurde („touch down“) und 72 °C für 30 sec, wobei in jedem Zyklus die Zeit der Elongation um jeweils 2 sec verlängert wurde. Es schloss sich ein finaler Elongationschritt bei 72 °C für 1 min an, anschließend wurden die Proben bei 10 °C gelagert. Diese PCR-Reaktion wurde mit dem PCR-Produkt wiederholt (Reamplifikation), um eine genügend große Menge von PCR-Produkt für die Sequenzierung zu erhalten. Das PCR Produkt wurde mit dem Montage PCR-kit von Millipore (Schwalbach) nach den Instruktionen des Herstellers aufgereinigt und mit 20 µl H₂O aus der Säule eluiert. Qualität und Quantität des aufgereinigten PCR Produktes wurde auf einem Agarosegel (0,8 %) kontrolliert. Die Sequenzreaktion wurde mit dem Big Dye Fertigmix (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach Angaben des Herstellers, jedoch in der Hälfte des Ansatzes, durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 2 µl DMSO (10 %), 1,5 µl Primer (10 ng/µl), ca. 50 ng DNA (aufgereinigtes PCR-Produkt), 5,7 ml Sequenzierungspuffer (zum Big Dye). Dieser Mix wurde mit H₂O auf 17,7 µl aufgefüllt. 2,3 µl Big Dye wurden nach dem ersten Denaturierungsschritt im Themocycler der Reaktion zugegeben, da eine „hot start PCR“ durchgeführt wurde. Das Programm für die Sequenzierreaktion im Themocycler (TGradient, Biometra, Göttingen) setzte sich aus folgenden Schritten zusammen: Denaturierung bei 96 °C für 5 min, dann Zugabe von 2,3µl Big Dye zur Reaktion, anschließend 25 Zyklen bei 96 °C für 45 sec, 50 °C für 15 sec. und 60 °C für 4 min., anschließend Pause bei 10 °C. Diese 20 µl Sequenzreaktionslösung wurden anschließend komplett in eine Fällung eingesetzt. Gefällt wurde, indem 80 µl 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 300µl Ethanol (96 %) zur Sequenzreaktionslösung gegeben wurden. Es wurde gemischt und bei Raumtemperatur 20 min. inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl Ethanol (76 %) gewaschen, bei 4 °C und ca. 16.000 g 1 h zentrifugiert und danach der Überstand vollständig abpipettiert und das Pellet getrocknet.

Der Lauf der Sequenzreaktion wurde im Sequenzierservice des Universitäts Klinikums Eppendorf (UKE) als Auftragsarbeit, auf einem Gerät der Firma ABI mit Kapillaren, durchgeführt. Die Sequenz-Datei wurde im Computerprogramm BioEdit (Hall, 1999-2004) geöffnet, umgespeichert und anschließend im Programm Sequencher (GeneCodes) editiert und in ein Alignment gebracht. Das Editieren erfolgte nach IUPAC Standards (2.8.8). Mittels Datenbanksuche u. a. BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) wurde geprüft, ob die sequenzierten Organismen sich in der erwarteten Organismengruppe befanden. Bei den hier untersuchten Arten ergab jede Suche Treffer in den Ruschioideae, Aizoaceae.

2.8 Auswertungsmethoden

2.8.1 Normalverteilung und Gruppenunterschiede

Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung geprüft. Bei vorliegender Normalverteilung wurde mittels einfaktorieller ANOVA geprüft, inwieweit die Zugehörigkeit eines Individuums zu einer bestimmten Population einen signifikanten Einfluss auf das untersuchte Merkmal hat. Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein nichtparametrischer Rangkorrelationstest, der Kruskal-Wallis-Test, auf die Daten angewendet. Hier wird getestet, ob sich die mittleren Ränge der Population signifikant voneinander unterscheiden. Für die genannten Tests kam das Software-Paket SPSS 10.0 zur Anwendung.

2.8.2 Gruppierungen

2.8.2.1 Cluster-Analysen

Die Cluster-Analysen wurden mittels des Software-Paketes MVSP 3.1 (Kovach, 1999) durchgeführt. Cluster-Analysen sind numerische Techniken, deren Hauptzweck es ist, die untersuchten Objekte hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit in Gruppen aufzuteilen. Diese Gruppierungen basieren auf Merkmalen der Objekte „and it is hoped the clusters will have some sort of significance related to the research questions being asked“ (MVSP 3.1 users manual, (Kovach, 1999)).

Es gibt verschiedene Ansätze zur Berechnung von Clustern; einer der meist verwendeten ist der agglomerative hierarchische Ansatz. Diese Methoden arrangieren die Cluster in einer Hierarchie, so dass die Beziehungen zwischen den verschiedenen Gruppen offensichtlich werden. Die Berechnungen basieren auf einer paarweisen Ähnlichkeits- oder auch Distanzmatrix, wobei es viele verschiedene Maße gibt. Hier werden dann die beiden ähnlichsten zusammengefasst und dann als ein Objekt in die nächste Berechnung von Ähnlichkeit einbezogen. Für jeden Schritt wird eine neue Matrix erstellt und jeweils die beiden ähnlichsten Objekte für den nächsten Schritt zusammengefasst. Die Darstellung erfolgt über Dendrogramme, in denen entlang der Abszisse die zu klassifizierenden Objekte angeordnet werden und auf der Ordinate die Ähnlichkeit zwischen den Objekten bzw. Objektgruppen durch die Distanz der sie verbindenden Brücken dargestellt wird.

In der vorliegenden Arbeit kam das Homogenitätsoptimierende Verfahren der „Minimum Variance“ mit der quadrierten Euklidischen Distanz und „Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean“ (UPGMA) zum Einsatz. „Minimum Variance“ bedeutet, dass diejenigen Gruppen verschmolzen werden, bei denen die Varianz bzw. deren Zunahme am geringsten ist. Die Varianz ist dabei der mittlere quadratische Abstand der Objekte einer Gruppe vom Schwerpunkt der Gruppenpunktwolke. Dieses Verfahren ist auch als Ward-Algorithmus (Ward, 1963) oder sum of squares cluster bekannt. UPGMA beinhaltet mehrere Schritte bei denen die beiden ähnlichsten Individuen oder Gruppen zusammengefasst werden. Nach dem Zusammenfassen werden die Ähnlichkeiten der Gruppe und der übrigen Individuen berechnet und wieder die ähnlichsten zu einem Cluster zusammengefasst. UPGMA setzt die theoretische Annahme einer konstanten Evolutionsrate voraus.

Hauptkoordinaten Analysen (Principal Coordinates Analysis - PCO) wurden mit MVSP 3.1 (Kovach, 1999) durchgeführt. Eine PCO kann auch als eine generalisierte Form der Principal Component Analysis (PCA) angesehen werden. Jedoch sucht eine PCA nach Mustern innerhalb der Variablen, die PCO sucht Ähnlichkeiten zwischen den Fällen (hier also zwischen Individuen bzw. Populationen). Es wird eine Distanzmatrix (Distanzen zwischen den Fällen) analysiert. Wenn es mehr Variable gibt als Fälle wird die Anwendung einer PCA nicht empfohlen (Kovach, 1999), daher wurde für alle Daten eine PCO durchgeführt.

2.8.2.2 Diskriminanzanalysen

Das Ziel einer Diskriminanzanalyse (DA) besteht darin, durch eine lineare Transformation der unterscheidenden Variablen eine optimale Trennung zweier oder mehrerer Gruppen herauszustellen (beschreibende DA) und die Gruppenzugehörigkeit einer Einheit unbekannter Herkunft möglichst genau vorherzusagen (McGarigal et al., 2000). Für die Diskriminanzanalysen fand das Statistik-Paket SPSS 10.0 Anwendung.

2.8.3 Varianzanalyse

Analysis of Variance (ANOVA): Bei Normalverteilung wird mittels einfaktorieller ANOVA geprüft, inwieweit die Zugehörigkeit eines Individuums zu einer bestimmten Population einen signifikanten Einfluss auf das untersuchte Merkmal hat. Hierfür kam das Statistik-Paket SPSS 10.0 zur Anwendung.

2.8.4 Genetische Diversität

Genetische Diversität, die genetische Differenzierung innerhalb der Populationen und genetische Unterschiede zwischen Populationen wurden anhand der AFLP-Daten mit dem Programm AFLPsurv (Vekemans, 2002) berechnet. Die Berechnungen erfolgten aufgrund der Annahme, dass gleiche AFLP Bandenpositionen homologe Loci repräsentieren. Zudem wird angenommen, dass die Populationen sich im Hardy-Weinberg Gleichgewicht befinden (dies ist eine theoretische Annahme). Der Prozentsatz polymorpher Banden (P %) und die genetische Diversität nach Nei (1978) (H_e) wurde berechnet. Zudem wurde für einige Datensätze der Anteil

privater Fragmente - hier treten die Banden nur innerhalb einer Population auf - und die Anzahl der seltenen Fragmente - treten bei nicht mehr als 10 % der untersuchten Individuen auf - ermittelt.

2.8.5 Distanzberechnungen

Zur Berechnung der Distanzen (mean distance) zwischen den untersuchten Individuen basierend auf molekularen Daten wurde das Programm PAUP* eingesetzt. Hierzu wurden die binären Matrices aus den AFLP-Untersuchungen in das Programm eingelesen und paarweise Distanzen berechnet.

Räumliche Abstände zwischen den Populationen wurden anhand der mittels GPS eingemessenen Fundorte im GIS (ArcView) ermittelt und in Kilometern angegeben. Abstände zwischen den Individuen einer Population wurden nicht gemessen, sie wurden für die Berechnungen mit 0 km angegeben.

2.8.6 AMOVA

Für die **A**nalysis of **m**olecular **V**ariance (AMOVA), also für die Berechnung der molekularen Varianz wurde das Programm Arlequin (Schneider et al., 2000) eingesetzt. Die Datenmatrix für diese Berechnungen beruht auf den jeweiligen AFLP Daten. Diese wurden für jede Population und hier für jedes Individuum eingegeben. Zu jeder Population kommt die Information, wie viele Individuen einbezogen werden, hinzu. Sind alle Populationen eingegeben, werden die Gruppen der übergeordneten Struktur definiert.

2.8.7 Mantel-Test

Der Mantel-Test ist ein Test, der die Korrelation zwischen zwei Distanz-Matrices berechnet. Dieser Test stellt eine multivariate Technik dar, die es erlaubt, auch abhängige Daten, wie die genetischen Distanzen zwischen Individuen, einzubeziehen. Für den Mantel-Test wurde das Programmpaket **T**ools for **p**opulation **g**enetics **a**nalysis (Tfpga) (Miller, 1997) eingesetzt.

Ein Korrelationskoeffizient R_0 wird für die Ausgangs-Daten berechnet. Die Reihenfolge der Zeilen und Spalten einer Matrix wird im Rahmen von Wiederholungen ständig verändert (Permutiert). Wenn die Ausgangsmatrices eine Korrelation (R_0) aufweisen, dann wird durch das Permutieren der Korrelationskoeffizient reduziert. Das Maß für die Signifikanz (p) ist die Anzahl der Fälle, bei denen der Korrelationswert nach der Permutation denjenigen der Ausgangsmatrices übersteigt. Wenn zum Beispiel 999 Permutationen durchgeführt werden und nur bei einer der errechnete Korrelationskoeffizient den Wert von R_0 übersteigt, ist $p = 0,001$. Sind die Matrices nicht korreliert dann wird angenommen, dass die Permutationen häufig einen höheren Korrelationswert als R_0 aufweisen.

Dazu wurden paarweise genetische Distanzen auf Basis der AFLP-Daten berechnet. Diese wurden dann in einer Tabelle mit den räumlichen Distanzangaben zwischen den Populationen ergänzt. Die Datenmatrix wurde nach den Angaben im Programm Tfpga (Miller, 1997) editiert.

2.8.8 Sequenzen

Die Dateien der Roh-Sequenzen aus dem Auftragslabor wurden in BIOEdit (Hall, 1999-2004) geöffnet, anschließend als .scf-Datei gespeichert und in das Programm Sequencher® importiert. Hier wurden die Hin- und Rücksequenz eines Individuums einer Art in ein Alingment gebracht und gegebenenfalls editiert. Dies wurde nach den IUB/IUPAC Standard Codes durchgeführt, der folgende Definitionen umfasst: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, U = Uracil, M = A oder C, R = A oder G, W = A oder T, S = C oder G, Y = C oder T, K = G oder T, V = A oder C oder G, H = A oder C oder T, D = A oder G oder T, B = C oder G oder T, N = A oder G oder C oder T, - = Lücke von unbestimmter Länge.

Von den Sequenzen wurden Consensus-Sequenzen abgeleitet. Diese abgeleiteten Sequenzen wurden mit den Consensus Sequenzen weiterer Arten der Gattung in ein Alingment gebracht. Positionen, an denen es Unterschiede zwischen den Sequenzen gab, wurden nochmals in den Chromatogrammen der einzelnen Sequenzen überprüft.

2.8.9 Phylogenetische Auswertung

Die ITS-Sequenzdaten, die Daten aus den AFLP-Untersuchungen sowie die Ergebnisse aus den ISSR und aus den Chloroplasten SSR Untersuchungen wurden einzeln herangezogen, um einen Einblick in die Struktur innerhalb der Gattung *Gibbaeum* zu erhalten. Dazu wurden die Daten als Sequenz-Daten im Falle von ITS oder als 0/1-Matrix importiert. In PAUP* wurden Parsimony-Analysen mit „heuristic search“ durchgeführt, die Additionssequenz war zufällig (random), der Austausch der Zweige erfolgte mit Tree-bisection-reconnection (TBR). Distanzberechnungen erfolgten mit Neighbour-joining. Die Außengruppe wurde definiert, die Innengruppe wurde als monophyletisch angenommen. Für die statistische Absicherung wurden bootstrap-Berechnungen mit 1000 Wiederholungen durchgeführt; Werte unter 50 % werden nicht angezeigt.

3 Ergebnisse

3.1 Bodenanalysen in den Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Für 12 Populationen (Populationen G4 bis G15) wurden Bodenmischproben untersucht.

Der pH-Wert der untersuchten Bodenproben liegt im neutralen Bereich um pH 7 (6,5 bis 7,9). Der HCl-Test auf Carbonatgehalt ergab für die meisten Populationen 1 oder 0, das bedeutet nach AG Boden (1994), dass das Substrat carbonatfrei (0) bis sehr carbonatarm (1) ist. Bei zwei Populationen lag der Wert bei 2 (carbonatarm) und für eine Probe bei 3 (carbonathaltig). Die elektrische Leitfähigkeit schwankt zwischen 1,27 mS/cm bis zu 11,73 mS/cm. Die Bodenarten (nach AG Boden, (1994)) des Feinbodens bestehen aus einer Mischung aus Sand und Ton in unterschiedlichen Mengenanteilen. In Population G7 wurde zudem ein Anteil von Schluff (mittelschluffiger Sand) festgestellt.

Tabelle 3-1: Ergebnisse der Untersuchung der Bodenmischproben der Populationen

Labornummer	pH-Wert	HCl-Test	Leitfähigkeit mS/cm	Substrat (Fingerprobe)
G4	6,5	1	1,27	Sl4
G5	7,2	1	5,10	Ls2
G6	6,8	0	4,32	Ls2
G7	7,4	1	1,51	Su3
G8	7,4	1	5,89	TI
G9	7,2	1	6,17	Ls3
G10	7,6	2	3,43	Sl2
G11	7,9	2	6,64	Sl2
G12	7,8	3	11,73	TI
G13	7,2	0	5,84	TI
G14	7,6	0	5,77	Ts4
G15	7,6	0	6,63	Ls4

3.2 Vegetation in den Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Die Vegetation der beprobten Quarzflächen wurde in Form von Artenlisten aufgenommen. Für 13 der untersuchten Populationen von *G. nuciforme* liegen zur Vegetation Daten vor (Tabelle 3-2). Eine Einordnung der Vegetation nach An- und Abwesenheit von Arten wurde vorgenommen.

Tabelle 3-2: Vorkommen von Arten in den Populationsflächen (G3-G15), 1= Art in der Fläche vorhanden, 0 = Art in der Fläche nicht vorhanden

Vegetation	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
<i>Berkeya spinosa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bulbine sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Crassula columella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Crassula cf. tecta</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Felicia filifolia</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gibbaeum geminum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Gibbaeum heathii</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Gibbaeum nuciforme</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Gibbaeum pubescens</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Glottiphyllum regium</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Hereroa-strauch</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Malephora lutea</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Psilocaulon articulatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Pteronia cf. adenocarpa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pteronia pallens</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
<i>Pteronia succulenta</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruschia cardockensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salsola sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Salsola sp. (seidig)</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Titanopsis hugo-schlechteri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Für die Vegetation innerhalb der Populationen von *G. nuciforme* wurden 20 Taxa identifiziert. Die Anzahl der Taxa variiert zwischen eins und sechs je Aufnahme.

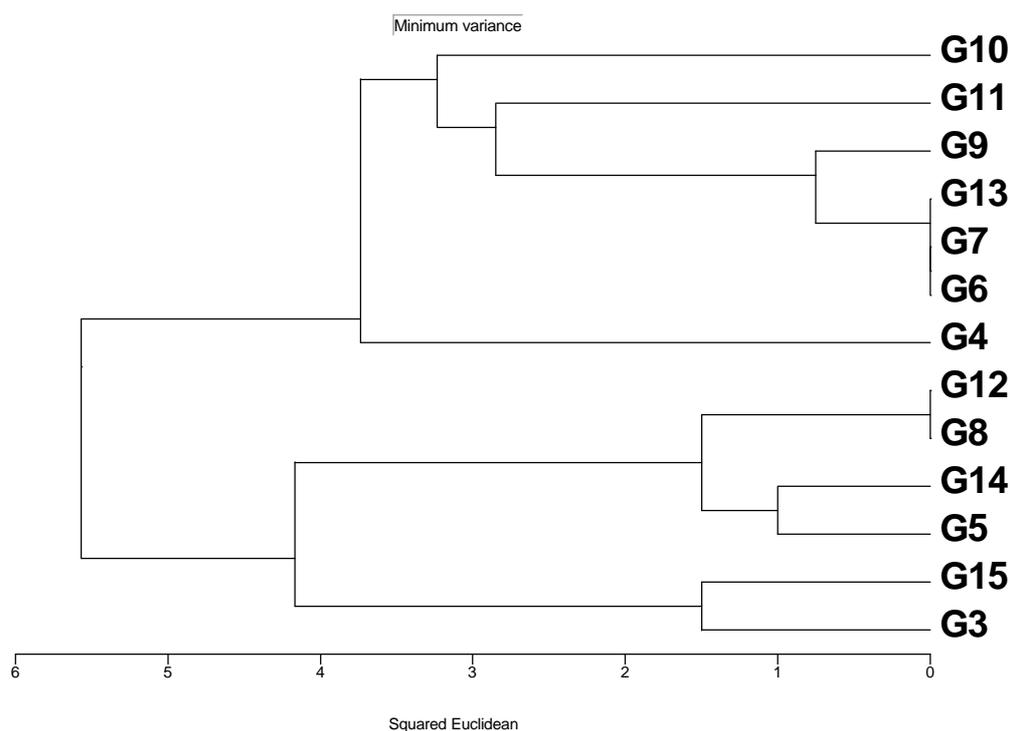


Abbildung 3-1: Cluster-Analyse (Minimum Variance, quadrierte euklidische Distanz) der in Tabelle 3-2 aufgeführten Vegetationsdaten für die Probestellen der Populationen G3 bis G15

Die Cluster-Analyse (Abbildung 3-1) der Vegetationsdaten weist zwei Gruppen auf: in der einen befinden sich die Populationen G4, G6, G7, G9, G10, G11 und G13, in der anderen die Populationen G3, G5, G8, G12, G14 und G15. Allen Aufnahmen gemeinsam ist das Vorkommen von *G. nuciforme* (Tabelle 3-2). Die Aufnahmen der Populationen G6, G7 und G13 enthalten ausschließlich die Art *G. nuciforme* und gruppieren aufgrund des Fehlens weiterer Arten zusammen (Abbildung 3-1), in Population G9 tritt zu *G. nuciforme* mit *G. heathii* eine weitere Art hinzu. In den Populationen G10 und G11 tritt *G. geminum* als gemeinsame Art auf. Aufgrund der Abwesenheit von gemeinsamen Arten (bis auf *G. nuciforme*) mit allen übrigen Aufnahmen, ist Population G4 basal zu der Gruppe gestellt, in der die Aufnahmen mit nur *G. nuciforme* der Populationen G6, G7 und G13 gruppieren.

Die zweite Gruppe ist, neben *G. nuciforme*, durch das Vorkommen von *Pteronia pallens* charakterisiert; sie kommt in allen Aufnahmen dieser Gruppe (G3, G5, G8, G12, G14, G15) vor. Die Aufnahmen für G8 und G12 weisen neben den beiden vorgenannten Arten noch *G. pubescens* auf und haben ein identisches Arteninventar. Die Aufnahmen von Population G3 und G15 gruppieren aufgrund des Vorkommens von *Malephora lutea* zusammen.

3.3 Habitataufnahme für Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Für 14 Populationen liegen Daten zur Gesteinsbedeckung der Bodenoberfläche vor (Tabelle 3-3). Bis auf eine Ausnahme (Population G5) weisen die untersuchten Populationen Quarzgrus

in der Bodenbedeckung auf. Die Werte schwanken von 10 % Quarzbedeckung in Population G10 bis zu 90 % Quarzbedeckung in den Populationen G9, G11 und G14.

Population G5 und G10 weisen keine bzw. nur geringe Bodenbedeckung mit Quarzgrus, jedoch mit 90 % bzw. 80 % eine hohe Bodenbedeckung mit Sandsteinschotter auf. Neben diesen beiden Populationen weisen noch drei weitere (G2, G3 und G11) eine teilweise Bodenbedeckung (20 %, 30 % und 5 %) mit Sandsteinschotter auf. Die Hangneigung der Flächen, auf denen die untersuchten Populationen von *G. nuciforme* wuchsen, ist gering (0 bis 8 %) (Tabelle 3-3), die stärkste Neigung des Geländes weist Population G3 mit 8 % auf.

Tabelle 3-3: Bodenbedeckung mit Gestein sowie Hangneigung für 14 Populationen von *G. nuciforme* (G2-G15)

Parameter	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
Quarzgrus Bedeckung [%]	30	50	80	0	80	40	10	90	10	90	95	25	90	60
Sandstein Bedeckung [%]	20	30	0	90	0	0	0	0	80	5	0	0	0	0
Neigung [%]	0	8	4	0	6	0	0	0	0	0	2	0	1	1

3.4 Populationsgröße der Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Im Gelände wurden die Populationsgrößen durch Auszählen von Individuen in zufällig im Bestand verteilten Quadraten erhoben. Dabei wurden 5 Quadrate á 1 m² pro Population ausgezählt. In einigen Quadraten wuchsen keine Individuen von *G. nuciforme*, die höchste Zahl wurde mit 80 Individuen in Population G8 auf Probequadrat 2, die zweitgrößte Dichte wurde in Population G6 auf Quadrat 4 mit 43 Individuen gezählt (Tabelle 3-4). Den höchsten Mittelwert von Individuen pro Quadrat weist Population G6 mit 26 Individuen, den niedrigsten Mittelwert weist Population G13 mit einem Individuum pro Quadrat auf. Zusätzlich wurde die Gesamtzahl der Individuen geschätzt (vgl. Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Dichte der Pflanzen von *G. nuciforme*, angegeben in Anzahl von Individuen, in jeweils fünf Probeflächen á 1m² pro Population sowie geschätzte Anzahl aller Individuen der Population

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
Fläche 1	4	15	0	7	4	1	1	14	6	8	3	0	2	4	0
Fläche 2	3	1	0	8	2	26	6	80	9	1	23	32	0	4	0
Fläche 3	0	16	1	12	0	35	0	4	0	0	0	19	3	1	0
Fläche 4	4	12	4	15	6	43	4	0	0	22	0	1	0	2	8
Fläche 5	0	9	2	2	3	23	0	1	1	1	0	9	0	0	2
Mittelwert Ind /m²	2	11	1	9	3	26	2	20	3	6	5	12	1	2	2
geschätzte Zahl der Individuen	150	150	150	>1000	400	>1000	50	500	50	250	250	>1000	250	500	250

Um das räumliche Areal der Population abzuschätzen, wurden die maximale Länge und Breite der Fläche, die eine Population bedeckte, erfasst (Tabelle 3-5). Da die Flächen sich über unterschiedlich geformte Areale erstrecken, ist eine direkte Umrechnung von Länge und Breite in

die Quadratmeter, die von der Population bedeckt wurden, nicht möglich. Für die Diskussion wurde das Produkt aus Länge mal Breite in m² jedoch eingesetzt.

Tabelle 3-5: Länge und Breite der Populationsflächen von *G. nuciforme*

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
Länge in m	25	12	60	190	40	25	11,5	22	5	10	30	130	250	350	120
Breite in m	11	2	5	75	20	16	7	3	3	10	25	50	20	330	30

Die Aufnahmen zur Populationsgröße in Bezug auf Anzahl und Dichte der Pflanzen sowie die Flächenmaße dienen als Datengrundlage für den Vergleich von genetischer Variabilität und Größe der Population. Ein Zusammenhang zwischen mittlerer genetischer Distanz der Individuen einer Population und den erhobenen Zahlen zur Populationsgröße wird anhand der nachfolgend dargestellten Diagramme dargestellt.

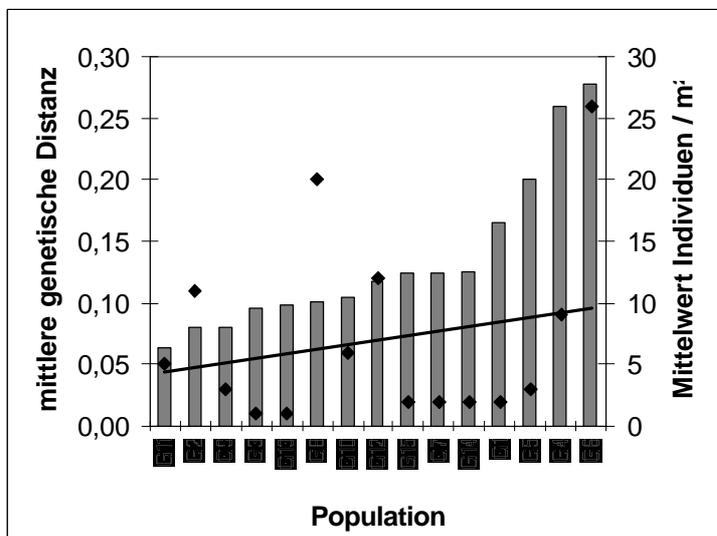


Abbildung 3-2: Mittlere paarweise genetische Distanz je Population (graue Säulen), dazu Mittelwert der Anzahl der Individuen pro m² für jede Population (schwarze Rauten), mit Trendlinie (schwarz) aufgetragen

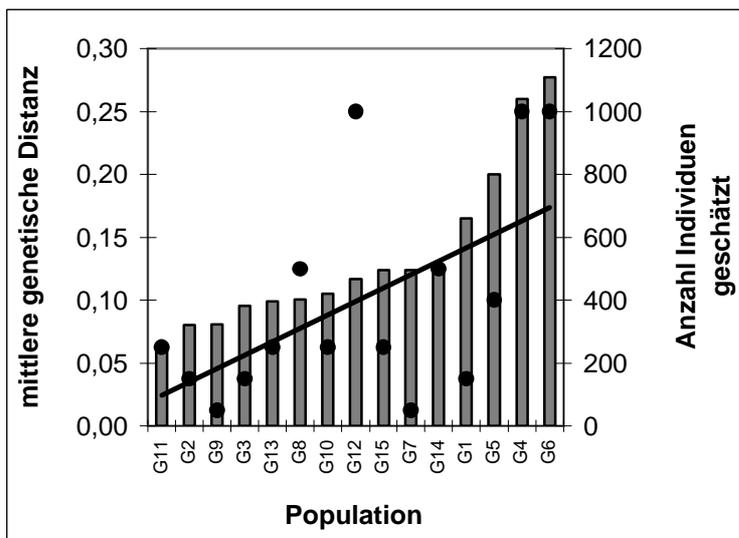


Abbildung 3-3: Mittlere paarweise genetische Distanz je Population (graue Säulen), dazu geschätzte Zahl der Individuen je Population (schwarze Kreise) mit Trendlinie (schwarz) aufgetragen

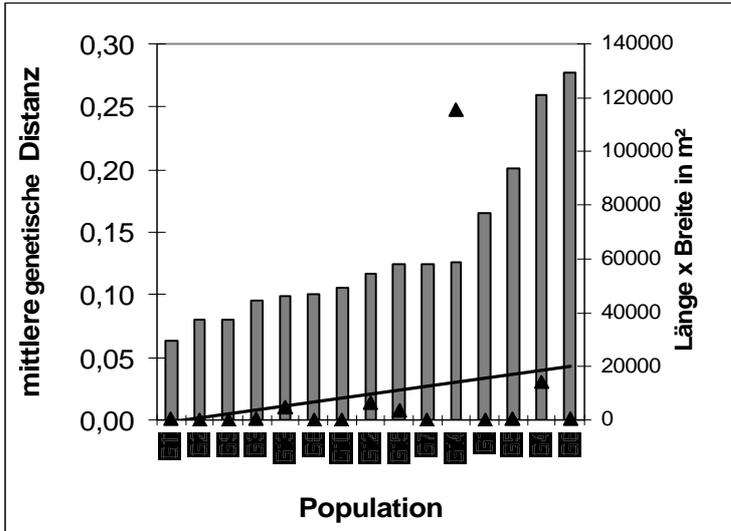


Abbildung 3-4: Mittlere paarweise genetische Distanz je Population (graue Säulen), dazu Produkt aus den Zahlen für Länge und Breite der Fläche für das räumliche Areal (schwarze Dreiecke) je Population, mit Trendlinie (schwarz)

3.5 Messungen an Pflanzen und Blattpaaren von *Gibbaeum nuciforme*

Es wurden verschiedenen Merkmale an Pflanzen von *G. nuciforme* im Feld erhoben, anhand derer geprüft wurde, ob es Merkmale gibt, die eine Strukturierung der Individuen nach Populationen oder Gruppen aufweisen. Die Ergebnisse der Messungen werden in einer Tabelle im Anhang dargestellt (Tabelle 9-2). Die statistische Auswertung zu skalierten Merkmalen wird in Tabelle 3-6 vorgestellt. Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung geprüft. Bei vorliegender Normalverteilung wurde mittels einfaktorieller ANOVA geprüft, inwieweit die Zugehörigkeit eines Individuums zu einer bestimmten Population einen signifikanten Einfluss auf das untersuchte Merkmal hat. Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein nichtparametrischer Rangkorrelationstest, der Kruskal-Wallis-Test, auf die Daten angewendet. Hier wird getestet, ob sich die mittleren Ränge der Population signifikant voneinander unterscheiden. Mit einer Diskriminanzanalyse wurde die Güte der Klassifikation, hier die Zuordnung der Individuen zu Populationen, geprüft und der prozentuale Anteil der richtig zugeordneten Fälle angegeben.

Tabelle 3-6: Ergebnisse der statistischen Auswertung für verschiedene skalierte Merkmale in den Populationen von *G. nuciforme*

Parameter	Werte von bis	n	Mittelwert	Standardabweichung	Kolmogorov-Smirnov Anpassungs-test auf Normalverteilung, p =	Kruskal-Wallis-Test, p =	Einfaktorielle ANOVA	Diskriminanzanalyse, % richtige Zuordnung zur Herkunftspopulation
Höhe Blätter über Boden	0,5 -25 mm	147	8,2 mm	4,51 mm	0,006	0,001	-	18,4
Anzahl Blattpaare je Individuum	2-327 Individuen	147	20,00	30,51	< 0,001	0,004	-	8,8
Breite eines Blattpaares	10-32 mm	147	18,18 mm	4,19 mm	0,057	0,113	F = 1,43 p = 0,147	6,8
Durchmesser der Individuen	23 - 950 mm	130	88,95 mm	87,3 mm	< 0,001	0,012	-	13,2
Länge langes Blatt	5-17 mm	147	10,03 mm	2,41 mm	0,027	0,261	-	12,2
Länge kurzes Blatt	4-13 mm	146	7,43 mm	1,98 mm	0,001	0,102	-	11
Länge des Blattspaltes	3-17 mm	147	7,8 mm	2,54 mm	0,001	0,131	-	9,5
Tiefe des Blattspaltes	0-6 mm	141	1,94 mm	1,1 mm	< 0,001	0,106	-	13,5

Die unterschiedliche Anzahl (n) der untersuchten Individuen pro Merkmal resultiert daraus, dass bei einigen Individuen aufgrund der Gegebenheiten nicht alle Messungen durchgeführt werden konnten. So waren einige Individuen angefressen und somit z. B. keine Messungen der Blattlänge möglich. Daher schwanken die Angaben für n von 123 bis 147 (alle Individuen). In

den Populationen wurden in der Regel jeweils zehn Individuen untersucht, lediglich in Population 7 wurden nur sieben Individuen untersucht.

In den anschließenden Abschnitten werden einige Ergebnisse ausführlicher vorgestellt und zudem die Ergebnisse der Fruchtzählungen und der erhobenen 0/1 Merkmale dargestellt.

3.5.1 Anzahl Früchte

Für jede untersuchte Pflanze wurde die Zahl der alten und jungen Fruchtkapseln erfasst. Die Anzahl der Früchte wird pro Population für zumeist 10 Individuen dargestellt (Abbildung 3-5). Die höchsten Zahlen wurden für Population G10 mit 149 Fruchtkapseln und Population G5 mit 118 Fruchtkapseln festgestellt. Die niedrigsten Zahlen wurden in Population G7 mit 17 Fruchtkapseln (hier wurden nur sieben Individuen untersucht) und Population G6 mit 20 Fruchtkapseln erhoben. Zudem wird in Abbildung 3-6 der Anteil von fruchtenden Pflanzen pro 10 Individuen einer Population dargestellt (mit der Ausnahme bei Population 7 mit nur 7 untersuchten Individuen) In jeder Population werden Früchte ausgebildet, zwischen 50 und 90 % der untersuchten Individuen einer Population wiesen Früchte auf. Insgesamt fruchteten 75 % der untersuchten Individuen.

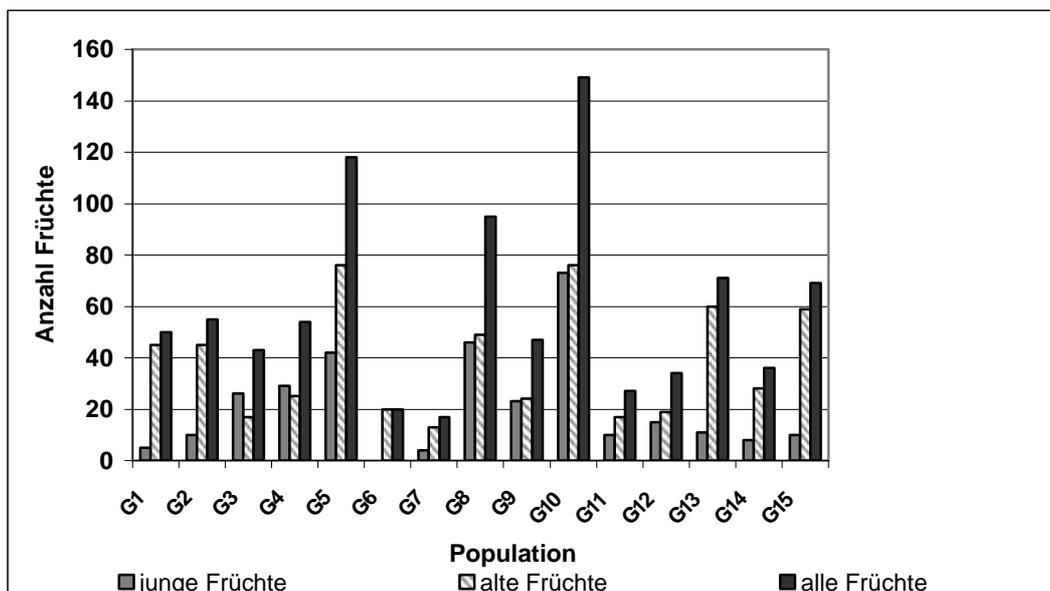


Abbildung 3-5: Säulendiagramm, Summe der Früchte pro 10 Individuen einer Population (in Population 7 wurden nur 7 Individuen ausgewertet)

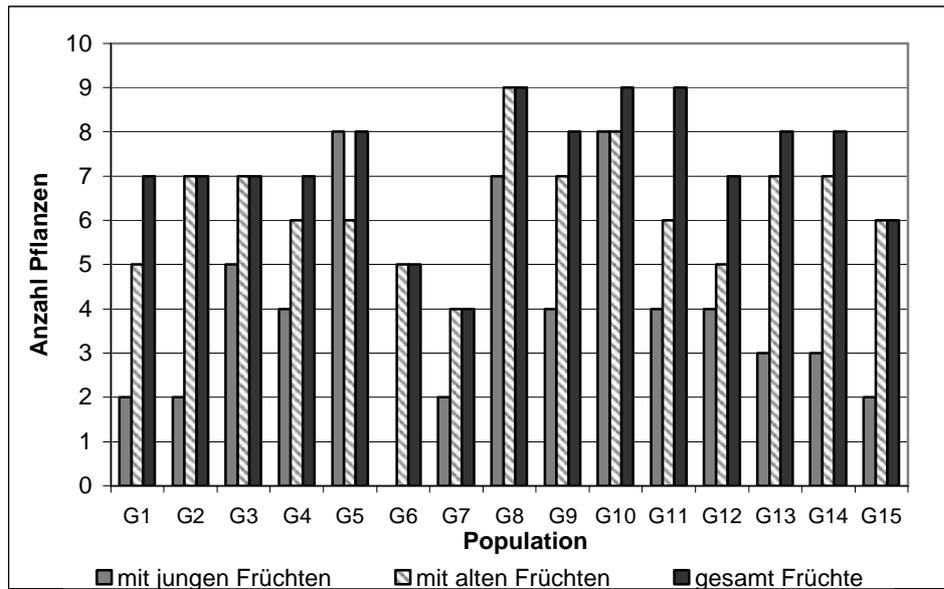


Abbildung 3-6: Fruchtende Pflanzen nach Populationen (10 untersuchte Individuen je Population, in Population 7 wurden 7 Individuen untersucht)

Für das Viertel der Individuen, bei dem keine Früchte vorhanden waren, können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob es hier nicht zur Fruchtentwicklung kam, oder ob die Früchte durch äußere Einwirkungen nicht mehr vorhanden sind.

3.5.2 Höhe der Blätter über dem Boden

Die gemessenen Höhen der Blätter über dem Boden reichten von 0,5 mm bis 25 mm, $n = 147$, Mittelwert 8,2 mm, Standardabweichung 4,51 mm. Eine Normalverteilung der Daten lag nicht vor, der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest ergab $p = 0,006$ (signifikant). Dies bedeutet, dass die Nullhypothese (H_0 : die Daten weichen nicht von der Normalverteilung ab) abgelehnt wird. Im untersuchten Fall wichen die Daten signifikant von denen der Normalverteilung ab. Nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Test weisen die Abweichungen der Mittleren Ränge ein Signifikanzniveau von $p = 0,001$ (hoch signifikant) auf. Das bedeutet, dass die mittleren Ränge der Populationen signifikant voneinander verschieden sind; der Test gibt aber keinen Hinweis darauf, bei welchen Populationen dies der Fall ist.

Die Darstellung als ‚Box and Whisker Plots‘ in Abbildung 3-7 zeigt die gemessenen Werte. Die Blatthöhen wurden nach Population (G1 bis G15) aufgetragen. Zwischen den Populationen schwankt der Median der Blatt-Höhen zwischen 2,5 mm in der Population bei Middelpass (G11) und 11 mm in der Population bei Varsbokkral, südlich von Laingsburg (G5). Die einzelnen Populationen zeigen unterschiedliche Schwankungsbreiten. Einige Populationen, wie G1 (mit 23 mm Schwankungsbreite) und G5 (15 mm) zeigen ein breites Spektrum, andere, wie G9 (6,5 mm) G10 (7 mm) und G13 (8 mm) zeigen geringe Schwankungen.

Eine Diskriminanzanalyse, mit der die Güte der Zuordnung zu Populationen geprüft wird, ergab, dass 18,4 % der Fälle richtig klassifiziert wurden. Eine rein zufällige Zuordnung zu den

Populationen hätte 6,6 % richtig klassifizierte Fälle ergeben. Über diesen Parameter können die Individuen somit nicht zuverlässig ihren Herkunftspopulationen zugeordnet werden.

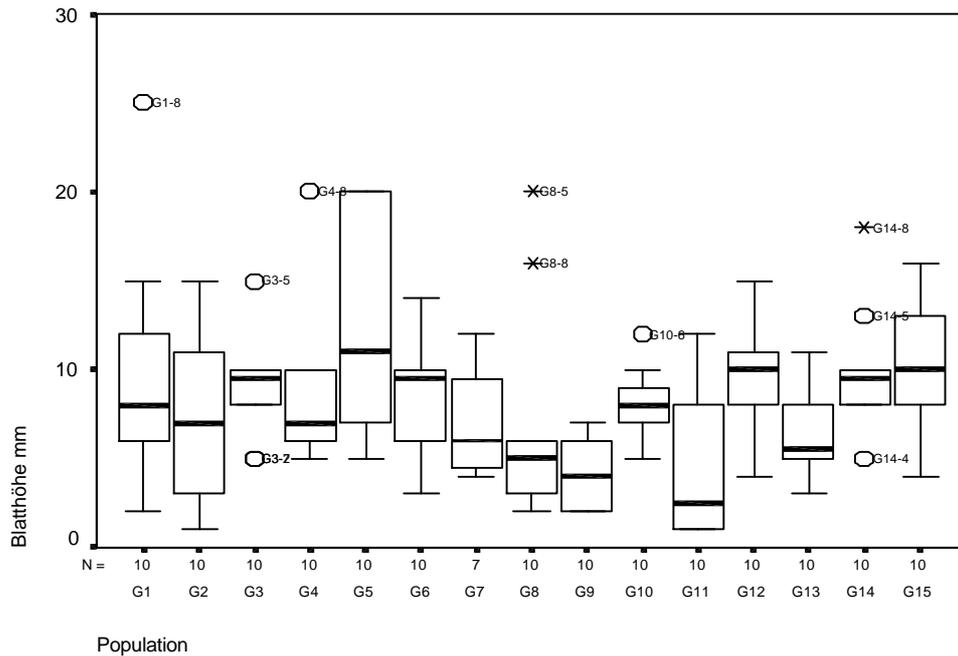


Abbildung 3-7: Box and Whisker Plot der Blatthöhen über dem Boden für Populationen G1 bis G15, schwarzer Balken = Median, Whisker: größter Wert der gerade kein Ausreißer ist, O = Ausreißer nt), * = Extremwert

3.5.3 Blattform

Es wurde erfasst, ob die Blätter oberseits abgeflacht oder abgerundet waren. Dies wurde nicht skaliert, sondern mit vorhanden oder nicht vorhanden als 0/1 Merkmal erfasst (n = 147). Die Ergebnisse sind in Säulendiagrammen für die untersuchten Individuen nach Populationen aufgetragen. Abgeflachte Blattoberflächen wurden in vier der 15 untersuchten Populationen beobachtet, und zwar an insgesamt neun Individuen. In einer Population (G7) sind die Individuen mit abgeflachten Blattspitzen häufiger als die mit runden Blattspitzen (Abbildung 3-8).

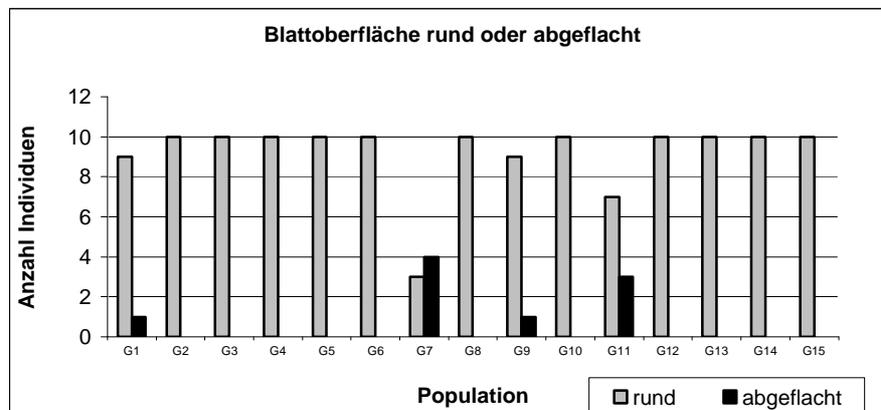


Abbildung 3-8: Säulendiagramm mit Angaben, ob Blattspitzen der Blätter rund oder abgeflacht sind, nach Populationen getrennt

3.5.4 Transparenter Bereich in Blattspitze

Hierfür wurde an 141 Individuen der Merkmalszustand erhoben. Das Merkmal wurde als vorhanden oder nicht vorhanden (0/1 Merkmal) erfasst. Die Ergebnisse sind als Säulendiagramm für die untersuchten Individuen nach Populationen aufgetragen (Abbildung 3-9).

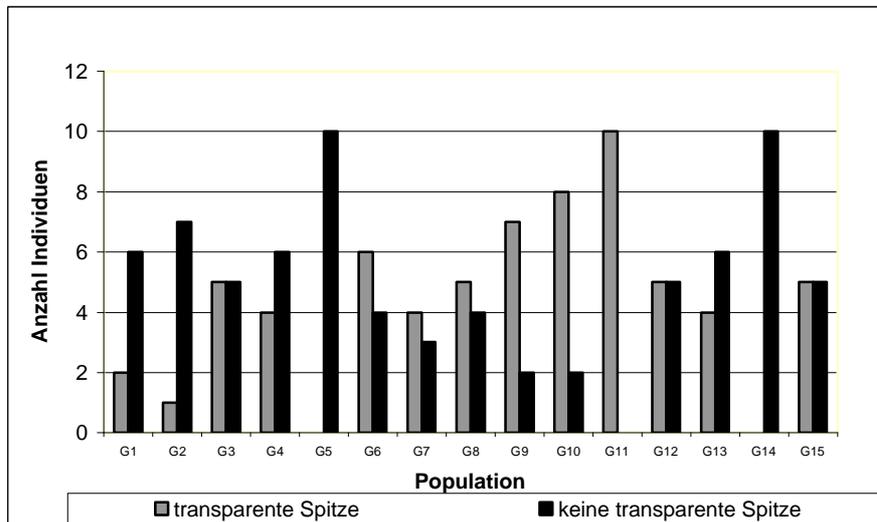


Abbildung 3-9: Auftreten von transparentem Bereich in der Blattspitzen nach Populationen getrennt

In den meisten Populationen wurden beide Merkmalsausprägungen beobachtet. In einer Population (G11) wiesen sämtliche untersuchten Individuen transparente Bereiche in den Blattspitzen auf und in zwei Populationen (G5 und G14) wurden bei sämtlichen untersuchten Individuen keine transparenten Bereiche festgestellt. In den Populationen G6 bis G11 überwiegen die Individuen mit transparenten Bereichen in den Blattspitzen, in den anderen Populationen ist das Verhältnis gleich, oder es überwiegen die nicht transparenten Spitzen.

3.5.5 Behaarung der Blätter

Es wurden 147 Individuen berücksichtigt. In fünf Populationen (G1, G2, G10, G12, G15) wurden durchgehend unbehaarte Individuen festgestellt, hingegen nur für zwei Populationen (G8, G14) durchweg behaarte Individuen. In acht Populationen gibt es behaarte und unbehaarte Individuen nebeneinander. In zehn Populationen dominiert der Anteil der unbehaarten Individuen (Abbildung 3-10).

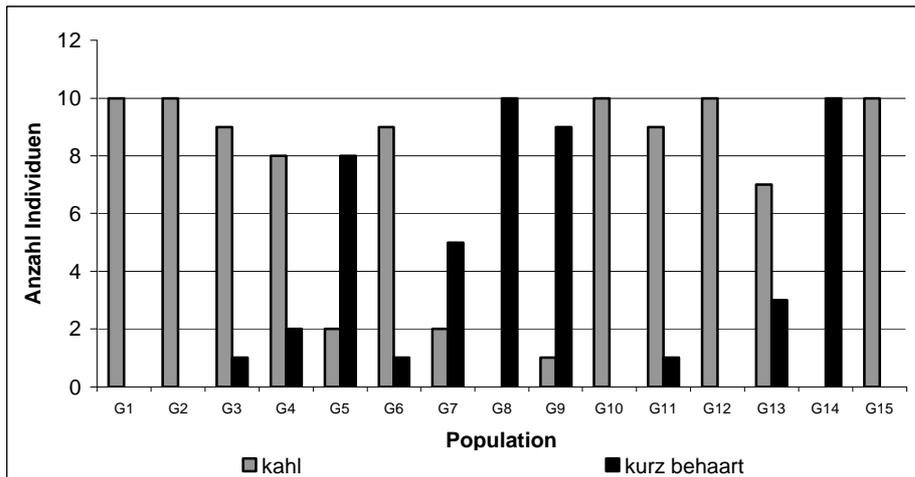


Abbildung 3-10: Behaarung der Blätter nach Populationen getrennt

Eine Diskriminanzanalyse über das Vorhandensein oder Fehlen der Behaarung der Blätter ergab 13,6 % richtig zugeordnete Fälle.

Diskriminanzanalyse für die Zuordnung zu Populationen mit den Daten für Transparenz und Behaarung ergibt 22,7% richtig zugeordnete Fälle. Über diese Parameter können die Individuen somit nicht ihren Herkunftspopulationen zugeordnet werden.

Zusammenfassung der Messungen

Die Daten für das Merkmal Breite des Blattpaares sind normalverteilt, alle anderen Merkmale weisen für die untersuchten Merkmale keine Normalverteilung auf. Der Kruskal-Wallis-Test ergab signifikante Unterschiede der Mittleren Ränge für die drei Merkmale: Höhe des Blattpaares, Anzahl der Blattpaare und Durchmesser der Individuen. Die Ergebnisse der Messungen ergaben in einer gemeinsamen Diskriminanzanalyse über die 15 Populationen ($n = 124$) 39,5 % korrekt klassifizierte Fälle. Eine Diskriminanzanalyse für die Zuordnung zu den Populationen mit den oben genannten gemessenen Merkmalen und den drei 0/1 Merkmalen führt zu 51,2 % korrekt klassifizierten Fällen ($n = 123$).

Eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) für zehn Merkmale (Anzahl Blattpaare, Abflachung, Transparenz, Breite, Höhe, Behaarung, Länge langes Blatt, Länge kurzes Blatt, Spaltlänge und Spalttiefe) zeigt eine Punktwolke mit Überschneidungen der Individuen aus den 15 Populationen (Abbildung 3-11).

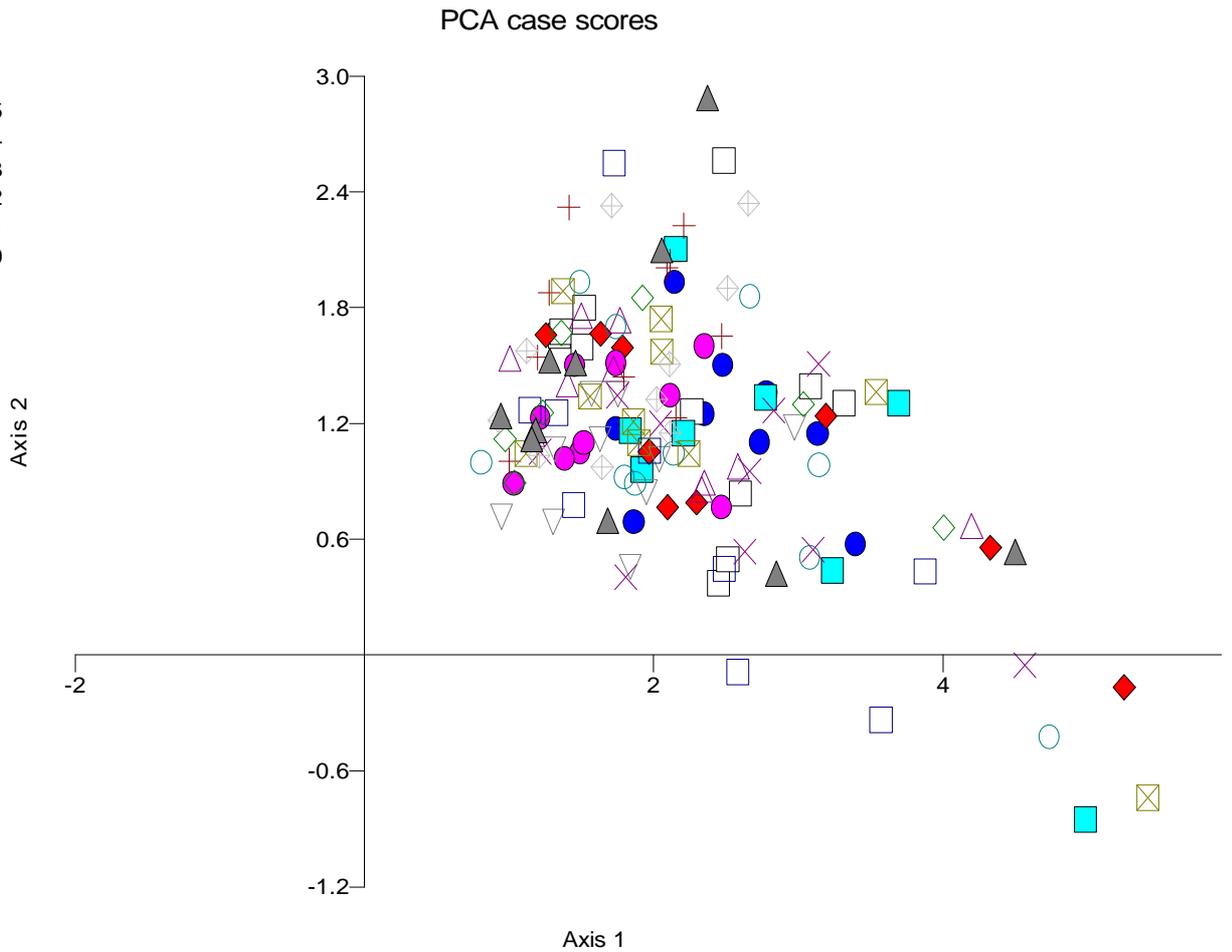


Abbildung 3-11: PCA der Messergebnisse an Individuen von *G. nuciforme*. Die Individuen sind nach Populationszugehörigkeit mit Symbolen versehen. Der Übersichtlichkeit halber sind einige Individuen unten rechts nicht mehr dargestellt

3.6 Überprüfung von Ost-West-Gruppierung anhand der Merkmale der Individuen

Aufgrund der AFLP-Untersuchungsergebnisse werden die Populationen zwei Populationsgruppen zugeordnet, einer Ost-Gruppe und einer West-Gruppe (siehe Abschnitt 3.8.2). Die Messergebnisse der Einzelindividuen wurden auf ihre Aussagekraft für die Zuordnung der Individuen zu diesen beiden Gruppen überprüft. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde geprüft, ob es signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Rängen der beiden Gruppen gibt. Mit einer Diskriminanzanalyse wurde die Zuordnung der Individuen zu den beiden Gruppen überprüft. Die Ergebnisse dieser Berechnungen für die skalierten Merkmale sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tabelle 3-7: Ergebnisse der statistischen Auswertung für skalierte Merkmale der Populationen von *G. nuciforme* nach West- und Ost-Gruppe unterteilt. Für die Anschaulichkeit wurden die Mittelwerte der Gruppen angegeben (der Mann-Whitney-U-Test bezieht sich jedoch auf die mittleren Ränge)

Parameter	Mittelwert West-Gruppe	Mittelwert Ost-Gruppe	Mann-Whitney U Test, p =	n West-Gruppe	n Ost-Gruppe	Diskriminanzanalyse, % richtige Zuordnung zur Populationsgruppe
Höhe Blätter über Boden	9,12 mm	6,43 mm	< 0,001	90	57	68,3
Anzahl Blattpaare je Individuum	22,52	16,19	0,187	90	57	61,2
Breite eines Blattpaares	19,01 mm	16,88 mm	0,005	90	57	61,9
Durchmesser der Individuen	104,38 mm	69,18 mm	0,001	73	57	57,7
Länge langes Blatt	10,49 mm	9,30 mm	0,004	90	57	62,6
Länge kurzes Blatt	7,89 mm	6,72 mm	0,001	89	57	67,8
Länge des Blattspaltes	7,99 mm	7,49 mm	0,129	90	57	61,2
Tiefe des Blattspaltes	2,01 mm	1,83 mm	0,65	85	56	60,3

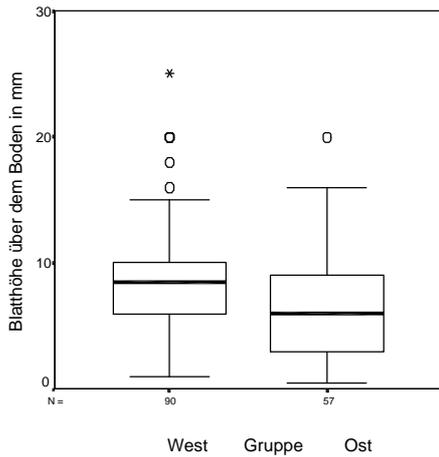


Abbildung 3-12: Blatthöhen über dem Boden, Populationen nach Ost und West Gruppe zusammengefasst

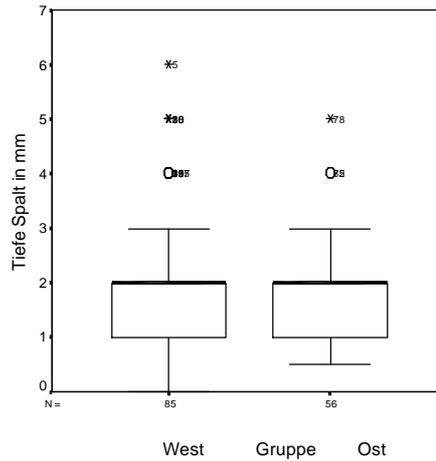


Abbildung 3-13: Tiefe des Spaltes im Blattpaar, nach Ost- und West-Gruppe zusammengefasst

Die Höhen der Blätter über dem Boden weisen zwischen den Populationsgruppen West und Ost signifikante Unterschiede der mittleren Ränge auf. Die Streuung der Werte ist zwischen den Gruppen sehr ähnlich, jedoch liegen Median und Mittelwert in der West-Gruppe deutlich höher als in der Ost-Gruppe (Abbildung 3-12, Tabelle 3-7). Hingegen weisen die Daten für die Tiefe des Spaltes eines Blattpaares nahezu identische Werte auf (Abbildung 3-13).

Früchte

In beiden Populationsgruppen wurden mehr alte Früchte als junge Früchte an den Pflanzen festgestellt. In der Westgruppe überwiegt der Anteil der alten Früchte stärker, in der Ostgruppe überwiegt dieser Anteil mit 56% nur leicht (Abbildung 3-14).

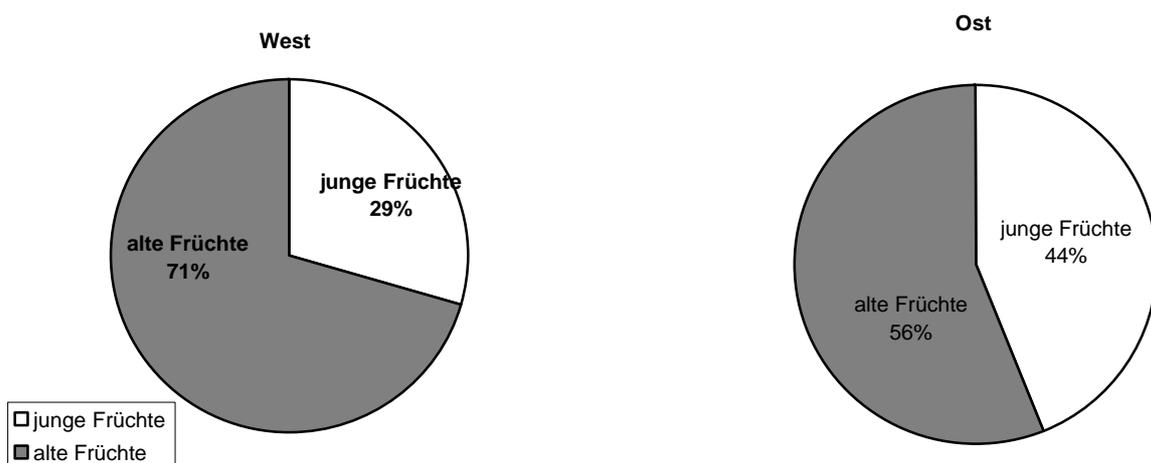


Abbildung 3-14: Verhältnis von jungen und alten Früchten in den Populationsgruppen Ost und West in Prozent angegeben

Behaarung der Blätter

Behaarte und unbehaarte Individuen kommen in beiden Populationsgruppen vor. In der West-Gruppe dominieren die kahlen Individuen deutlich, in der Ost-Gruppe nur leicht (Abbildung 3-15). Ein Chi²-Test (Vierfeldertest) ergab mit $\text{Chi}^2 = 5,53$ bei einem Freiheitsgrad von 1 mit $p = 0,02$ einen schwach signifikanten Unterschied. Für das Merkmal Behaarung ergibt die Diskriminanzanalyse 61,9 % richtig zugeordnete Fälle.

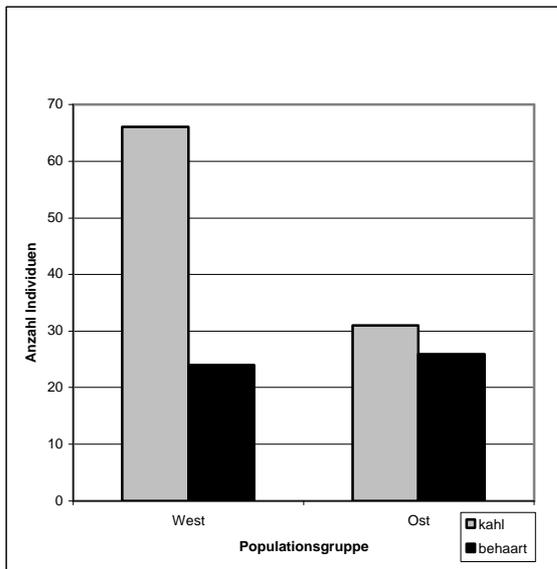


Abbildung 3-15: Säulendiagramm zur Merkmalsverteilung Behaarung in den Populationsgruppen West und Ost

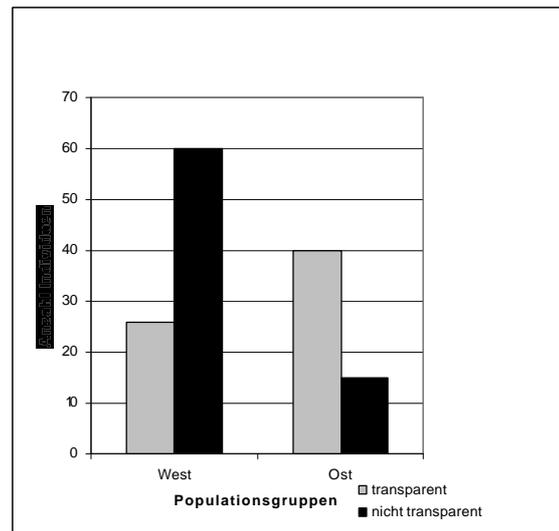


Abbildung 3-16: Säulendiagramm zur Merkmalsverteilung transparente Blattspitzen in den Populationsgruppen West und Ost

Transparente Bereiche in den Blattspitzen

Die Häufigkeit der Ausprägung von transparenten Bereichen in der Blattspitzen ist in den beiden Populationsgruppen unterschiedlich vertreten. In der West-Gruppe überwiegen die Individuen mit undurchsichtiger Blattspitze, in der Ost-Gruppe hingegen dominieren Individuen mit transparenten Bereichen in der Blattspitze (Abbildung 3-16). Ein Chi²-Test (Vierfeldertest) ergab für diese Daten $\text{Chi}^2 = 24,28$, was bei einem Freiheitsgrad von 1 einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Gruppen bedeutet.

Eine Diskriminanzanalyse für dieses Merkmal ergibt eine richtige Zuordnung der Individuen zu den Populationsgruppen von 70,9 %. Bei einer gemeinsamen Diskriminanzanalyse der Parameter Transparenz und Behaarung werden ebenfalls 70,9 % der Fälle richtig klassifiziert.

3.6.1 Zusammenfassung für die Überprüfung der Ost- und der West-Gruppe mit Feld-Merkmalen

Die Diskriminanzanalyse für die Zuordnung der Individuen zu einer West- (G1 - G5 und G12 - G15) und einer Ost- (G6 - G11) Gruppe ergab mit allen Merkmalen eine richtige Klassifizierung für 78,9 % der Fälle. Demnach können fast 4/5 der Individuen über die Feldmerkmale der

vorhergesagten Populationsgruppe richtig zugeordnet werden. Den größten Anteil an der richtigen Zuordnung hat das Merkmal „transparenter Bereich“ in der Blattspitze. Weitere Merkmale, die zwischen den beiden Gruppen signifikante Unterschiede der Mittleren Ränge (Mann-Whitney-U-Test) aufweisen, sind die Höhe der Blätter über dem Boden, zudem Durchmesser der Individuen und die Maße der Blätter (langes Blatt, kurzes Blatt, Blattpaar).

3.7 Blühende Pflanzen von *Gibbaeum nuciforme* im Gewächshaus

Im Gewächshaus des Botanischen Gartens in Hamburg wurden im Zeitraum Dezember 2006 bis März 2007 einmal wöchentlich die blühenden Individuen von *G. nuciforme* erfasst. Dies wurde vor dem Hintergrund der Ergebnisse der AFLP-Untersuchungen (3.8.2) unternommen. Die Frage dabei war, ob Unterschiede in der Blühabfolge von Individuen aus den beiden geografischen Gruppen (West bzw. Ost) im Gewächshaus feststellbar sind.

Tabelle 3-8: Anzahl der Blüten pro Individuum (grau hinterlegt) von *G. nuciforme* im Gewächshaus des Botanischen Gartens Universität Hamburg. Sammelnummern beziehen sich auf die Datenbank der Arbeitsgruppe Jürgens an der Universität Hamburg, pro Sammelnummer kann es mehrere Individuen geben. ? steht für die Zuordnung einer Herkunft zur einer Populationsgruppe, die nicht aufgrund der AFLP-Ergebnisse erfolgte

Sammel-nr.	14. 12. 06	22. 12. 06	05. 01. 07	11. 01. 07	17. 01. 07	23. 01. 07	01. 02. 07	08. 02. 07	14. 02. 07	21. 02. 07	28. 02. 07	07. 03. 07	15. 03. 07	Populationsgruppe	Lokalität
94204	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	West	Eyerpoort
13896	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost	bei Hondewater
13896	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost	bei Hondewater
13896	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost	bei Hondewater
102093	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost?	SW Middleplaas
110140	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Ost	Brandrivier
102093	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost?	SW Middleplaas
110140	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost	Brandrivier
109880	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost	Warmwaterberg
109880	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost	Warmwaterberg
104703	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Ost	Ockertskraal
102093	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	Ost?	SW Middleplaas
104703	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	Ost	Ockertskraal
110178	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	Ost?	Jerusalem
94205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	West	Eyerpoort

Die Zuordnung zu Populationsgruppen erfolgte aufgrund der AFLP-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. In der Arbeit nicht beprobte Herkünfte wurden aufgrund der geografischen Lage zu den untersuchten Populationen zugeordnet und in der Zuordnung in der Tabelle mit einem Fragezeichen hinter der Gruppenzuordnung versehen. Es blühten insgesamt 15 Individuen aus 9 verschiedenen Herkünften, weitere 34 Individuen wiesen im Beobachtungszeitraum keine Blüten auf. In Tabelle 3-8 sind nur Individuen aufgeführt, die im Beobachtungszeitraum Blüten aufwiesen.

Von den Herkünften aus der West-Gruppe wiesen zwei Individuen im Beobachtungszeitraum Blüten auf. Eine Pflanze blühte zum Beginn, die zweite am Ende des Zeitraumes. Alle anderen Individuen, die Blüten aufwiesen, werden der Ost-Populationsgruppe zugerechnet. Einen

Zusammenhang zwischen dem Blütezeitpunkt im Gewächshaus und der Herkunftspopulation der Individuen kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht hergestellt werden.

3.8 Molekulare Untersuchungen

3.8.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Lagerung von Blattmaterial zur DNA-Gewinnung

Aus Blattmaterial, welches bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert wurde (Tabelle 3-9), wurde DNA isoliert und diese auf einem Agarosegel aufgetragen und ausgewertet.

Tabelle 3-9: Lagerungsweise und Ergebnisse der DNA Isolierung aus Vorversuchen zur Lagerung von Blattmaterial mit relativer Abschätzung der DNA Ausbeute

Nummer	Art	Lagerung für 4 Wochen in	geschätzte DNA Ausbeute
1	<i>Cheiridopsis robusta</i>	Plastiktüte	viel
2	<i>Gibbaeum heathii</i>	Plastiktüte	viel
3	<i>Gibbaeum pubescens</i>	Plastiktüte	viel
4	<i>Gibbaeum shandii</i>	Plastiktüte	viel
5	<i>Cheiridopsis robusta</i>	Papiertüte	viel
6	<i>Gibbaeum heathii</i>	Papiertüte	viel
7	<i>Gibbaeum pubescens</i>	Papiertüte	viel
8	<i>Gibbaeum shandii</i>	Papiertüte	wenig
9	<i>Gibbaeum pubescens</i>	in Scheiben geschnitten in Papiertüte	fast keine
10	<i>Cheiridopsis robusta</i>	Silikagel	viel
11	<i>Gibbaeum heathii</i>	Silikagel	wenig
12	<i>Gibbaeum shandii</i>	Silikagel	wenig
13	<i>Gibbaeum pubescens</i>	Silikagel	wenig
14	<i>Gibbaeum shandii</i>	Stücke auf Silikagel	keine
15	<i>Gibbaeum heathii</i>	Stücke in RNAlater Puffer	keine
16	<i>Gibbaeum pubescens</i>	Stücke in RNAlater Puffer	wenig
17	<i>Gibbaeum heathii</i>	-20 °C	viel
18	<i>Gibbaeum heathii</i>	-20 °C	viel

Die DNA-Menge wurde im Vergleich mit den anderen Proben und mit dem Standard abgeschätzt.

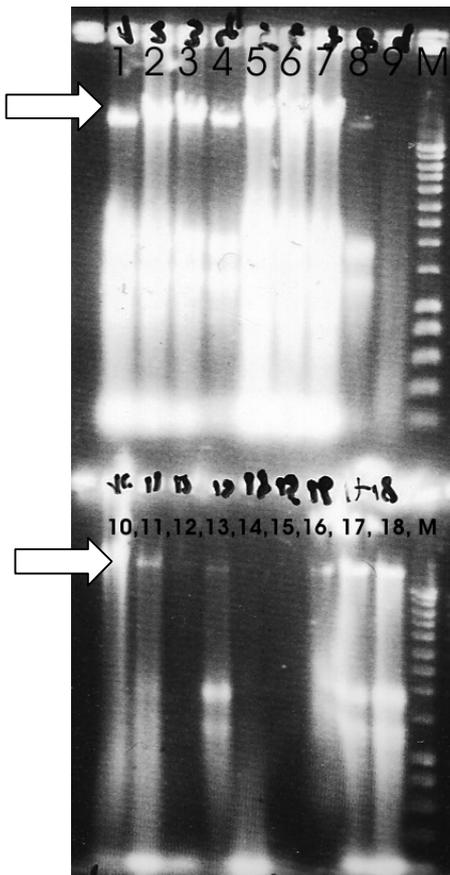


Abbildung 3-17: DNA aus unterschiedlich gelagertem Blattmaterial, Agarose Gel (0,8 %) mit Ethidiumbromid eingefärbt, Pfeile deuten auf die Banden mit hochmolekularer DNA, oberer Bereich von links nach rechts: frei, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und M (M: Längenstandard Smartladder von Eurogentec), unterer Bereich von links nach rechts: frei, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 und M (s.o.), die Zahlen in der Abbildung beziehen sich auf die Zahlen in Tabelle 3-9. Neben der hochmolekularen DNA ist auch noch RNA erkennbar, da kein RNA-Verdau durchgeführt wurde

Die Lagerung der Blätter in Plastiktüten führt nach vierwöchiger Lagerung zu einer hohen DNA-Ausbeute. Bei Lagerung in Plastiktüten besteht jedoch die Gefahr der Verpilzung; in diesem Fall wurden nach zwei Wochen Lagerung die stärksten Verpilzungen manuell entfernt. Durch den Pilzbefall kann es zur Kontamination der DNA mit Pilz-DNA kommen, daher ist diese Lagerungsmethode nicht geeignet. Die Lagerung auf Silikagel und in RNAlater-Puffer führte zu einer geringen DNA-Ausbeute (Abbildung 3-17). Zur Anwendung kam die Lagerung in Papiertüten, da sie zu einer hohen Ausbeute an DNA führte. Die Lagerung in Papiertüten ist zudem sehr einfach umzusetzen, jedoch ist sie, auch bei sukkulenten Blättern, nur zeitlich begrenzt sinnvoll. Bei Lagerungsdauern von mehreren Monaten ist die Lagerung auf Silikagel vorzuziehen, wenn nicht tiefgefroren werden kann.

3.8.2 Ergebnisse der molekularen Populationsuntersuchungen

3.8.2.1 Ergebnisse der Chloroplasten PCR Restriktion,

Es wurden 16 verschiedene Primerkombinationen mit universellen Chloroplastenprimern (Tabelle 2-4) für je ein Individuum pro Population eingesetzt. Annealingtemperaturen wurden

mittels Gradienten-PCR optimiert. Fünf Primerkombinationen führten zur erfolgreichen Amplifikation von PCR-Produkten innerhalb der Art *G. nuciforme* (Tabelle 3-10).

Zum Testen der Primer wurde jeweils ein Individuum (jeweils Individuum Nummer 3) pro Population eingesetzt. Population 2 wurde hierbei nicht berücksichtigt, um mit einem möglichst übersichtlichen Probensatz zu arbeiten. Jedes Individuum wird in dieser Untersuchung mit der Ziffer seiner Population benannt.

Tabelle 3-10: Erfolgreich eingesetzte Primerkombinationen für Chloroplasten PCR bei *G. nuciforme*, mit Angabe der geschätzten Länge der amplifizierten Bande in Basenpaaren, Erläuterung der Primerkombinationen in Tabelle 2-4

Primerkombination	E	G	J	K	Pk3
~ Länge in bp	1.000	1.500	600	800	3.000

Die Dokumentation der PCR-Ergebnisse anhand von Fotos der gefärbten Agarosegele für die Primerkombinationen E, G, J und PK3 finden sich im Anhang (Abbildung 9-1).

Der Einsatz einiger DNA-Proben führte nicht in allen PCRs zu der Amplifikation eines Produktes. Die Wiederholungen der PRC-Reaktionen führten teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. In den meisten Fällen waren die PCR-Ergebnisse reproduzierbar, zum Teil ergab die Wiederholung PCR-Produkte, wo die erste PCR_Reaktion zu keinem PCR-Produkt geführt hatte. Eine Übersicht über die Amplifikation von PCR-Fragmenten mit den verschiedenen Primern gibt Tabelle 3-11. Die Untersuchung zielte auf die Frage, ob Polymorphismen in den Restriktionsergebnissen auftreten, daher wurde eine methodisch-technische Überprüfung der PCR-Ausfälle an dieser Stelle nicht intensiviert.

Tabelle 3-11: Übersicht über die Ergebnisse der PCR Amplifikation mit Individuen der Populationen 1 und 3 bis 15, 1 = PCR Produkt vorhanden, - = kein PCR-Produkt

Individuum aus Population:	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Primerkombination E	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1
Primerkombination G	1	1	1	1	1	-	-	1	1	-	1	1	1	1
Primerkombination J	1	1	1	1	1	-	-	-	1	-	1	1	-	1
Primerkombination K	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Primerkombination PK3	1	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	1	1

Restriktion: Die PCR-Produkte wurden mit bis zu vier verschiedenen Restriktionsenzymen in bis zu 6 Banden geschnitten. Die meisten Schnittstellen erreichte das Enzym Alu in Kombination mit dem PCR-Produkt der Primerkombination E. Keine Ansatzstelle zum Schneiden fand das Enzym BsuR1 in dem Produkt der Primerkombination J und das Enzym Alu in dem Produkt der Primerkombination 3, daher blieb hier jeweils die Ausgangsbande erhalten. Abbildungen von Agarosegelen mit den elektrophoretisch aufgetrennten Ergebnissen der Restriktionen mit verschiedenen Enzymen finden sich im Anhang (Abbildung 9-2). Bei keiner der getesteten Restriktionen konnten Unterschiede zwischen den untersuchten Individuen gefunden werden. Die Ergebnisse werden unter Angabe der Anzahl der Restriktionsfragmente tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 3-12).

Tabelle 3-12: Ergebnisse der Restriktion von Chloroplasten PCR-Produkten mit verschiedenen Restriktionsenzymen, angegeben in Anzahl der Restriktionsfragmente pro Enzym, nu = diese Kombination wurde nicht untersucht

Primerkombination	~ Länge in bp	Restriktionsfragmente: Enzym Alu	Restriktionsfragmente: Enzym BsuR1	Restriktionsfragmente: Enzym TaqI	Restriktionsfragmente: Enzym RsaI
E	1.000	6	4	nu	nu
G	1.500	4	2	3	4
J	600	3	1	nu	3
K	800	nu	nu	nu	nu
Pk3	3.000	1	3	nu	nu

Für die Primerkombinationen G (psb C/ trnS) und Pk E (trn M-rbc L) wurde die Untersuchung auf zwei Individuen pro Population ausgeweitet. Auch hier konnten in den PCR-Produkten keine Längenunterschiede festgestellt werden.

Die durchgeführten Restriktionen der Chloroplasten PCR-Fragmente ergaben keine Unterschiede für die untersuchten Individuen der Populationen von *G. nuciforme*. Weitere Untersuchungen und Auswertungen wurden daher nicht durchgeführt.

3.8.2.2 Ergebnisse der AFLP Populationsuntersuchungen

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 10 verschiedene selektive Primerkombinationen eingesetzt (Tabelle 3-13). Alle untersuchten Individuen konnten mit AFLPs charakterisiert werden, da jedes Individuum individuelle Kombinationen von Bandenmustern in jeder Primerkombination aufwies.

Tabelle 3-13: Selektive Basen der eingesetzten selektiven AFLP-Primer (Vos et al., 1995) für die Populationsuntersuchungen, eine Spalte entspricht einer eingesetzten Primerkombination

selektive Basen Eco:	ACG	ACG	ACG	ACG	ACG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG
selektive Basen Mse:	AAT	ACA	AGG	AGT	ATG	AAT	ACA	AGG	AGT	ATG

3.8.2.3 Testen der Zuordnung von Individuen an drei Populationen

Vor Beginn der Untersuchung aller beprobten Populationen wurde anhand von drei Populationen exemplarisch geklärt, ob sich die Bestände von *G. nuciforme* mit AFLPs als Populationen voneinander abgrenzen lassen. Die Abgrenzung wurde im Feld anhand der räumlich getrennten Vorkommen auf Quarzflächen vorgenommen. Die Annahme ist, dass eine Quarzfläche eine Population beherbergt. Von drei Populationen (G5, G6 und G10) wurden jeweils die 10 gesammelten Individuen mit AFLPs untersucht. Die Populationen wurden ausgewählt, da sie sehr deutlich räumlich voneinander getrennt liegen. Es wurden vier Primerkombinationen eingesetzt (Tabelle 3-14) und 214 Banden ausgewertet.

Tabelle 3-14: Primerkombinationen und ausgewertete Banden für die drei Populationen G5, G6 und G10

Primer SEco	Primer SMse	Anzahl der Banden 1. Auswertung	Anzahl der Banden 2. Auswertung
ATG	AAT	61	55
ATG	ATG	60	nicht ausgewertet
AGG	AAT	36	33
AGG	ACA	57	45
	Summe:	214	133

Bei der Primerkombination Eco ATG/Mse ATG waren vier Individuen von Population G10 nicht auswertbar, daher wurde diese Primerkombination in der zweiten Auswertung komplett nicht berücksichtigt, während in der ersten Auswertung sechs Individuen der Population G10 berücksichtigt wurden. Die übrigen drei Primerkombinationen mit je 10 Individuen pro Population wurden zweimal unabhängig voneinander ausgewertet, um die Wiederholbarkeit der Auswertung zu überprüfen. Exemplarisch wurde die genetische Struktur für die erste Auswertung über drei Primerkombinationen (ATG/AAT, AGG/AAT, AGG/ACA) berechnet (Tabelle 3-15). Die binäre genetische Matrix umfasste 154 AFLP Loci, die über 30 Individuen erfasst wurden. Alle Individuen wiesen ein einzigartiges AFLP-Profil mit einem Mittel von 51,2 Fragmenten je Individuum auf. In den untersuchten Populationen wurden zwischen 67,5 % und 76,6 % polymorphe Banden detektiert, 42 private Fragmente (treten nur in einer Population auf) wurden festgestellt sowie 33 seltene Fragmente (rare-fragments, treten in weniger als 10 % der Individuen auf). Die genetische Diversität der drei Populationen (H_e) ist in allen drei Populationen ähnlich (0,23 - 0,25).

Tabelle 3-15: AFLP Ergebnisse für 3-Populationen-Voruntersuchung, G05 = Name der Population, n = Anzahl der untersuchten Individuen, Anzahl der Fragmente pro Population (Frequenz: 0,05-0,95), H_e = genetische Diversität

Population	n	Fragmente pro Population	Polymorphe Banden in %	H_e
G05	10	104	67.5	0.23004
G06	10	118	76.6	0.25308
G10	10	106	68.8	0.25545

Die angenommene Zuordnung der einzelnen Individuen zu den drei Populationen wurde mit einer Diskriminanzanalyse überprüft. Die Zuordnung der Individuen zu den Populationen, die anhand der räumlichen Zuordnung zu Quarzflächen erfolgte, wird durch die Diskriminanzanalyse der AFLP-Daten zu 100 % bestätigt.

Mit dem Wilks' Lambda Test wird der Beitrag der Diskriminanzfunktion zur Trennung der Gruppen auf statistische Signifikanz geprüft. Die Nullhypothese wäre für diesen Fall, dass die den Populationen zugehörigen Individuen auf allen Diskriminanzfunktionen jeweils den gleichen Mittelwert haben. Im vorliegenden Fall wird die Nullhypothese zurückgewiesen, die Gruppen-Zentroide unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,001$). Auch für die drei Primerkombinationen, die ein zweites Mal ausgewertet wurden, ergab die Diskriminanzanalyse,

dass 100 % der ursprünglich gruppierten Fälle korrekt klassifiziert wurden. Die vierte Primerkombination (EcoATG/MseATG) kann zu den Auswertungen hinzugezogen werden, hier fallen jedoch vier Individuen aus Population G10 weg, da diese nicht auswertbar waren. Die Diskriminanzanalyse ergibt auch hier 100 % korrekt klassifizierte Fälle.

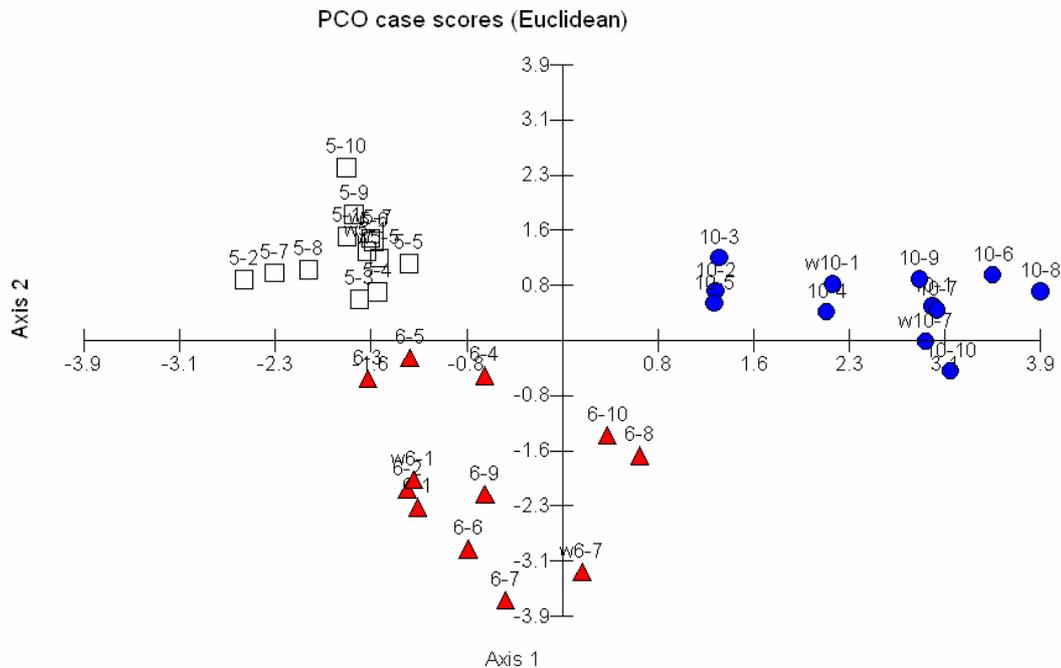


Abbildung 3-18: PCO zweite Auswertung drei Primerkombinationen, Dreieck = Population G6, Quadrat = G5, Kreis = G10, mit w beschriftete Individuen sind Wiederholungen

Mit den AFLP-Daten für die drei Populationen wurde eine Hauptkoordinaten Analyse (PCO) in MVSP 3.1 berechnet (Abbildung 3-18). Die PCO weist eine Verteilung der Individuen auf die entsprechenden Populationen auf und zeigt zudem, dass die Individuen einer Population nur einen begrenzten Bereich einnehmen.

Ein Dendrogramm (MVSP, Minimum Variance) (Abbildung 3-19) zeigt zwei Groß-Gruppen: die eine enthält alle untersuchten Individuen der Population G10, die andere umfasst die Individuen der Populationen G5 und G6. Alle Individuen von Population G5 bilden, zusammen mit den Individuen 6-3 und 6-5, eine Gruppe, die den übrigen acht Individuen der Population G6 gegenüber stehen. Beziehungen der drei Populationen zueinander lassen sich aus diesem Dendrogramm nicht ableiten, da jede der Populationsgruppen zwangsläufig die beiden anderen als „Nachbarn“ hat und das Dendrogramm auch frei drehbar, also nicht bewurzelt, ist. Im MVSP-Handbuch (Kovach, 1999) wird das sehr anschaulich beschrieben: man solle sich vorstellen, das Dendrogramm sei ein Mobile, das sich an allen Knotenpunkten frei drehen könne.

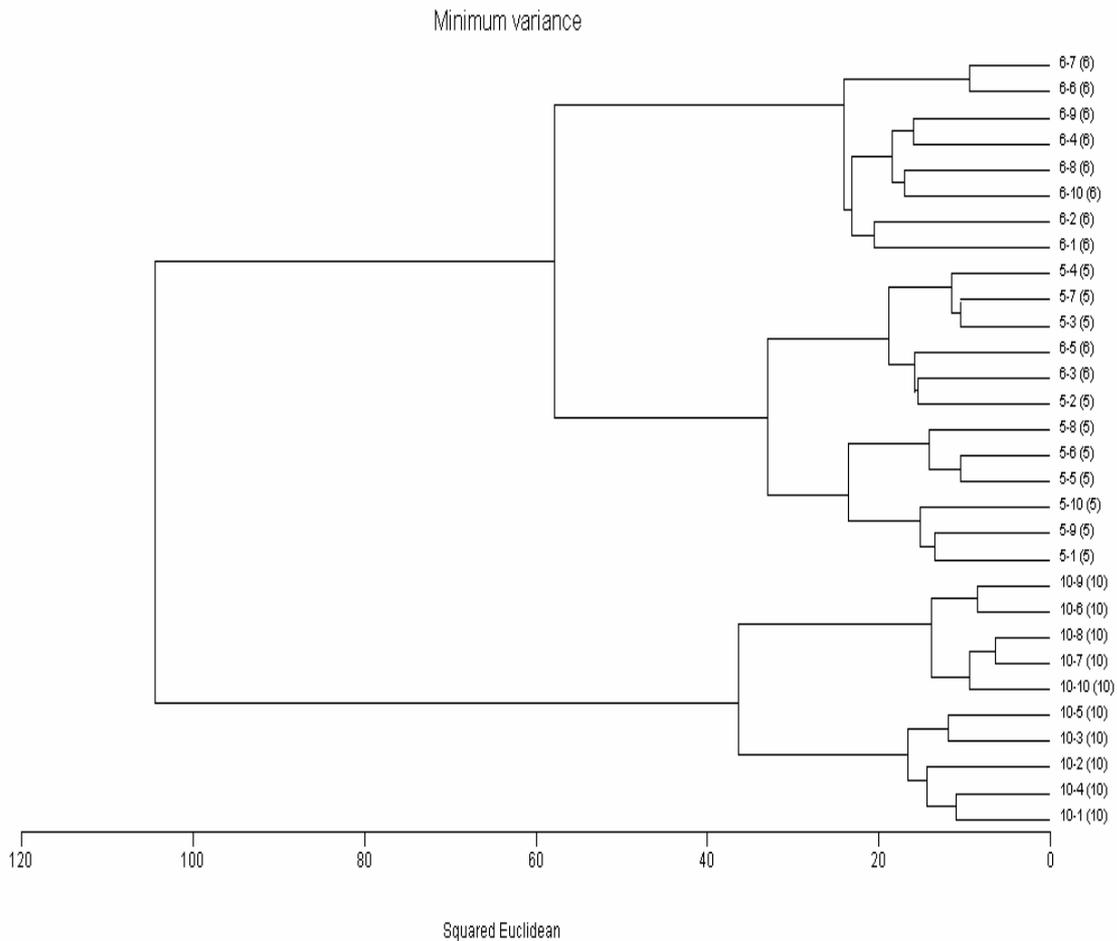


Abbildung 3-19: Dendrogramm basierend auf AFLP Daten für Population G5, G6 und G10 von *G. nuciforme*, Minimum Variance, mit quadrierten euklidischen Distanzen, basierend auf drei Primerkombinationen, zweite Auswertung, aus AFLP-Untersuchungen mit je 10 Individuen für Populationen 5, 6 und 10

Die Anwendung der AFLPs ermöglicht es bei dieser Untersuchung einzelne Individuen sowie Populationen zu charakterisieren und voneinander abzugrenzen. Nach dieser Voruntersuchung wurden weitere Populationen in die Untersuchung einbezogen.

3.8.2.4 Abgrenzung von Individuen und Populationen mit AFLPs

Ziel dieses Untersuchungsteils ist es zum einen zu testen, ob mit AFLPs Individuen reproduzierbar charakterisiert werden können. In der Untersuchung sind 15 Populationen von *G. nuciforme* (G1 bis G15) mit je zwei Individuen vertreten. Es wurden von jeder Population zumeist Individuum 1 und 5 untersucht. Dafür wurde eine Primerkombination (Eco ACG/Mse ATG) eingesetzt und 47 Bandenpositionen ausgewertet.

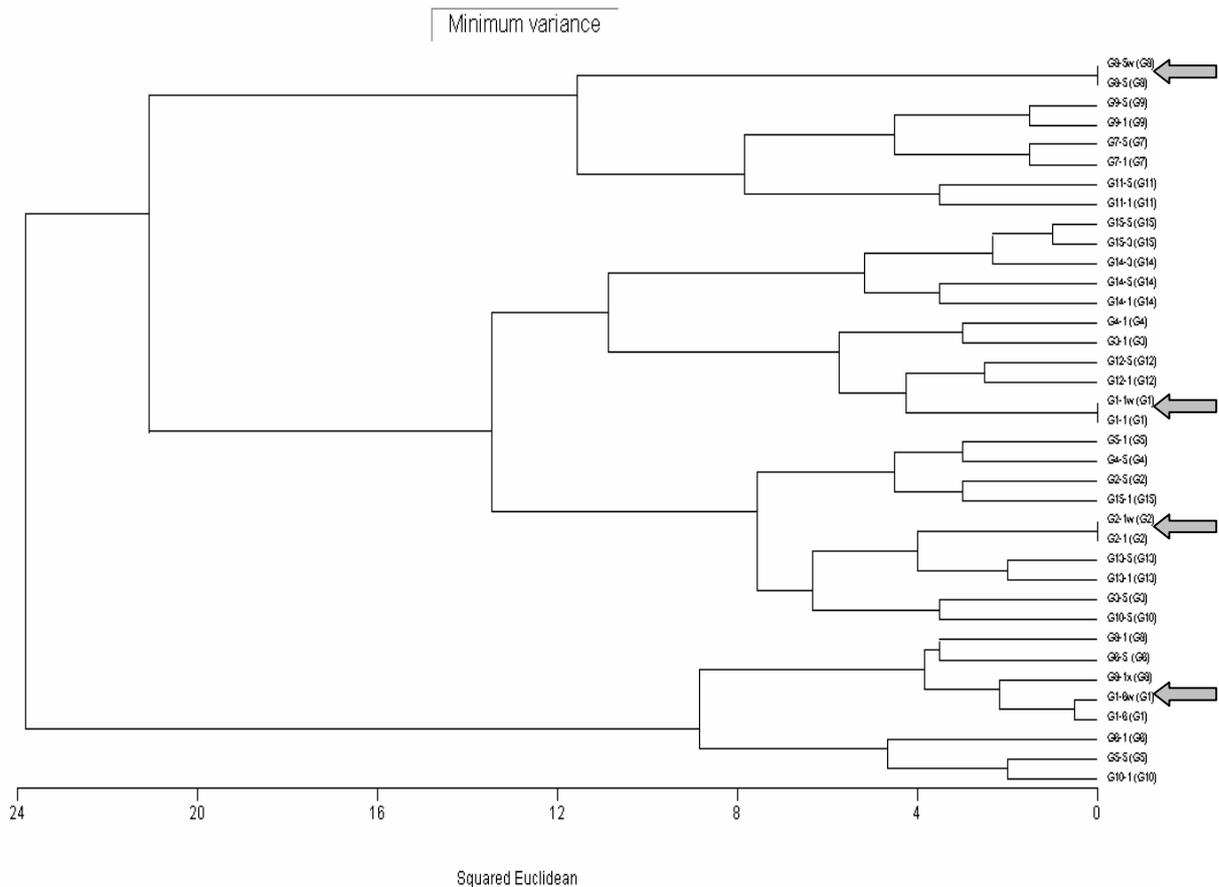


Abbildung 3-20: Dendrogramm (Minimum Variance), errechnet aus AFLP Daten von je zwei Individuen pro Population, Wiederholungen sind mit w zusätzlich beschriftet und werden durch graue Pfeile hervorgehoben

Von vier Individuen (G1-1, G2-1, G8-5 und G1-6) wurden Wiederholungen der AFLP-Reaktionen an anderer Stelle im gleichen Gellauf aufgetragen. Die Wiederholungen wurden mit einem „w“ gekennzeichnet. Die Verrechnung der ausgewerteten Bandenpositionen als Dendrogramm (MVSP, Minimum Variance) (Abbildung 3-20) zeigt, dass die Individuen und die jeweilige zugehörige Wiederholung direkt nebeneinander gruppiert werden (graue Pfeile). In drei Fällen (G1-1, G2-1 und G8-5) gibt es keine Unterschiede, bei G1-6 traten geringe Unterschiede, während jedoch auch hier die direkte Nachbarschaft des Individuums und der Wiederholung erhalten bleibt. Mit der gewählten Methode (AFLPs) lassen sich für die Individuen reproduzierbare Ergebnisse erzielen.

Die PCO für die AFLP-Daten von je zwei Individuen pro Population in Abbildung 3-21 weist keine klare Zuordnung der Individuen einer Population zu Gruppen auf. In vielen Fällen liegen die beiden Individuen einer Population im Koordinatensystem nahe beieinander.

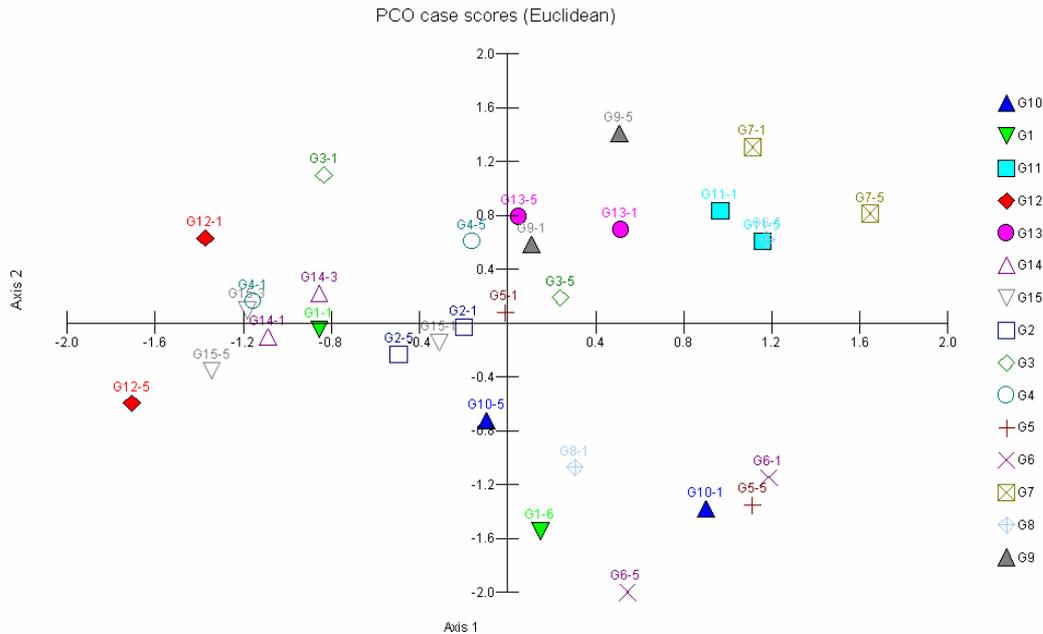


Abbildung 3-21: PCO, je zwei Individuen aus 15 Populationen, jede Population mit eigenem Label

Die Überprüfung der Zuordnung von je zwei Individuen zur jeweiligen Population mittels Diskriminanzanalyse ergab, dass 100 % der Fälle korrekt zugeordnet werden konnten (Wilks' Lambda $p < 0,001$).

Fazit: Reproduzierbarkeit und Abgrenzung von Individuen ist mit AFLPs möglich.

Durch die Wiederholungen von AFLP-Reaktionen im direkten Vergleich von Probe und Wiederholung konnte die Reproduzierbarkeit der Reaktion und der Auswertung gezeigt werden. Auch weisen alle Individuen aus 15 Populationen ein individuelles Bandenmuster auf, mit welchem sich die Individuen charakterisieren und trennen lassen.

3.8.2.5 Untersuchung der Populationen von *Gibbaeum nuciforme* mit AFLPs

Nachdem die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, dass die Individuen von *G. nuciforme* mit der Methode der AFLPs charakterisiert werden können, die Methode reproduzierbare Ergebnisse liefert und auch eine Zuordnung zu Populationen möglich ist, wird die Methode auf alle beprobten Populationen und deren Individuen angewendet, um die Populationen auf räumliche Muster von Populationen und Individuen zu prüfen. Es wurden drei Primerkombinationen (Tabelle 3-16) erfolgreich eingesetzt. Die Produkte der selektiven AFLP-Reaktion für eine Primerkombination wurden, da auf einem Gellauf (ALF Express) maximal 37 Spuren für Individuen zur Verfügung stehen, auf insgesamt drei Gelläufe verteilt, welche als diese wurden als Teilläufe mit A, B und C bezeichnet wurden. Die Individuen, deren Proben auf den jeweiligen Gelläufen aufgetragen wurden, werden im Folgenden entsprechend als Teildatensätze A, B oder C benannt. Jede Population ist insgesamt mit 7 Individuen vertreten, in einem Teildatensatz finden sich zwei bis vier Individuen einer Population.

Tabelle 3-16: Eingesetzte selektive AFLP Primerkombinationen für drei Teilläufe A, B und C. Angegeben ist jeweils die Anzahl der ausgewerteten Bandenpositionen je Teillauf, Primer nach Vos et al. (1995)

Eco RI primer: Selektive Basen	Mse I Primer: Selektive Basen	Anzahl Banden in Teildatensätzen A/ B/ C
ACG	AAT	51/ 61 /65
ACG	AGT	36 /56 /64
ATG	AGT	57 /34 /43

Es wurden zwischen 34 und 65 Bandenpositionen pro Primerkombination und Teildatensatz ausgewertet. Für jeden Teildatensatz wurden Auswertungen vorgenommen, anschließend wurden die Teildatensätze A, B und C zusammengefasst. Interne und externe Standards in Kombination mit der Längenkalkulationsfunktion des Programms Alfin Fragment Analyzer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala) wurden genutzt, um Bandenpositionen zwischen den jeweils drei Gelläufen je Primerkombination abzugleichen. Zweifelsfälle und unsichere Zuordnungen wurden nicht berücksichtigt, daher weist der kombinierte Datensatz für alle untersuchten Individuen weniger Bandenpositionen auf, als die einzelnen Teildatensätze. In der Zusammenfassung wurden 44 AFLP Bandenpositionen für alle Teildatensätze in einer Tabelle zusammengestellt und für die Auswertung genutzt. Im Folgenden werden Cluster- und PCO-Ergebnisse exemplarisch für den Teildatensatz A gezeigt, anschließend wird die Auswertung des kombinierten Datensatzes vorgestellt. In Tabelle 3-18 sind die Ergebnisse der Clusteranalysen für die Teildatensätze und den kombinierten Datensatz zusammengefasst.

Teildatensatz A

Eine Cluster Analyse (MVSP, Minimum Variance) mit den Daten für den Teildatensatz A (Abbildung 3-22) weist zwei Teilcluster auf. Ein oberer Teilcluster mit Individuen der Populationen G6 bis G11 umfasst zusätzlich die Individuen G5-4 und G14-2. Ein unterer Teilcluster weist die Individuen der Populationen G1 bis G5 (ohne G5-4) und G12 bis G15 (ohne G14-2) auf.

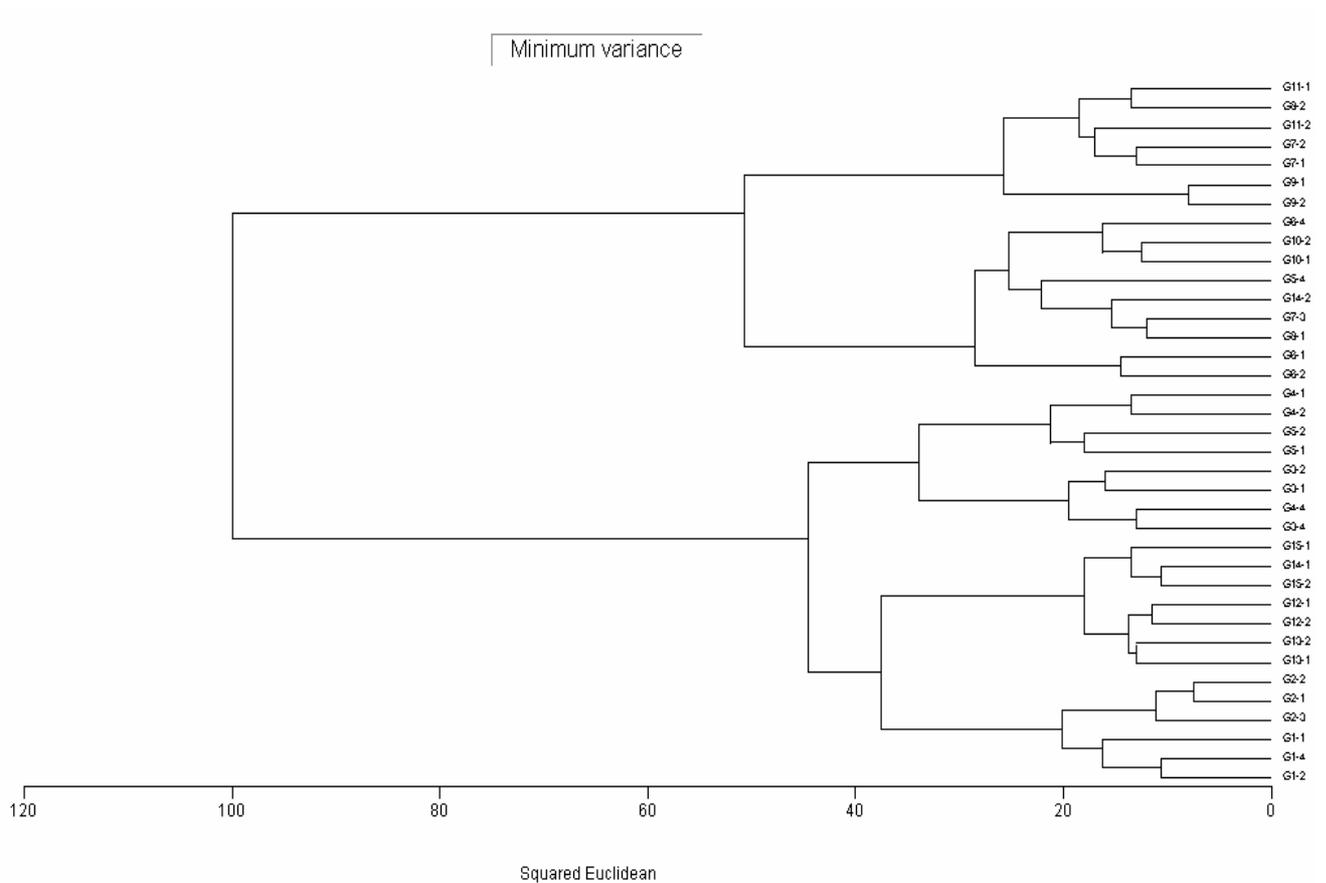


Abbildung 3-22: Dendrogramm der Cluster-Analyse (Minimum Variance) der AFLP-Daten für den Teildatensatz A, Bandenpositionen aus drei Primerkombinationen

In den Teilclustern gibt es Untergruppen. So gruppieren im unteren Teilcluster die Individuen aus Population G1 und G2 benachbart. Diese Populationen wachsen am Standort wenige Meter voneinander entfernt. Die Individuen der Populationen G12 bis G15 befinden sich gemeinsam in einem Teilcluster, wobei sich ein Individuum der Population G14 (G14-2) in dem anderen großen Teilcluster befindet. Diese Populationen wachsen in der Kleinen Karoo im westlichen Teil des Verbreitungsgebietes südlich des Anysbergs. Ein weiterer Teilcluster enthält Individuen der Populationen G3, G4 und G5. Diese drei Populationen befinden sich, wie Populationen G1 und G2, nördlich des Anysbergs. Die Individuen der Population G4 gruppieren mit denen der Populationen G3 und G5. Ein Individuum der Population G5 (G5-4) befindet sich in dem oberen großen Teilcluster. Dieser obere Cluster umfasst alle Individuen der östlichen Populationen im Verbreitungsgebiet. In diesem Teilcluster ist die Trennung zwischen Populationen nicht so deutlich wie im unteren. So gruppieren die zwei Individuen aus Population G9 und G10 jeweils zusammen und von den übrigen deutlich getrennt. Die Individuen der Populationen G6, G7, G8 und G11 werden nicht weiter differenziert.

Zusammenfassung der Auswertungen für Teildatensätze A, B und C

Für jeden Teildatensatz wurde mittels einer Diskriminanzanalyse die Zuordnung der Individuen zu den jeweiligen Populationen überprüft. Richtig klassifizierte Fälle sind solche, in denen die Zuordnung der Individuen zur besammelten und damit vorhergesagten Population erfolgte. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Diskriminanzanalysen nach Gruppierung zu Populationen für die Teildaten zusammengestellt:

Teildatensatz A: Hier wurden 36 von 37 untersuchten Individuen (97,3 %) richtig zugeordnet (Wilks Lambda 0,000, $p < 0,001$).

Teildatensatz B: Hier wurden 34 von 37 untersuchten Individuen (91,9 %) richtig klassifiziert (Wilks Lambda 0,000, $p < 0,001$).

Teildatensatz C: Hier wurden 34 von 36 untersuchten Individuen (94,6 %) richtig klassifiziert (Wilks Lambda 0,000, $p < 0,001$).

In den Clustern der Teildatensätze zeichnet sich eine Aufteilung der Individuen in zwei (Teildatensatz A und B) oder drei Gruppen (Teildatensatz C) ab. Für die Teildatensätze A und B können die Gruppen mit der geografischen Zuordnung der untersuchten Populationen zu einer Ost- und einer West-Gruppe gut beschrieben werden. Für C können drei Gruppen identifiziert werden, die die Populationen in eine Ost, eine Nord-West und eine West-Gruppe unterteilen: In Tabelle 3-18 sind die Gruppen und Populationen detailliert aufgeführt.

Kombinierter Datensatz für die Populationen von *G. nuciforme*

Die Daten der Teildatensätze wurden kombiniert. Pro Primerkombination wurden die Ergebnisse der Teildatensätze (A, B und C) zusammengefasst - hierbei wurden nur solche Bandenpositionen übernommen, die in jedem der drei Teilgele einer Primerkombination ausgewertet wurden. So enthält der zusammengefasste Datensatz für die Primerkombination EcoACG/MseAGT 17 Bandenpositionen, die einzelnen Gele jedoch zwischen 36 und 64 Positionen. Bei der Primerkombination EcoATG/MseAGT enthält der zusammengefasste Datensatz 3 Bandenpositionen, für die einzelnen Teilgele wurden zwischen 34 und 57 Positionen ausgewertet. Bei der Primerkombination EcoACG/MseAAT enthält der zusammengefasste Datensatz 24 Bandenpositionen, die einzelnen Teilgele zwischen 51 und 65 Positionen. So gingen insgesamt 104 Individuen mit 44 Bandenpositionen aus drei Primerkombinationen in die Datenmatrix der zusammengeführten Daten ein. Zwischen 56,8 % und 75 % polymorphe Banden wurden in den untersuchten Populationen festgestellt (Tabelle 3-17). Die Abschätzung von Neis Diversität (H_e) in den Populationen reichte von 0,193 bis 0,293. Private Fragmente wurden nicht festgestellt, jedoch wurden drei seltene Fragmente (= in weniger als 10 % der Individuen vertreten) nachgewiesen: eines tritt in Population G7 (5 x) und G9 (3 x) auf, ein weiteres in den Populationen G5 (1 x) und G10 (4 x) sowie eines je einmal in G4, G7 und G11 und in G10 (6 x).

Tabelle 3-17 Genetische Diversität: AFLP-Ergebnisse für Kombinierte Matrix, G01 = Name der Population, n = Anzahl der untersuchten Individuen, Anzahl der Fragmente pro Population (Frequenz: 0,05-0,95), P % = Prozent der polymorphen Fragmente, He = genetische Diversität

Population	n	Fragmente pro Population	P %	He
G01	7	30	68,2	0,25136
G02	6	28	63,6	0,25289
G03	7	28	63,6	0,25412
G04	7	28	63,6	0,19385
G05	7	30	68,2	0,20214
G06	7	33	75,0	0,25965
G07	7	29	65,9	0,26247
G08	7	32	72,7	0,26491
G09	7	31	70,5	0,26635
G10	7	32	72,7	0,29341
G11	7	34	77,3	0,28681
G12	7	25	56,8	0,20521
G13	7	29	65,9	0,26105
G14	7	27	61,4	0,20902
G15	7	29	65,9	0,21437

In der PCO (Abbildung 3-23) wurden die Individuen jeweils nach ihren Herkunftspopulationen unterschiedlich markiert. Die Individuen einer Population sind nur über einen Ausschnitt der Gesamtstreuung verteilt, keine Population streut Individuen über die gesamte PCO. Die Positionen der Individuen einer Population weisen oft Überschneidungen mit den Positionen von Individuen aus zwei oder drei weiteren Populationen auf. Die Individuen weisen anhand ihrer Position in der PCO zwei Häufungen (rechts und links von Achse 2) auf und einen Überschneidungsbereich im unteren - mittleren Bereich.

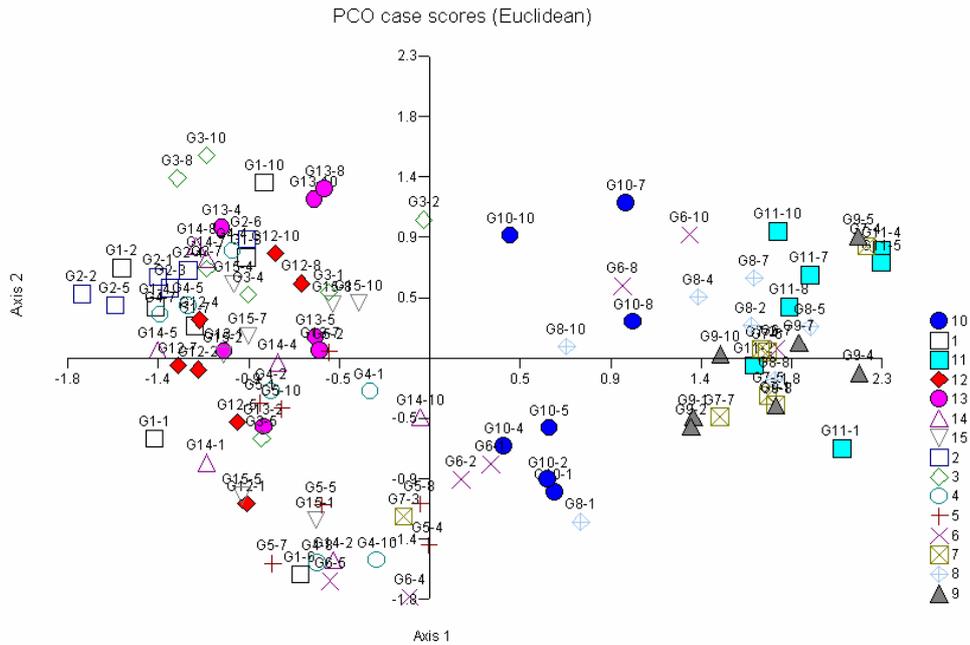


Abbildung 3-23: PCO für den kombinierten AFLP Datensatz der Individuen von *G. nuciforme*, jede Population mit einem eigenen Label versehen

Die PCO für die zusammengeführten Daten (Abbildung 3-24) zeigt eine Aufteilung der Individuen in zwei Gruppen. Es gibt einen Bereich, in dem die Gruppen sich in der PCO, vor allem durch die Individuen G6-4, G6-5 und G7-3, überlappen. Die beiden Gruppen werden in Anlehnung an ihre westliche bzw. östliche Verbreitung in der Kleinen Karoo als Ost- bzw. West-Gruppe benannt.

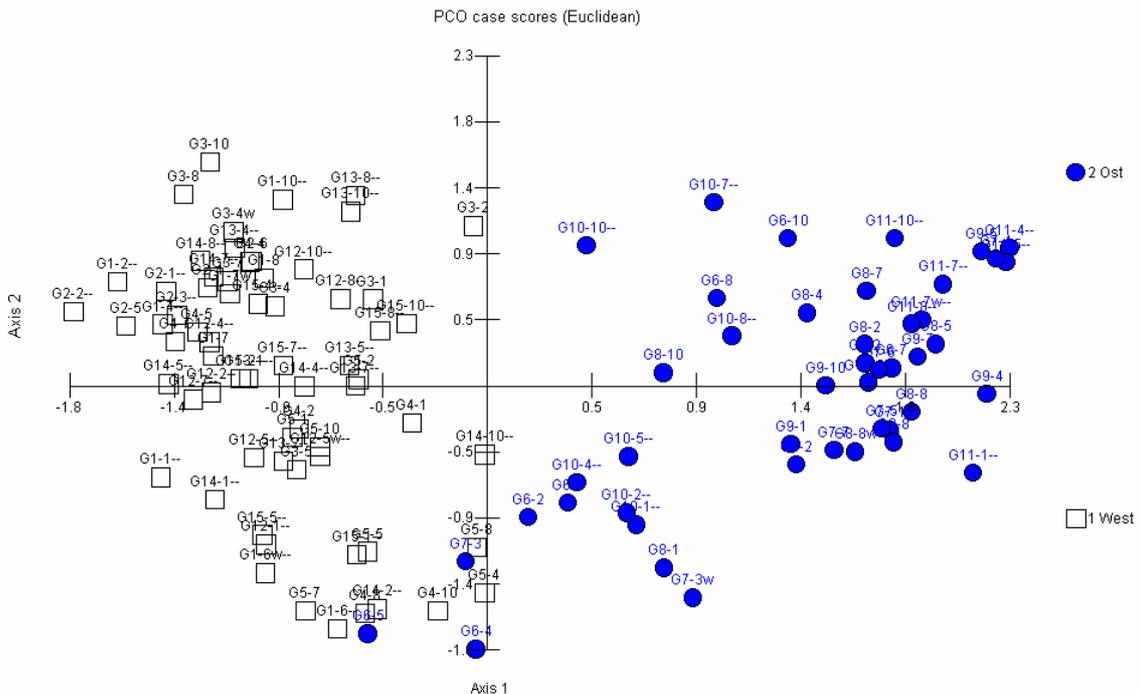


Abbildung 3-24: PCO für den kombinierten AFLP Datensatz der Individuen von *G. nuciforme* Individuen sind nach Gruppen mit Ost und West gelabelt

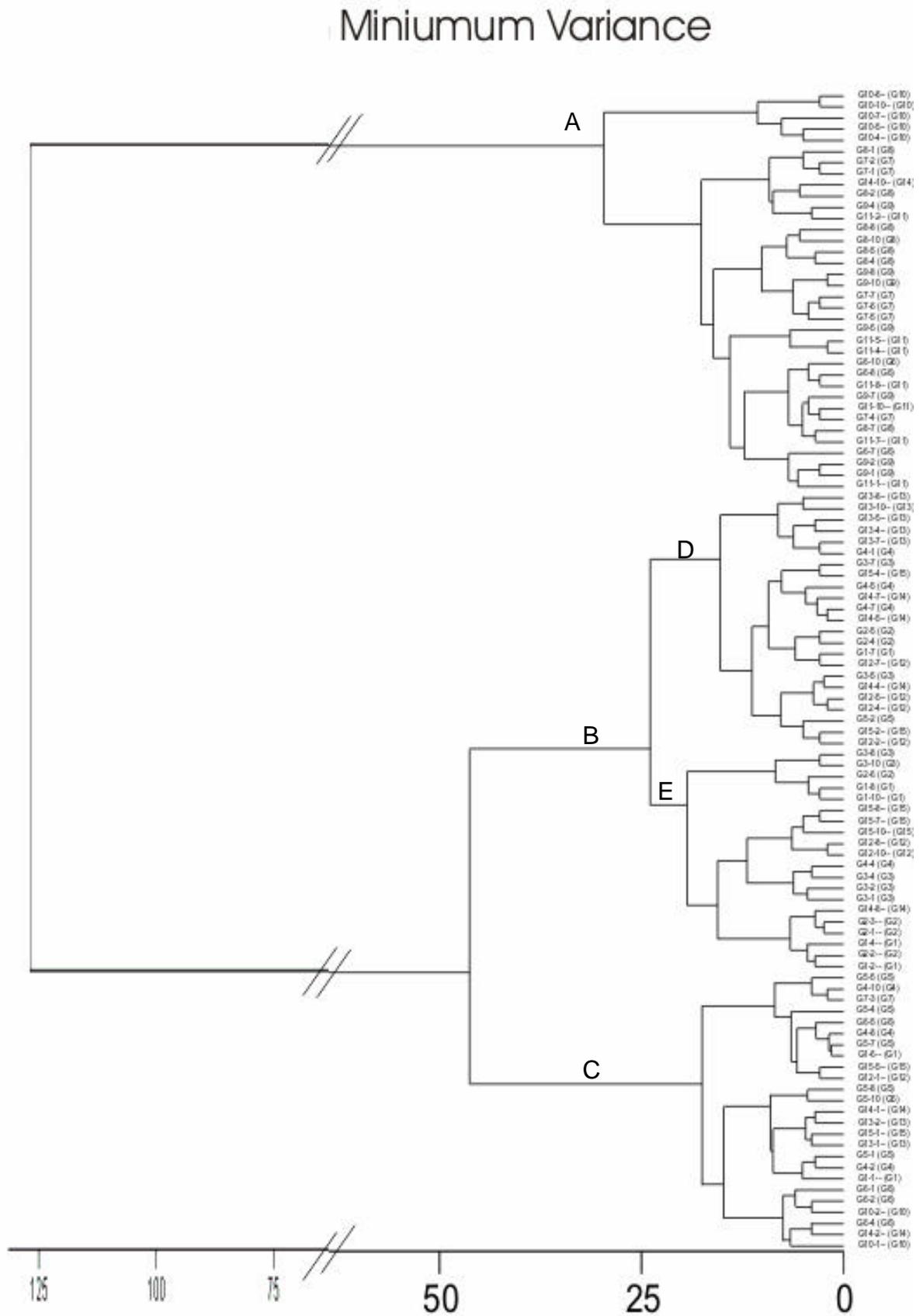


Abbildung 3-25: Dendrogramm (Minimum Variance), basierend AFLP Daten des kombinierten Datensatzes für 15 Populationen von *G. nuciforme*. Die Buchstaben (A, B, C, D und E) an den Verzweigungen beziehen sich auf die Teilcluster die sich nach rechts an die Verzweigung anschließen.

Eine Clusteranalyse (MVSP, Minimum Variance) wurde für die kombinierten Daten durchgeführt. In dem Cluster (Abbildung 3-25) werden die Individuen in zwei Teilcluster unterteilt. Der obere Teilcluster (A) umfasst 36 Individuen. Er enthält Individuen aus den Populationen G6 bis G11, zudem noch Individuum G14-10. Der untere Teilcluster (B und C zusammen) umfasst 68 Individuen. Er spaltet sich in zwei weitere Teile auf (B und C). Der Teilcluster B umfasst 43 Individuen, der obere Teil (D) umfasst 23 Individuen, wobei 7 davon aus den östlichen Populationen stammen, die übrigen 16 stammen aus westlichen Populationen. Der untere Teil (E) umfasst 20 Individuen aus den westlichen Populationen. Der Teilcluster C umfasst 25 Individuen aus den westlichen Populationen. Die Teilcluster sind weiter strukturiert und es zeichnen sich einige Nachbarschaftsgruppen ab.

Zusammenfassung für die kombinierte Datenmatrix

Die Analyse der kombinierten Daten zeigt eine Verteilung der untersuchten Individuen auf zwei Haupt-Gruppen. Die Gruppen wurden nach ihrem Vorkommen innerhalb des Verbreitungsgebietes als Ost- und Westgruppe benannt. Eine Diskriminanzanalyse für die Überprüfung der Zugehörigkeit der Individuen zu einer dieser beiden Gruppen ergab eine zu 100 % richtige Zuordnung der Individuen zur Ost- oder West-Gruppe (Wilks' Lambda 0,083 mit $p < 0,001$). Zum Teil gruppieren die Individuen nach Populationen zusammen, es gibt jedoch mehr Überschneidungen von Populationen untereinander als klare Abgrenzungen der einzelnen Populationen.

Tabelle 3-18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Clusteranalysen, Gruppen III bezeichnen die Hauptcluster aus den Clusteranalysen. Die Ziffer bezeichnet die Population, in Klammern dahinter ist die Gesamtzahl der untersuchten Individuen der Population genannt. Fett ist zusätzlich gekennzeichnet, wenn alle untersuchten Individuen der Population sich in dieser Gruppe befinden

Datensatz	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
Teildatensatz A	5(1), 6(3), 7(3), 8(2), 9(2), 10(2), 11(2), 14(1)	1(3), 2(3), 3(3), 4(3), 5(2), 12(2), 13(2), 14(1), 15(2)	-
Teildatensatz B	6(1), 7(2), 8(3), 9(3), 10(3), 11(3)	1(2), 2(2), 3(2), 4(2), 5(2), 6(1), 12(3), 13(3), 14(3), 15(2)	-
Teildatensatz C	6(2), 7(2), 8(3), 9(2), 10(2), 11(3)	1(3), 2(1), 3(3), 4(2), 5(2), 7(1)	12(3), 13(2), 14(2), 15(3)
Kombiniert ABC	6(3), 7(6), 8(7), 9(7), 11(7), 10(3)	1(7), 2(6), 3(7), 4(7), 5(7), 6(4), 7(1), 10(4), 12(7), 13(7), 14(7), 15(7)	-

Eine Analysis of molecular variance (AMOVA) (Weir & Cockerham, 1984) wurde basierend auf den kombinierten Daten mit dem Programm Arlequin (Schneider et al., 2000) berechnet.

Tabelle 3-19: Ergebnisse der AMOVA, basierend auf den AFLP-Daten des kombinierten Datensatzes von A, B und C für je sieben Individuen pro Population, die Individuen wurden den Populationen und die Populationen wiederum den beiden Gruppen (Ost und West) zugeordnet; d.f. = Freiheitsgrad, Test auf Signifikanz (1023 Permutationen), in allen Fällen $p < 0,001$ (hoch signifikant)

Quelle der Varianz	d.f	Summe der Quadrate	Varianz Komponente	Prozentsatz der Varianz
Zwischen den Gruppen Ost und West	1	56.967	2.35051	25,81
Zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen	11	106.269	1.40003	15,37
Innerhalb von Populationen	28	149.983	5.35655	58,82

Die Ergebnisse der AMOVA (Tabelle 3-19) zeigen, dass 58,82 % der Varianz der AFLP-Daten innerhalb der Populationen liegen. Zwischen den beiden Populationsgruppen (Ost und West) werden 25,81 % der molekularen Varianz erklärt. Die übrigen 15,37 % der molekularen Varianz treten zwischen den Populationen innerhalb der jeweiligen Populationsgruppe auf.

3.8.2.6 Populations-Untersuchungen mit AFLPs und „bulked“ DNA

Von jeder Population wurden zwei „bulked“ DNA pools (kurz „bulk“ genannt) mit AFLPs untersucht, ein „bulk“ bestand aus den zu gleichen Anteilen zusammen gemischten DNAs von fünf Individuen einer Population. Es wurden alle beprobten Individuen einbezogen. Jede Population war mit zwei „bulks“, die mit A bzw. B zum jeweiligen Populationsnamen benannt wurden, in der Untersuchung vertreten. Es wurden 10 Primerkombinationen eingesetzt, von denen 7 Kombinationen zu gut auswertbaren Bandenmustern führten.

Tabelle 3-20: Übersicht über die eingesetzten selektiven Primerkombinationen (angegeben sind die drei selektiven Basen der Primer) und Anzahl ausgewerteter Banden für AFLP Untersuchungen an DNA-„bulkes“ von Populationen von *G. nuciforme*

Eco RI primer: Selektive Basen	Mse I Primer: Selektive Basen	Anzahl ausgewerteter Banden
ACG	AAT	nicht ausgewertet
ACG	ACA	33
ACG	AGG	20
ACG	AGT	37
ACG	ATG	25
ATG	AAT	32
ATG	ACA	nicht ausgewertet
ATG	AGG	nicht ausgewertet
ATG	AGT	27
ATG	ATG	40
		Summe 214

Drei Primerkombinationen ergaben keine klaren Banden und wurden nicht ausgewertet. Pro Primerkombination wurden 20 bis 40 Bandenpositionen ausgewertet (Tabelle 3-20). Insgesamt konnten 214 Bandenpositionen für die Auswertungen genutzt werden.

Tabelle 3-21: Genetische Diversität: Ergebnisse für je 2 „bulked“ DNA von 15 Populationen, G01 = Name der Population, n = Anzahl der untersuchten „bulkes“, Anzahl der Fragmente) pro Population (Frequenz: 0,05-0,95), P % = Prozent der polymorphen Fragmente, He = genetische Diversität

Population	n	Fragmente pro Population	P %	He
G01	2	75	35,0	0,14250
G02	2	70	32,7	0,15630
G03	2	89	41,6	0,19761
G04	2	91	42,5	0,25996
G05	2	90	42,1	0,15873
G06	2	104	48,6	0,29376
G07	2	100	46,7	0,24231
G08	2	95	44,4	0,25228
G09	2	91	42,5	0,22351
G10	2	84	39,3	0,10850
G11	2	81	37,9	0,18000
G12	2	93	43,5	0,26231
G13	2	78	36,4	0,16186
G14	2	101	47,2	0,29006
G15	2	84	39,3	0,21539

Cluster-Analyse der „bulked“ DNA

Die Cluster-Analyse (MVSP, Minimum Variance) der ausgewerteten Banden für die untersuchten „bulkes“ ergab ein Dendrogramm mit drei Hauptgruppen (Abbildung 3-26). Ganz unten im Dendrogramm befindet sich ein Teilcluster, der sieben „bulks“ aus der östlichen Populationsgruppe umfasst. Hier gruppieren die zwei „bulks“ der Populationen G9, G10 und G11 jeweils zusammen, zudem ist ein „bulk“ der Population G6 vertreten. Der obere, größere Bereich des Clusters teilt sich weiter in zwei Teilcluster auf. Der hier obere umfasst „bulks“ der Populationen, die alle aus dem westlichen Verbreitungsgebiet stammen, so dass jeweils zwei „bulks“ der Populationen G1, G2, G3, G13 und G15 enthalten sind. Mit einem „bulk“ vertreten sind die Populationen G4 und G12. Der untere Teil des oberen Teilclusters umfasst „bulkes“ sowohl aus der Ost- als auch aus der Westgruppe. Hier finden sich beide „bulks“ der Populationen G5, G7, G8 und G14 sowie je einer aus den Populationen G4, G6 und G12.

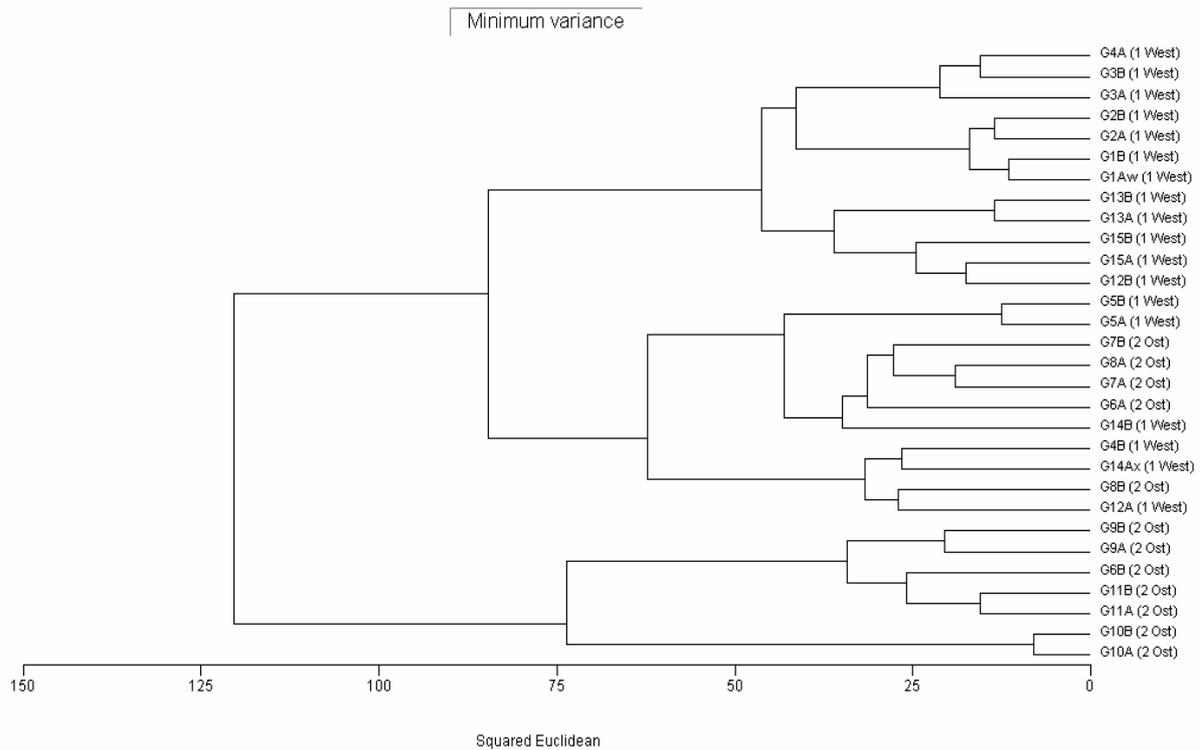


Abbildung 3-26: Dendrogramm der Cluster-Analyse der AFLP Ergebnisse aus 7 Primerkombinationen für je zwei „bulked“ DNAs je Population, Zuordnung zu geografischen Gruppen aus den vorangegangenen Analysen (Ost und West) in Klammern

Die Überprüfung der Zuordnung der „bulks“ zu Populationen mittels Diskriminanzanalyse, für 120 Bandenpositionen ergab 29 von 30 richtig zugeordneten „bulks“ (97,3 %) (Wilks-Lambda <0,001, $p < 0,001$).

Eine Zuordnung der „bulks“ zu einer der beiden Populationsgruppen (Ost oder West) ergab eine zu 100 % korrekte Vorhersage der Zugehörigkeit (Wilks-Lambda 0,011, $p < 0,001$).

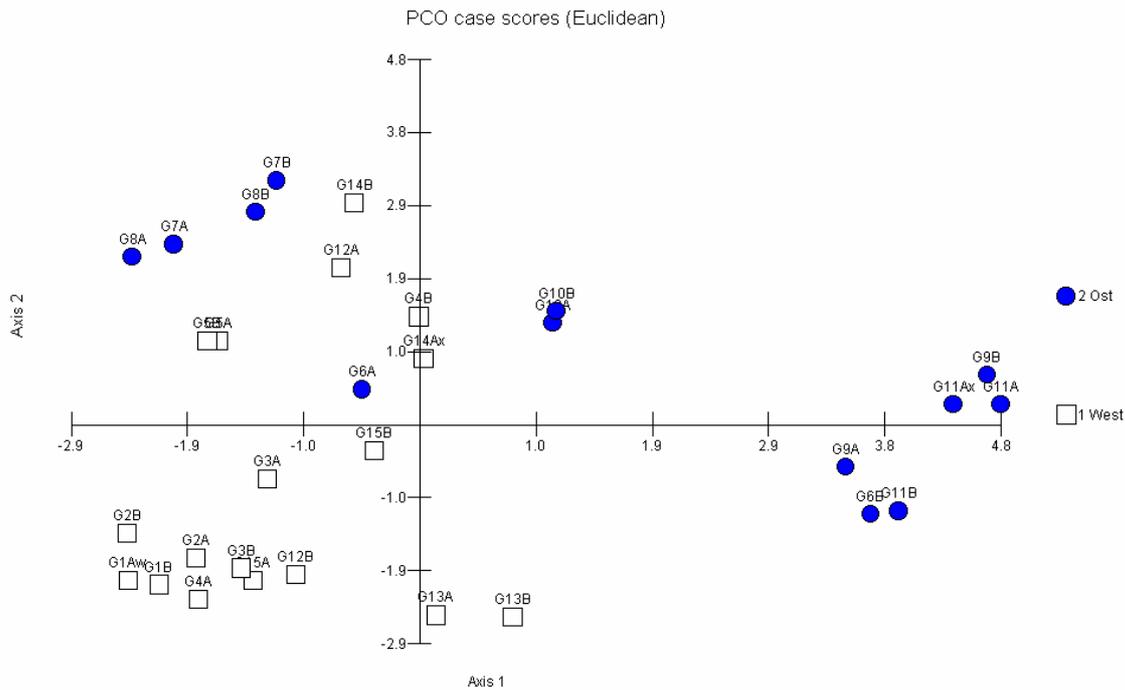


Abbildung 3-27: PCO Darstellung der AFLP Ergebnisse aus 7 Primerkombinationen für je zwei „bulks“ je Population, aufgeteilt nach Ost (Kreis) und West (Quadrat)

Die PCO für die „bulks“ (Abbildung 3-27) ergibt ein Bild, in dem die „bulks“ der West-Populationen eine erkennbare Gruppe bilden, in die ein „bulk“ (6A) aus der Ost-Population hineinragt. Eine einheitliche Ostgruppe ist hier nicht zu erkennen. Vielmehr verteilen sich die „bulks“ der Ost-Populationen über drei Bereiche. In dem linken Bereich befinden sich die „bulks“ von Population G7 und G8, etwa in der Mitte befindet sich die „bulks“ von Population G10 und ganz rechts eine Gruppe aus den Population G9, G11 und 6B, der „bulk“ von 6A liegt innerhalb der oben schon erwähnten West-Gruppe.

3.8.2.7 Genetische Struktur

Mit dem Programm AFLPsurv (Vekemans, 2002) wurde für die unterschiedlichen Datensätze die genetische Struktur der Populationen und der Untergruppen (Ost- und Westgruppe) berechnet. Die genetische Diversität (Ht) liegt für alle 15 Populationen je nach Datensatz zwischen 0,24 und 0,30. Die Westgruppe der Populationen weist für Ht im direkten Vergleich zu den Werten aller Populationen bzw. denen der Ostgruppe in allen Fällen einen niedrigeren Wert auf.

Tabelle 3-22: Genetische Struktur der Populationen untereinander (Lynch & Milligan, 1994) für Teildatensatz A: für alle Populationen, West-Gruppe und Ost-Gruppe, Ht = Genetische Diversität, (analog zu He) Hw = Mittlere genetische Diversität innerhalb der Populationen, Hb = Unterschied zwischen Populationen, FSt = Wright's fixation index

	Ht	Hw	Hb	Fst
Alle Populationen 15	0,2449	0,1931	0,0518	0,2122
Standardabweichung		0,008696	0,008590	0,141646
Varianz		0,000076	0,000074	0,020064
West Gruppe n = 9	0,2336	0,1970	0,0366	0,1566
Standardabweichung		0,012437	0,004862	0,122447
Varianz		0,000155	0,000024	0,014993
Ost Gruppe n = 6	0,2308	0,1872	0,0436	0,1892
Standardabweichung		0,012103	0,009468	0,201664
Varianz		0,000146	0,000090	0,040668

Tabelle 3-23: Genetische Struktur der Populationen untereinander (nach Lynch & Milligan, 1994) für den kombinierten AFLP-Datensatz: für alle Populationen, West-Gruppe und Ost-Gruppe, Ht = Genetische Diversität (analog zu He), Hw = die Mittlere genetische Diversität innerhalb der Populationen, Hb = Unterschied zwischen Populationen, FSt = Wright's fixation index

	Ht	Hw	Hb	Fst
Alle Populationen 15	0,2872	0,2452	0,0420	0,1468
Standardabweichung		0,008216	0,007265	0,142365
Varianz		0,000067	0,000053	0,020268
West Gruppe n = 9	0,2431	0,2271	0,0160	0,0661
Standardabweichung		0,009000	0,003241	0,185301
Varianz		0,000081	0,000011	0,034337
Ost Gruppe n = 6	0,2989	0,2723	0,0266	0,0900
Standardabweichung		0,005781	0,008962	0,304078
Varianz		0,000033	0,000080	0,092464

Tabelle 3-24: Genetische Struktur der Populationen untereinander berechnet auf Grundlage von AFLP-Daten der „bulked“ DNA für alle Populationen, West-Gruppe und Ost-Gruppe, Ht = Genetische Diversität (analog zu He), Hw = Mittlere genetische Diversität innerhalb der Populationen, Hb = Unterschied zwischen Populationen, FSt = Wright's fixation index

	Ht	Hw	Hb	Fst
Alle Populationen 15	0,3065	0,2097	0,0968	0,3169
Standardabweichung		0,014710	0,017075	0,145251
Varianz		0,000216	0,000292	0,021098
West Gruppe n = 9	0,2777	0,2050	0,0728	0,2608
Standardabweichung		0,018251	0,005807	0,113609
Varianz		0,000333	0,000034	0,012907
Ost Gruppe n = 6	0,3352	0,2167	0,1185	0,3549
Standardabweichung		0,026433	0,027694	0,198067
Varianz		0,000699	0,000767	0,039231

3.8.2.8 Mantel Test

Mit dem Mantel Test wird die Korrelation von räumlicher und genetischer Distanz zwischen Individuen, hier basierend auf AFLP-Daten, berechnet. Hintergrund für die Berechnung ist die Frage nach der Isolation durch Distanz. Die paarweisen räumlichen Distanzen zwischen den Populationen schwanken zwischen 0,06 km zwischen den Populationen G1 und G2 und 132,74 km zwischen den Populationen G10 und G14. Insgesamt gibt es drei paarweise Distanzen unter 10 km und fünf Distanzen, die über 100 km betragen. Im Mittel beträgt die Distanz zwischen zwei Populationen 44,72 km ($n = 105$).

Die paarweisen genetischen Distanzen für die beiden „bulk“ DNAs pro Population wurden basierend auf den 214 AFLP-Bandenpositionen berechnet. Die Bandenpositionen für die beiden „bulk“ DNAs pro Population wurden zusammengefasst (presence/absence), so dass für jede Population eine Information pro Bandenposition vorlag.

Die paarweisen genetischen Distanzen für je zwei Individuen pro Population resultieren aus einer Distanzmatrix basierend auf drei AFLP-Primerkombinationen. Es wurden zwei Individuen pro Population berücksichtigt. Die Zuordnung der Individuen zu den Populationsgruppen (Ost- bzw. West-Gruppe) erfolgte aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse aus Cluster-Analyse und PCO der jeweiligen Daten.

In Tabelle 3-25 sind die Ergebnisse des Mantel-Tests dargestellt. Der Mantel-Test wurde für verschiedene Daten- und Teildatensätze durchgeführt. Es werden Ergebnisse der AFLPs mit „bulk“ DNA als auch Ergebnisse für zwei Individuen pro Population dargestellt. Jeder Datensatz wurde anschließend für die jeweilige geografische Gruppe einzeln berechnet. Aufgrund von Begrenzungen innerhalb des Programms Tfpga war es nicht möglich die Berechnung für alle untersuchten Einzelindividuen durchzuführen. Eine hoch signifikante Korrelation zwischen genetischer und räumlicher Distanz weisen die Ergebnisse der „bulk“ DNA für die Gesamtheit der Populationen ($p = 0,004$) auf sowie auch die Daten der West-Gruppe ($p = 0,005$). Für die Ost-Gruppe wurde kein signifikanter Zusammenhang berechnet ($p = 0,317$). Der Korrelationswert r weist für die „bulk“ DNA und den West-Teildatensatz davon einen Wert $r = 0,41$ bzw. $0,54$ auf. Die Berechnungen mit zwei Einzelindividuen pro Population führt zu ähnlichen Ergebnissen mit ebenfalls signifikanten p -Werten ($p = 0,003$) bei der Berechnung für alle Populationen und bei der Berechnung der Daten der West-Teilgruppe. Der Korrelationswert r lag hier mit $0,31$ bzw. $0,39$ etwas niedriger als mit dem vorangegangenen Datensatz. Die Werte für die Berechnungen mit dem jeweiligen Ost-Datensatz wiesen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Distanzen auf ($r = 0,17$ bzw. $0,19$ und $p = 0,31$ bzw. $0,07$).

Tabelle 3-25: Ergebnisse des Mantel Tests, r = Mantel Korrelation, p = Signifikanzmaß, wenn p \leq 0,005: hoch signifikant

Datensatz	r =	p =
Zwei „bulked“ DNAs		
Alle Populationen: pools von A und B kombiniert	0,4163	0,004
Ost-Gruppe: A und B kombiniert	0,1713	0,317
West-Gruppe: A und B kombiniert	0,5467	0,005
2 Individuen Datensatz A:		
Alle Populationen: je zwei Individuen (basierend auf 48 AFLP Fragmenten)	0,3151	0,003
Ost-Gruppe: je zwei Individuen	0,1917	0,077
West-Gruppe: je zwei Individuen	0,3924	0,003

3.8.2.9 ISSRs

Zwei ISSR Primer, die in der Gattung *Gibbaeum* zu auswertbaren PCR-Produkten führten (3.8.3.6), wurden für die Populationsuntersuchungen getestet. Dabei handelte es sich um die Primer ISSR 4 und ISSR 5. Die Populationen waren mit ein bis zwei Individuen in der Untersuchung vertreten. Für die untersuchten Individuen brachten beide Primer keine auswertbaren Ergebnisse. Trotz des Versuchs, die Annealingtemperatur mit Hilfe einer Gradienten-PCR zu optimieren, gab es keine klar abgrenzbaren PCR-Produkte. Daher wurden die ISSRs auf Populationsebene nicht weiter eingesetzt.

3.8.2.10 ccSSRs

Zwei Primer (9 und 16) wurden eingesetzt und je ein bis zwei Individuen pro Population untersucht. Das Ergebnis war jeweils eine einheitliche Bande pro Primer. Für ccSSR 9 war die Bande etwa 230 bp lang und von den untersuchten 34 Individuen wiesen 30 dieses Fragment deutlich auf. Für Primer ccSSR 16 war die Bande etwa 350 bp lang und von den 34 untersuchten Individuen wiesen 27 die entsprechende Bande deutlich auf. Bei einigen Individuen ergab die einmalige Amplifikation kein PCR-Produkt. In einer Wiederholung der PCR für den Primer 16 konnten einige Lücken gefüllt werden.

Mit beiden eingesetzten Primern wurden keine Längenpolymorphismen, die bei diesem Marker gesucht wurden, gefunden.

3.8.3 Ergebnisse der Untersuchungen der Gattung *Gibbaeum*

Die Untersuchungen zur Gattung *Gibbaeum* werden vor dem Hintergrund unternommen, eine Phylogenie der Gattung zu erstellen. Diese Phylogenie soll dann genutzt werden, um die Etablierung von Arten auf Quarzflächen und auch die einmalige oder mehrfache Entwicklung von Wuchsformtypen der Arten zu interpretieren. Für Untersuchungen der Gattung *Gibbaeum* standen 14 Arten zu Verfügung, darunter alle Arten, die auf Quarzflächen vorkommen (Schmiedel, 2004), siehe Tabelle 1-1 und Tabelle 2-1.

3.8.3.1 ITS

Für 20 Individuen wurden ITS Sequenzen erstellt (Abbildung 9-3). Die Sequenzen weisen im Alignment der untersuchten Taxa eine Länge von 567 Basenpositionen auf, davon sind zwei Positionen bei einigen Taxa als Lücke („gap“) editiert worden, um Verschiebungen im Alignment durch eine zusätzliche Base (hier ist es in beiden Fällen ein C) bei anderen Taxa zu vermeiden. Das Alignment ist gut und eindeutig herzustellen, da auf einer Länge von 567 Basenpositionen zwischen den 20 Consensus-Sequenzen der Taxa insgesamt 29 variable Positionen der Sequenzen auftreten. 92,8 % der untersuchten Positionen sind zwischen allen untersuchten Individuen identisch. Der Median der paarweisen absoluten Distanzen zwischen den untersuchten Arten liegt bei 5, dieser Wert ergab sich für insgesamt 33 der paarweisen Distanzen. Die Werte für die paarweisen absoluten Distanzen variieren zwischen 0 (bei 3 Paaren) und 9 (bei 10 Paaren).

Die Außengruppe (*Corpuscularia gracilis*) weist 3 Unterschiede zu den Arten der Gattung *Gibbaeum* auf. Zudem weist die Außengruppe noch in 3 Positionen Unterschiede zu einem Teil der Gattung *Gibbaeum* auf, diese 3 Positionen teilt *C. gracilis* jedoch mit anderen Taxa der Gattung. Das Alignment der ITS-Sequenzen wurde in PAUP* eingelesen. Unter Parsimonykriterien wurden Cladogramme erstellt, zudem wurde mit PAUP* noch der Homoplasieindex $HI = 0,1887$ und der Retentionsindex $RI = 0,913$ berechnet.

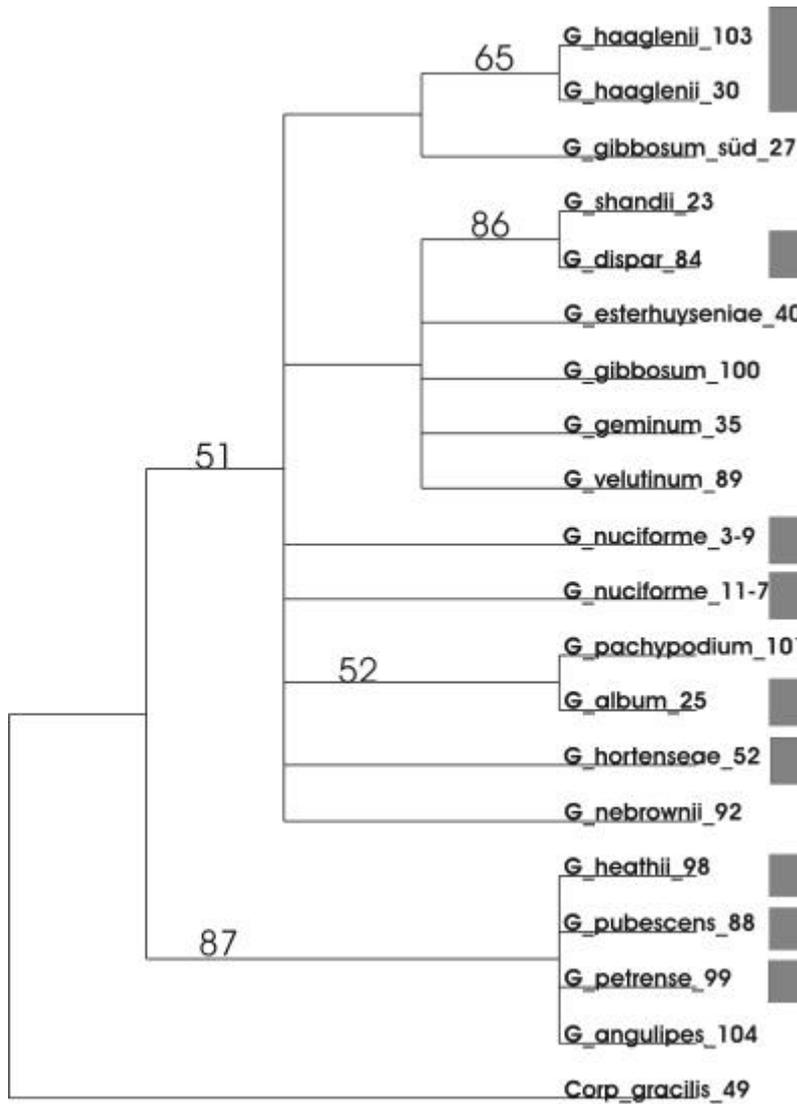


Abbildung 3-28: majority-consensus tree (50%), basierend auf den ITS-Daten für die Gattung *Gibbaeum*, graue Vierecke markieren Arten der Quarzflächen, Zahlen auf den Ästen sind Bootstrapswerte über 50%

Mit Parsimony und einer heuristic search sowie der Angabe der Außengruppe (*Corpuscularia gracilis*), wurde mit PAUP* ein Dendrogramm, basierend auf den ITS-Sequenzen, berechnet (Abbildung 3-28). Die Arten der Gattung *Gibbaeum* teilen sich hier in zwei Gruppen auf. Eine Gruppe umfasst die Arten *G. angulipes*, *G. heathii*, *G. petrense* und *G. pubescens*, diese Gruppe wird mit 87 % Bootstrapsupport gestützt und nicht weiter untergliedert. Die zweite Gruppe umfasst alle anderen untersuchten Arten der Gattung. Diese Gruppe ist mit 51 % Bootstrapsupport statistisch kaum gestützt. Die Gruppe beinhaltet eine Polytomie, die wenige Strukturen aufweist. Es finden sich die beiden untersuchten Individuen von *G. haaglenii*, die mit 65 % Bootstrapsupport zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Zudem werden *G. album* und *G. pachypodium* mit 52 % Bootstrapsupport gruppiert. Eine weitere Untergruppe, die keinen Bootstrapsupport über 50 % aufweist, umfasst *G. esterhuyseniae*, *G. geminum*, *G. gibbosum*, *G. velutinum* sowie eine Gruppe aus *G. dispar* und *G. shandli*, die mit 86 % Bootstrapsupport unterstützt wird.

Die Berechnung eines Dendrogramms mit Distanzmethoden erfolgte in PAUP* mit Distanzmaßen und der Neighbour-joining Suche (Dendrogramm nicht dargestellt). Die Topologie des Dendrogramms aus Distanzmaßen ähnelt stark dem, welches mit Parsimony Methoden berechnet wurde. Die Gruppe mit *G. angulipes*, *G. heathii*, *G. petrense* und *G. pubescens* weist keine Unterschiede zur ersten Berechnung auf. In der zweiten, größeren, Gruppe, mit allen weiteren untersuchten Arten der Gattung, ist die Polytomie etwas strukturierter als die der Parsimony-Berechnung. Die Art *G. hortenseae* steht darin basal zur Polytomie. Neben der Gruppierung der beiden untersuchten Individuen von *G. haagelenii* sowie der Gruppe aus *G. album* und *G. pachypodium* finden sich *G. nuciforme* (3-7) und *G. nebrownii* in einer Gruppe, eine weitere Zweier-Gruppe wird von *G. gibbosum* (süd) und *G. esterhuyseniae* gebildet. Innerhalb der Polytomie tritt ebenfalls (wie auch bei der Parsimony-Berechnung) eine kleinere Polytomie mit *G. geminum*, *G. gibbosum*, *G. velutinum* sowie eine Gruppe aus *G. dispar* und *G. shandii* auf, der Unterschied zur Parsimony-Berechnung liegt darin, dass sich *G. esterhuyseniae* nicht in dieser Gruppe befindet. Diese Strukturen innerhalb der großen Polytomie sind nicht über Bootstrapwerte abgesichert.

3.8.3.2 Anwendung und Reproduzierbarkeit der AFLPs für die Gattung *Gibbaeum*

Mit zwei AFLP-Primerkombinationen (Pst CAC/ Mse ATG und Pst CAC/ Mse AAT) wurden 13 Arten der Gattung *Gibbaeum* sowie 2 Arten aus der Gattung *Corpuscularia* anhand von ein bzw. zwei Individuen untersucht. Für 15 der untersuchten Individuen wurden die AFLP-Reaktionen wiederholt und diese ebenfalls auf den Gellauf aufgetragen und ausgewertet. Es wurden 326 Bandenpositionen ausgewertet. In einer Parsimonyanalyse in PAUP* gruppieren alle wiederholten Vertreter der Gattung *Gibbaeum* direkt nebeneinander und sind mit Bootstrapwerten zwischen 92 und 100 % abgesichert (Abbildung 3-29). Die AFLPs sind reproduzierbar, da die untersuchten Wiederholungen der Individuen aufgrund der AFLP-Daten gut abgesichert gemeinsam gruppieren. Nach der Berechnung mit PAUP* wird für HI= 0,7088 und RI = 0,4375 angegeben.

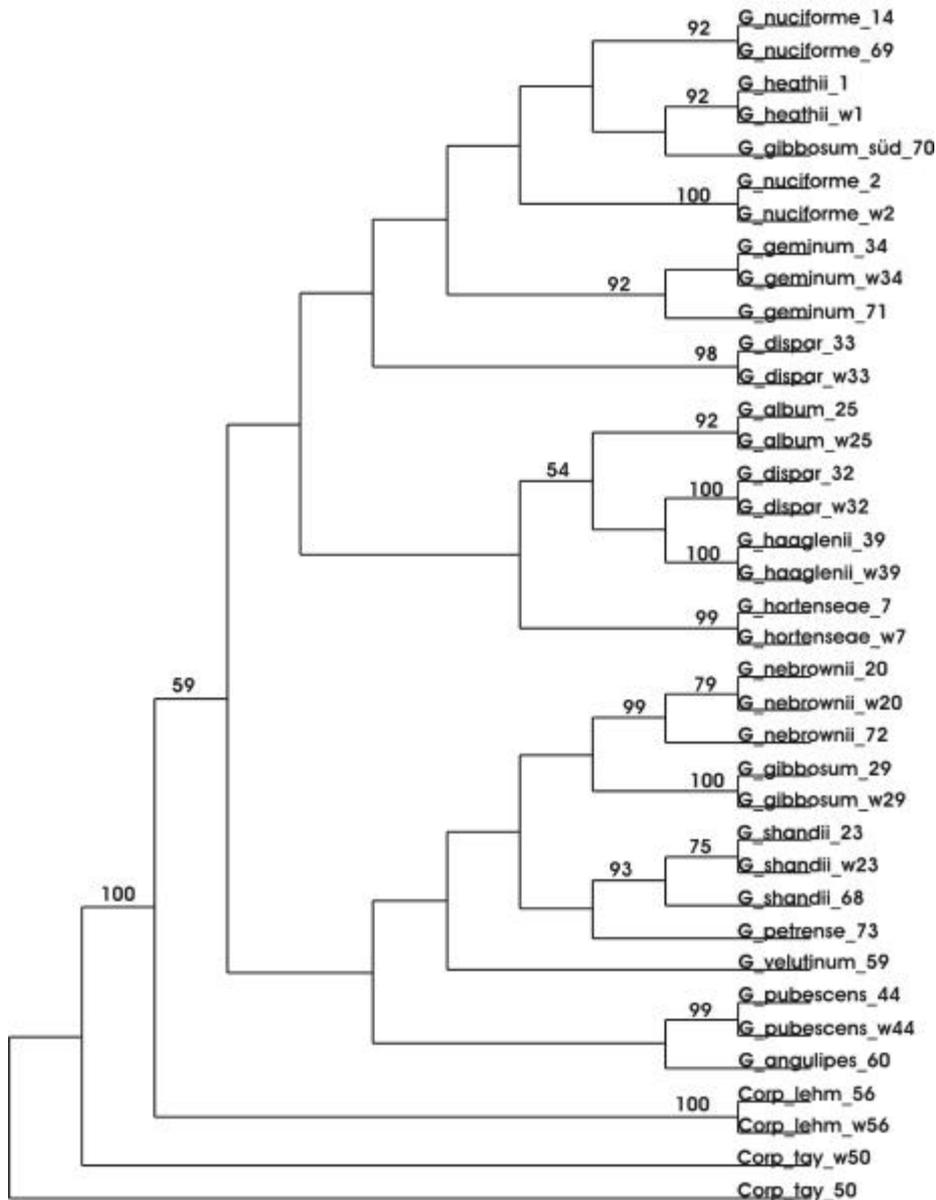


Abbildung 3-29: Dendrogramm (Parsimony, heuristic search) für Arten der Gattung *Gibbaeum* und deren Wiederholungen basierend auf AFLP Daten aus zwei Primerkombinationen, Bootstrapwerte über 50 % sind angezeigt

3.8.3.3 AFLPs für die Erstellung der Gattungsphylogenie - *Gibbaeum*

Für eine umfassende Untersuchung wurden 14 Arten der Gattung *Gibbaeum* und 4 Außengruppen berücksichtigt (Tabelle 2-1). Es wurden 4 AFLP-Primer-Enzym-Kombinationen eingesetzt und ausgewertet (Tabelle 3-26).

Tabelle 3-26: AFLP Primerkombinationen für Gattung *Gibbaeum*, Anzahl ausgewerteter AFLP-Banden je Primerkombination

Primerkombination	Ausgewertete Banden
Eco ATG / MseAGT	84
EcoATG / MseAAT	91
Pst CAC / Mse AGT	45
Pst CAC / MseACA	62
Summe	282

Im Mittel wiesen die untersuchten Taxa 65 Banden auf, wobei die Werte zwischen 50 und 95 Banden schwankten. 38 Banden traten jeweils nur bei einem Individuum auf, weitere 57 wurden für jeweils zwei Individuen detektiert. Für zwei Arten (*G. nuciforme* und *G. pachypodium*) wurden 3 bzw. 2 Individuen untersucht, hier traten jeweils 3 private Banden in den Arten auf. Die Außengruppe weist 6 private Banden gegenüber der Innengruppe auf. Die Gattung weist insgesamt 98 private Banden gegenüber der Außengruppe auf: davon treten je 36 Banden in zwei Arten auf, 21 Banden jeweils in 3 Arten, 17 Banden in 4 Arten, 13 Banden in 5 Arten, 4 Banden in 6 Arten, 3 Banden in 7 Arten, 2 Banden in 8 Arten und je eine Bande tritt gemeinsam in neun und in zehn Arten auf.

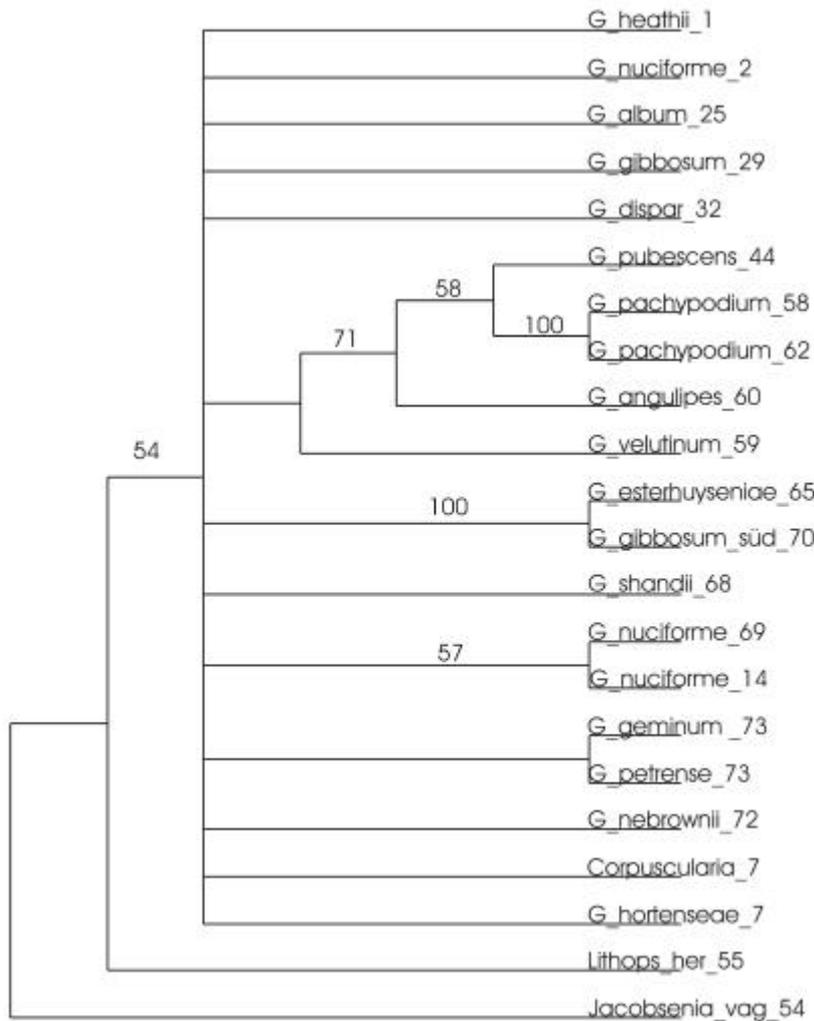


Abbildung 3-30: Consensus aus zwei Dendrogramm (Parsimony, heuristic search) der AFLP Daten für *Gibbaeum*, Zahlen geben Bootstrapwerte an, die über 50% liegen

Die in PAUP* implementierte Funktion, die Innengruppe monophyletisch zu berechnen, wurde auf die Daten der AFLP-Untersuchungen angewandt (Abbildung 3-30). Gegenüber der Außengruppe aus *Lithops* und *Jacobsenia* ist die Innengruppe mit nur 54 % Bootstrapsupport gestützt. Innerhalb der Gattung dominiert eine große Polytomie; in dieser inseriert auch die als Außengruppe eingesetzte *Corpuscularia*. Innerhalb der Polytomie befindet sich eine Gruppe, die zu 71 % abgesichert ist, die sich aus *G. angulipes*, *G. pubescens* und *G. pachypodium* zusammensetzt. *G. angulipes* steht hier basal zu den beiden anderen Arten. Die Art *G. pubescens* ist die einzige der drei Arten, die zur Quarzflächenflora gehört. Für die Parsimony-Berechnungen der Dendrogramme mit PAUP* wird $HI = 0,6889$ und $RI = 0,3635$ angegeben.

3.8.3.4 ccSSR als Marker für die Gattungsphylogenie von *Gibbaeum*

Für diese Untersuchungen wurden die Consensus-Chloroplasten SSRs nach Chung & Staub (2003) eingesetzt und dabei 10 Primerpaare getestet (Tabelle 9-9). Davon ergaben insgesamt 8 Primerpaare PCR-Produkte, bei 5 Primernpaaren (Primerpaare 7, 11, 12, 19 und 22) trat

durchgehend eine monomorphe Bande auf. Bei den Primerpaaren 16 und 22 fehlte in einigen Taxa das PCR-Produkt. Da die Taxa in den Untersuchungen mit anderen ccSSR Primern zuverlässig reproduzierbare PCR-Produkte ergaben, wird das Fehlen des PCR-Produktes als Merkmal gewertet. Der Einsatz des Primerpaares 9 ergab für jedes Taxon ein PCR-Produkt (Abbildung 3-31). Das PCR-Produkt wies in den verschiedenen Taxa zum Teil unterschiedliche Längen auf. Insgesamt traten drei verschiedene Längen auf. Die PCR Produkte konnten gut reproduziert werden.

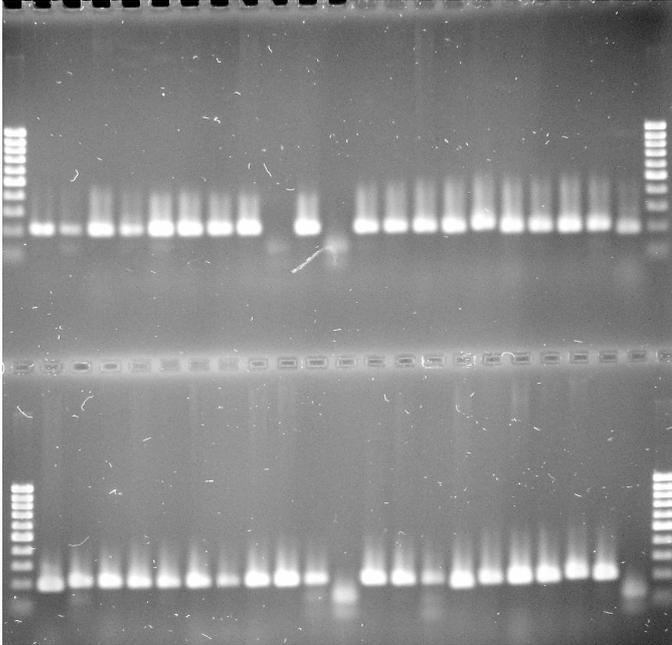


Abbildung 3-31: Agarosegel der PCR mit der Primerkombination ccSSR9 für verschiedene Taxa der Gattung *Gibbaeum*, obere Reihe: marker, 1, Mh2,11-10,12, 20, 21, 24, 25, 26,28, --- , 30, 31, 32, 35, 36, 39,43, 44 ,45, 48, marker, untere Reihe: marker,51, 52, 54, 55, 58, 59, 60, 64, 65, 67, --- , 68, 70, 71, 74, 85, 88, 89, 91, 92, ---,marker, die Zahlen beziehen sich auf die Labornummern in Tabelle 2-1

Clusteranalysen ergaben aufgrund der geringen Anzahl der Merkmale kaum Auflösung innerhalb der Gattung *Gibbaeum*. Aufgrund eines Längenunterschiedes (ccSSR 9) ist die Gattung *Corpuscularia* (mit *Corpuscularia lehmannii* und *C. gracilis*) von den übrigen Taxa getrennt (Abbildung 3-32). Weitere zwei Vertreter von Außengruppen (*Lithops*, *Jacobsenia*) inserieren hingegen innerhalb der Gattung *Gibbaeum*. Beide Individuen von *Gibbaeum petrense* sind durch einen Längenpolymorphismus bei Primerpaar ccSSR 9 von allen anderen Arten der Gattung *Gibbaeum* unterschieden. Einige Taxa (*G. geminum*, *G. hortenseae*, *G. nuciforme* und *G. pubescens*) weisen im Merkmal von Primerpaar ccSSR 16 unterschiedliche Ausprägungen auf, da in den verschiedenen untersuchten Individuen einer Art das PCR-Produkt nicht immer amplifiziert wurde.

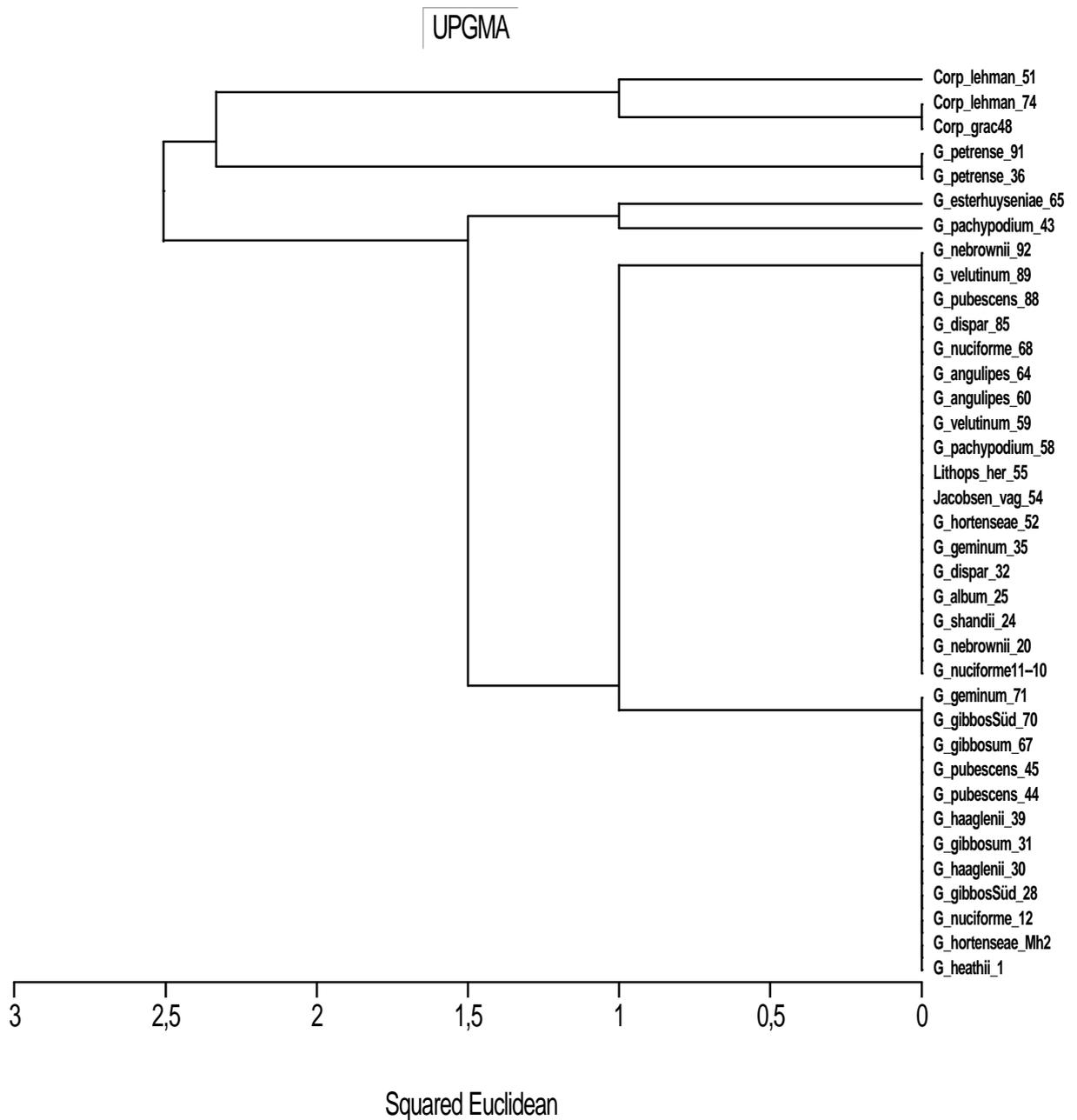


Abbildung 3-32: UPGMA-Cluster basierend auf ccSSR Daten für die Gattung *Gibbaeum*

3.8.3.5 RAPDs

RAPDs wurden mit verschiedenen Primern für die Gattung getestet. Einige Taxa wiesen Banden auf, die jedoch in nur sehr wenigen Fällen reproduzierbar waren. Die erzielten Ergebnisse wurden aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit nicht ausgewertet. Somit wurden RAPDs nicht weiter für die Untersuchung der Gattungsphylogenie eingesetzt.

3.8.3.6 ISSR

Es wurden 6 ISSR Primer für die Gattung *Gibbaeum* eingesetzt. Bei den Primern ISSR 4 und ISSR 5 konnten für mehrere Arten ausreichend PCR-Produkte amplifiziert werden. Die Auswertung der PCR-Produkte wurde anhand der Agarosegel-Fotos vorgenommen. Für Primer ISSR 4 konnten 31 der untersuchten Individuen ausgewertet werden, für ISSR 5 wurden 34 Individuen ausgewertet (Tabelle 9-10). Die Anzahl der Banden pro Individuum und Primer schwankte zwischen 1 und 7. In der weiteren Auswertung wurden nur Individuen berücksichtigt, deren PCR mindestens zwei PCR-Fragmente ergab. Da nicht alle untersuchten Individuen mit beiden Primern auswertbare Produkte ergaben, wurde eine reduzierte Matrix von 25 Individuen ausgewertet.

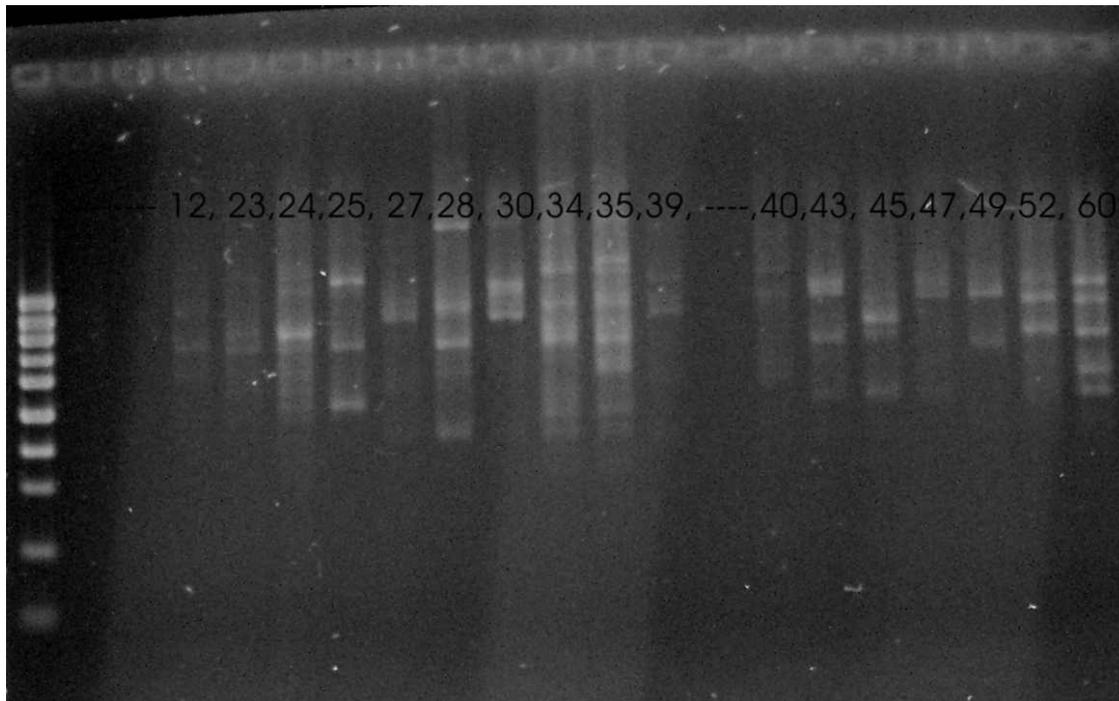


Abbildung 3-33: Agarosegel-Ausschnitt mit PCR-Produkten von Primer ISSR 5 für Arten der Gattung *Gibbaeum*, die Zahlen im Gel sind die in Tabelle 2-1 genannten Labornummern, ganz links der 1kb Längenmarker

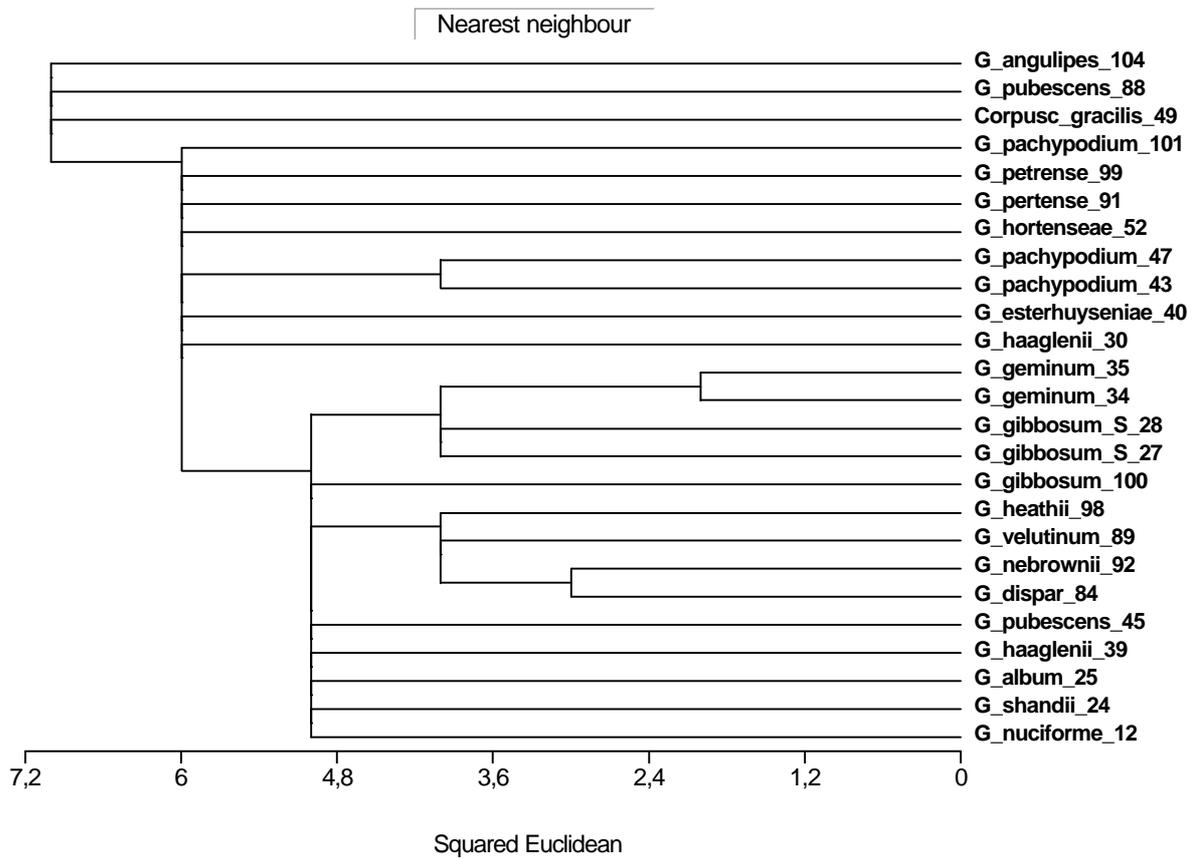


Abbildung 3-34: Dendrogramm (MVSP, Nearest neighbour) auf Basis der Ergebnisse der ISSR-Primer 4 und 5 für Arten der Gattung *Gibbaeum*

Eine Berechnung der ISSR-Daten mit Parsimonymethoden in PAUP* (nicht gezeigt) führte, ebenso wie die Clusteranalyse, zu einer großen Polytomie, in der nur jeweils zwei Individuen von *G. pachypodium* und *G. geminum* von Bootstrapwerten über 50 % gestützt werden.

4 Diskussion

4.1 Populationsuntersuchungen an *Gibbaeum nuciforme*

4.1.1 Populationskonzepte

Zur Beschreibung und Definition von Populationen gibt es verschiedene Ansätze. Gebräuchlich ist das Konzept, welches den Genfluß als zentrales Element berücksichtigt. Hier wird davon ausgegangen, dass eine Gruppe von Individuen dann zu einer Population gehört, wenn die Individuen sich effektiv und in beliebigen Kombinationen paaren können, wobei dieses Paarungsmuster für jedes Individuum der Gruppe gilt (Urbanska, 1992). Da es jedoch schon innerhalb von Pflanzenpopulationen so ist, dass benachbarte Pflanzen eine höhere Wahrscheinlichkeit des Genaustausches aufweisen als weiter entfernt liegende, wird das Konzept des Genflusses hauptsächlich auf Tierpopulationen angewendet. Populationen sind durch eingeschränkten Genfluß zwischen den Populationen häufig weitgehend genetisch isoliert (Urbanska, 1992), wobei, räumliche und zeitliche Verhältnisse hier nicht näher betrachtet werden. Silvertown (1987) betrachtet eine Population als eine Gruppe von Individuen, die zusammen ein bestimmtes geografisches Areal besetzen. Ein weiterer Ansatz umfasst eine Population im evolutiven Sinne. Dies bedeutet, dass sich eine Population im Laufe der Zeit immer weiter ausdehnt.

Eine anwendbare Verknüpfung der verschiedenen Ansätze zur Betrachtung von Populationen wird von Urbanska (1992) vorgestellt: Eine Population ist eine Gruppe von Individuen, die der gleichen taxonomischen Einheit angehören und sowohl im gleichen Raum, wie auch zum selben Zeitpunkt zusammen vorkommen. Damit wird eindeutig auf eine Art Bezug genommen und diese in einen räumlichen und zeitlichen Kontext eingeordnet. Dieser Populationsbegriff lässt sich auf *G. nuciforme* anwenden, demnach bilden die Individuen der Art auf einer Quarzfläche eine Population, da sie räumlich und zeitlich gemeinsam auftreten. Über die Ergebnisse der molekularen Populationsuntersuchungen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Populationen genetisch eine gewisse Isolation aufweisen. In der Untersuchung von drei Populationen konnte eine sehr klare genetische Trennung der Populationen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.8.2.3). In den Ergebnissen für alle 15 untersuchten Populationen weisen die Individuen der Populationen Überschneidungen mit einigen, zumeist benachbarten Populationen auf (Abschnitt 3.8.2.4).

4.1.2 Abgleich der Habitatparameter

Schmiedel & Jürgens (1999) konnten aufgrund von Vegetations- und Bodenuntersuchungen zeigen, dass es sich bei den Quarzflächen der Kleinen Karoo um Habitat-Inseln handelt. Diese sind deutlich von der Umgebung mit zonaler Vegetation und anderen Bodenverhältnissen unterscheidbar. Daraus lässt sich ableiten, dass die Pflanzen auf einer Quarzfläche auch zu einer Population gehören, zumindest soweit es sich um Arten der spezifischen Quarzflächenflora handelt, wie *Gibbaeum nuciforme*. Um zu überprüfen, ob die in dieser Studie

untersuchten Populationen die von Schmiedel & Jürgens (1999), Schmiedel (2002) und Schmiedel & Mucina (2006) genannten Habitatparameter und Vegetationszusammensetzungen aufweisen, wurden diese Parameter und Zusammensetzungen untersucht.

4.1.2.1 Bodenanalysen in Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Die Ergebnisse der Bodenanalysen innerhalb der Populationen von *Gibbaeum nuciforme* (Abschnitt 3.1) weisen ein ähnliches Spektrum auf, wie die aus den Untersuchungen von Schmiedel (2002). Für die *Gibbaeum nuciforme*-Gesellschaft gibt Schmiedel pH-Werte von 6 bis 8, mit einem Median bei pH 7, an. Die gemessenen pH-Werte für die Populationen von *G. nuciforme* von 6,5 bis 7,9 (Tabelle 3-1) liegen somit im erwarteten Bereich. Beim Carbonatgehalt weisen die Messungen von Schmiedel (2002) eine größere Schwankungsbreite (von 0 bis 4, Median liegt bei 0) auf, als die vorliegenden Werte. Demnach ist der Carbonatgehalt hier etwas höher, da der Median der vorliegenden Untersuchung für Carbonat bei 1 liegt. Die Leitfähigkeit des Bodens für diese Gesellschaft wurde von Schmiedel (2002) mit einem Median von 2 mS/cm angegeben, bei einer Spanne von 0 bis 7 mS/cm. Somit ist die Spanne der Leitfähigkeit der vorliegenden Untersuchung mit 1,3 bis 11,7 mS/cm größer (Tabelle 3-1). Schmiedel (2002) hat Bodenproben aus 29 Aufnahmen der *G. nuciforme*-Gesellschaft untersucht, daher spiegeln die von ihr ermittelten Werte die Bandbreite der Bodenverhältnisse vermutlich umfassender wider. Die leicht erhöhten Werte für Carbonatgehalt und Leitfähigkeit der Bodenproben in der vorliegenden Untersuchung können möglicherweise durch den Zeitpunkt der Probenahme in Bezug auf den letzten Niederschlag und der damit verbundenen Auswaschung bedingt sein.

Fazit der Bodenuntersuchungen: Die Untersuchungen dienten dazu, die Standorte der Populationen einzuordnen und in Bezug zu den Ergebnissen von Schmiedel (2002) zu setzen. Zwischen den Ergebnissen zeichnen sich keine gravierenden Abweichungen ab. Es kann bestätigt werden, dass *G. nuciforme* auf Böden wächst, die eine hohe elektrische Leitfähigkeit aufweisen. Nach Schmiedel & Jürgens (1999) ist die Leitfähigkeit, und damit der Salzgehalt, in den Böden von Quarzflächen-Gesellschaften höher als in den Böden der umgebenden Vegetation. Dies ist ein wichtiger Faktor, der die Quarzflächen als Sonderstandorte ausweist.

4.1.2.2 Pflanzensoziologische Einordnung der Vegetation in den Populationen von *Gibbaeum nuciforme* und Analyse der Vegetationsaufnahmen

Die Vegetation der untersuchten Bereiche der Quarzflächen lässt sich dem von Schmiedel & Mucina (2006) beschriebenen Verband *Gibbaeo nuciformi* - *Pteronia viscosi* zuordnen. Charakteristische Arten sind mit *Gibbaeum nuciforme* (in jeder Fläche), *Gibbaeum heathii* (1mal) und *Ruschia cradockensis* (1mal) vorhanden. Die Flächen können weiterhin zumeist der Assoziation *Gibbaeteum nuciformis* zugeordnet werden. Auch hier ist das Auftreten von *G. nuciforme* diagnostisch für die Zuordnung. Hingegen ist das Auftreten von *Pteronia pallens* (6mal) und *P. succulenta* (1mal) zwar typisch, jedoch nicht diagnostisch. Die Vegetationsaufnahmen im Bereich der Populationen G8 und G12 wurden aufgrund des

gemeinsamen Auftretens von *Gibbaeum pubescens* und *G. nuciforme* der Assoziation *Gibbaeetum pubescentis* und hier der Subassoziation *Gibbaeetum pubescentis gibbaeetosum nuciformis* zugeordnet. Die Beschreibung des Standortes für die Assoziation *Gibbaeetum nuciformis* von Schmiedel & Mucina (2006) mit leicht alkalischen Bedingungen, relativ hoher Salinität und zum Teil hohem Anteil von Sandsteinschotter, trifft auf die untersuchten Flächen zu. Auch die zum Teil niedrige Artenzahl in der Assoziation (1 bis 6 Arten) ist durchaus typisch - gleichwohl können auch relativ artenreiche Bestände mit 15 bis 20 Arten auftreten (Schmiedel & Mucina, 2006).

Endemische Arten der Quarzflächen-Flora der Kleinen Karoo sind auf den untersuchten Flächen neben *Gibbaeum nuciforme* noch *G. heathii* und *G. pubescens*; dies sind drei der insgesamt 9 Arten, die auf den Quarzflächen der Kleinen Karoo endemisch sind (Schmiedel, 2002). Andere Taxa, wie *Pteronia pallens*, *Malephora lutea* oder *Salsola sp.*, kommen in den Quarzflächen sowie auch in der umgebenden Vegetation vor.

Die Clusteranalyse der Vegetationsdaten der Populationen von *G. nuciforme* hat zwei Großgruppen zum Ergebnis (vergl. Kap. 3.2); der Abgleich mit den Großgruppen aus den molekularen Untersuchungen ergibt Ähnlichkeiten. Eine Gruppe umfasst die Aufnahmen der Populationen G4, G6, G7, G9, G10, G11 und G13 und ähnelt in der Zusammensetzung etwa der Ost-Gruppe aus den AFLP-Untersuchungen (G4 und G13 befinden sich in den AFLP Ergebnissen jedoch in der West-Gruppe). Die zweite Gruppe, die Ähnlichkeit mit der West-Gruppe der AFLP-Untersuchungen aufweist, umfasst die Vegetationsaufnahmen der Populationen G3, G5, G8, G12, G14 und G15 (G8 wird aufgrund der AFLP-Ergebnisse der Ost-Gruppe zugeordnet). Die Population G4 gruppiert basal mit den Populationen der Ost-Gruppe. Population G13 findet sich in der Gruppe, die als einzige Art nur *G. nuciforme* aufweist, ebenfalls innerhalb der Ost-Gruppe, die ansonsten die Populationen G6, G7, G9, G10 und G11 umfasst. Population G8 gruppiert aufgrund der Vegetationsdaten mit den Populationen der West-Gruppe (G3, G5, G12, G14, G15). Für Populationen G1 und G2 wurden keine Vegetationsdaten erhoben.

Der Datensatz für die Einordnung der Vegetation ist klein. Es wurde für jede untersuchte Population eine Artenliste angefertigt. Für drei Populationen wurde *Gibbaeum nuciforme* als monodominante Art festgestellt. Hier und auch bei den Aufnahmen mit nur wenigen weiteren Arten lassen sich die Unterscheidungen nicht weiter absichern. *Pteronia pallens* tritt vorwiegend in den Aufnahmen der Populationen im Westen der Kleinen Karoo auf, das Vorkommen von *P. pallens* in der Population G8 kann mit der westlichen Lage der Population innerhalb der Ost-Gruppe gedeutet werden. In der umgebenden Vegetation, außerhalb der Quarzflächen, tritt *P. pallens* im gesamten Verbreitungsgebiet von *Gibbaeum nuciforme* auf.

Die beiden Flächen (G8 und G12), die aufgrund des Vorkommens von *G. pubescens* einer anderen Assoziation zugeordnet wurden, unterscheiden sich nicht grundlegend von den übrigen Flächen. Beide Flächen weisen jedoch einen relativ hohen pH-Wert (7,4 bzw. 7,8) auf. Auch enthält der Boden Carbonat (HCL-Test: 1 bzw. 3) und die Leitfähigkeit des Bodens liegt im mittleren bis hohen Bereich (G8: 5,9 mS/cm bzw. G12: 11,7 mS/cm). Das Substrat ist lehmiger

Ton (TI) der noch in einer weiteren Population (G 13) festgestellt wurde. Die Subassoziation *Gibbaetum pubescentis gibbaetosum nuciformis* weist in der Untersuchung von Schmiedel (2002) ein engeres Habitatspektrum auf als die Assoziation *Gibbaetum nuciformis*, so werden hier höhere Werte für Leitfähigkeit, pH-Wert und Quarzbedeckung ausgewiesen. Die Habitatansprüche der Art *Gibbaeum pubescens* scheinen enger zu sein, als die von *G. nuciforme*.

Fazit der Vegetationsanalyse: Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass die Vegetationsaufnahmen sich eindeutig beschriebenen Assoziationen zuordnen lassen. Die Clusteranalyse weist auf Unterschiede der Vegetation hin und deutet eine Aufteilung auf zwei Gruppen an.

4.1.2.3 Gesteinsbedeckung des Bodens und Hangneigung

Die Werte schwanken von 10 % Quarzbedeckung in Population G10 bis zu 90 % Quarzbedeckung in den Populationen G9, G11 und G14, zudem weist Population G5 keine Quarzbedeckung auf. Ganz ähnlich waren die Beobachtungen von Schmiedel (2002), die eine Bedeckung mit Quarzgrus von 0 - 96 % in den Populationen von *G. nuciforme* (Median 75 %) feststellte. Nicht alle Populationen von *G. nuciforme* kommen auf Flächen mit hoher Quarzbedeckung vor. Vielmehr sind es gerade die beiden Populationen (G5 und G10), die als Refugien diskutiert werden (Abschnitt 4.1.9.4), welche auf Flächen mit einer hohen Sandsteinschotterbedeckung und ohne hohe Quarzanteile wachsen. Auch Schmiedel (2002) hat in seltenen Fällen Flächen mit einer geringen bis fehlenden Quarzbedeckung für die *G. nuciforme*-Gesellschaft festgestellt und zudem eine Bedeckung mit Sandsteinschotter zwischen 0 und 100 % (Median 8 %) dokumentiert. Nach Hartmann (2001) weist der Standort von *G. nuciforme* Quarzbedeckungen in unterschiedlichen Dichten auf. Glen (1974) beobachtete, dass die Art sowohl in Quarz-, als auch in Schieferflächen auftritt.

Eine geringe Hangneigung ist in allen Populationen von *G. nuciforme* beobachtet worden. Ebenfalls geringe Neigungswerte weist auch die Untersuchung von Schmiedel (2002) mit 0 - 11 % Hangneigung (Median 2 %) auf. Möglicherweise bietet eine geringe bis nicht vorhandene Hangneigung den Vorteil, dass Niederschläge nicht von der Fläche abfließen, sondern langsam in den Boden einsickern und somit den Pflanzen zum Teil verfügbar sind. Zudem besteht in stärkerer Hanglage für eingesenkte und niedrigwüchsige Pflanzen die Gefahr, verschüttet zu werden. Da die Pflanzen langsam wachsen und klein bleiben, können sie eine sie bedeckende Substratschicht nicht in absehbarer Zeit durchwachsen, um wieder ausreichend mit Licht versorgt zu werden.

Fazit der Untersuchung von Gesteinsbedeckung und Hangneigung: Die Ergebnisse entsprechen denen, die Schmiedel (2002) für die *Gibbaeum nuciforme*-Gesellschaft, mit einer geringen Hangneigung und schwankender Quarzbedeckung des Bodens, herausgearbeitet hat.

4.1.3 Abschätzung der Populationsgrößen

Die untersuchten Populationen von *G. nuciforme* wiesen zumeist eine hohe Anzahl von Individuen auf. Daher wurden verschiedene Ansätze erprobt, die Größe der Population in Bezug auf Zahl der Individuen und das räumliche Areal effektiv abzuschätzen.

Der gemittelten ausgezählten Dichte der Individuen, dem Produkt aus Länge mal Breite der Population und der geschätzten Individuenanzahl wurde jeweils die mittlere paarweise genetische Distanz (aus den AFLP-Untersuchungen) zwischen den untersuchten Individuen einer Population gegenübergestellt (Abbildung 3-2, Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4). Die mittlere paarweise genetische Distanz der Individuen einer Population ist danach generell dann größer, wenn die Population aus mehr Individuen besteht, diese dichter beisammen stehen, oder wenn die räumliche Ausdehnung der Population größer ist.

Alle drei erhobenen Maße, um die Größe einer Population abzuschätzen, weisen einen positiven Zusammenhang mit der Zunahme der mittleren paarweisen genetischen Distanz der Populationen auf. Sie sind zudem voneinander abhängig. Bei der geschätzten Individuenanzahl für die Population weist die Regressionsgerade den deutlichsten Zusammenhang auf.

Fazit der Populationsgrößenabschätzung: Jedes dieser Maße scheint geeignet für eine Abschätzung der Populationsgröße. Je größer eine Population, desto eher wird man auch eine größere genetische Distanz zwischen den Individuen antreffen. Die Abschätzung der Individuenanzahl ist dabei die Methode, die wenig Aufwand im Gelände bedeutet.

4.1.4 Korrelation von Dichte der Individuen und Quarzbedeckung

Argyroderma pearsonii (Aizoaceae), welche eine ähnliche Wuchsform wie *Gibbaeum nuciforme* aufweist und die auf Quarzflächen der Knersvlakte beschränkt ist, bildet - ähnlich wie *G. nuciforme* - zum Teil monodominante Bestände auf den Flächen (Ellis et al., 2007). Die Dichte der Individuen pro m² variiert: dichte Bestände werden zumeist auf Flächen mit einer hohen Quarzbedeckung angetroffen. Die Autoren (Ellis et al., 2007) vermuten einen Zusammenhang zwischen Dichte der Individuen und der Quarzbedeckung. Die Temperatur der Bodenoberfläche ist auf den Flächen mit Quarz niedriger als in den Bereichen mit wenig oder ohne Quarz (Schmiedel & Jürgens, 2004). So kann es zu einer stärkeren Kondensation von Feuchtigkeit in der Nacht kommen, welche dann eine höhere Dichte an Individuen ermöglicht. Eine Korrelation von Quarzbedeckung und Individuendichte zeichnet sich für die untersuchten Populationen von *G. nuciforme* nur schwach (geschätzte Anzahl der Individuen / Quarzdeckung $r = 0,38$) und nicht signifikant ($p = 0,18$) ab.

Fazit der Korrelationsuntersuchung: Die Dichte der Quarzbedeckung der Bodenoberfläche in den Populationen von *G. nuciforme* ist nach der vorliegenden Untersuchung kein Faktor, der die Dichte der Individuen beeinflusst.

4.1.5 Gruppierung der Individuen und Populationen anhand von Feld-Merkmalen

Die Erhebungen, die an den Individuen von *G. nuciforme* vorgenommen wurden, betreffen einen Ausschnitt möglicher Merkmale. Die Auswertungen ergeben, dass die erhobenen Merkmale nicht ausreichen, um die Individuen bestimmten Populationen sicher zuzuordnen. Dies zeigt zum einen die für jedes Merkmal durchgeführte Diskriminanzanalyse (Abschnitt 3.5) als auch die gemeinsame Darstellung in einer PCA (Abbildung 3-11). Einige Merkmale, wie Blatthöhe, Anzahl der Blattpaare und damit auch der Durchmesser der Individuen, weisen signifikante Unterschiede zwischen den Populationen auf. Einige Parameter, wie die Anzahl der Individuen mit transparenten Bereichen in den Blattspitzen, weisen im Zusammenhang mit der Ost- und Westgruppe, die die AFLP-Untersuchungen ergeben haben, Muster auf, die zu Interpretationen und Vermutungen Anlass geben.

4.1.5.1 Anzahl der Früchte

Drei Viertel der untersuchten Individuen wiesen Früchte auf und sind somit an der Reproduktion beteiligt. Die alten Früchte können bei vielen Aizoaceen über einen längeren Zeitraum, zum Teil mehrere Jahre, an der Pflanze verbleiben und über diese Zeit, bei entsprechenden Niederschlägen, Samen entlassen (Parolin, 2001). Der Verbleib von Fruchtkapseln an der Pflanze ist eine Strategie mit der über einen längeren Zeitraum Samen für Etablierung und Arterhalt zur Verfügung stehen können (Van Rooyen et al., 1990). Hartmann (2006) beschreibt hingegen, dass die Früchte von *G. nuciforme* nicht länger als ein Jahr an den Pflanzen verbleiben. Die Befunde der vorliegenden Untersuchungen (Abbildung 3-5) weisen in 12 Populationen mehr alte (zumindest letztjährige) als frische (diesjährige) Fruchtkapseln auf, in Population G3 und G4 überwogen die frischen Kapseln, in Population G6 wurden an den untersuchten Individuen keine frischen Kapseln gefunden. Wenn die Kapseln maximal ein Jahr an der Pflanze verbleiben, dann sollte die Anzahl der alten Kapseln einer Pflanze zumeist niedriger sein als die Anzahl der jungen frischen Kapseln, da über das Jahr vermutlich Kapseln verloren gehen. Es könnten auch keine alten Kapseln mehr vorhanden sein. Liegt die Zahl der alten Kapseln trotz der angenommenen Verluste weit über der Zahl der frischen Kapseln, so kann vermutet werden, dass die alten Früchte sich über einen längeren Zeitraum an den Pflanzen angesammelt haben.. Die Betrachtung der Daten nach Anzahl der Individuen mit frischen und alten Kapseln pro Population (Abbildung 3-6) weist für 13 Populationen ein starkes Überwiegen der alten Kapseln auf, einzig in Population G5 überwiegt die Zahl der Individuen mit frischen Kapseln, in Population G10 ist das Verhältnis von alten zu jungen Kapseln ausgeglichen. Ob und wie viele Samen in den Früchten enthalten waren, wurde nicht untersucht, so kann keine Aussage darüber getroffen werden, über welchen Zeitraum die Kapseln zu Ausbreitung und Arterhalt beitragen.

4.1.5.2 Behaarung der Blätter - *Gibbaeum pilosulum*

Hartmann (2001) führt innerhalb der Gattung *Gibbaeum* auch die Art *G. pilosulum*. Diese Art unterscheidet sich von *G. nuciforme* ausschließlich dadurch, dass die Blattpaare eine Behaarung aufweisen (Hartmann, 2001). Nach diesem Merkmal wären einige der untersuchten Individuen aus verschiedenen Populationen von *G. nuciforme* möglicherweise als *G. pilosulum* anzusprechen. In zwei Populationen (G8 und G14) wurden durchgehend behaarte Individuen festgestellt. Was also legt die Vermutung nahe, dass es sich bei allen untersuchten Individuen um eine Art, nämlich *G. nuciforme*, handelt? In acht weiteren Populationen (G3, G4, G5, G6, G7, G9, G11 und G13) wurden behaarte Individuen festgestellt, die in verschiedenen Verhältnissen mit unbehaarten Individuen zusammen in den Populationen auftraten. In den Ergebnissen der molekularen Untersuchungen wurden die Populationen G8 und G14 nicht von den übrigen abgegrenzt, so dass es hier keinen Hinweis auf eine Auftrennung der untersuchten Individuen auf zwei Arten gibt. Vielmehr werden die beiden Populationen verschiedenen Großgruppen zugeordnet (Ost- bzw. Westgruppe). Auch gruppierten die behaarten Individuen der verschiedenen Populationen zusammen mit den nicht behaarten Individuen einer Population. Dies wird in einer PCO-Analyse (Abbildung 4-1) der AFLP-Daten deutlich, in der die Individuen nach dem Merkmal behaart / kahl gelabelt wurden. Daher wird angenommen, dass es sich bei den untersuchten Individuen um Individuen von *G. nuciforme* handelt. Auch Thiede (in Schmedel, 2002 mündlich) schlägt vor, *G. pilosulum* in *G. cryptopodium* (= *G. nuciforme*) zu versenken.

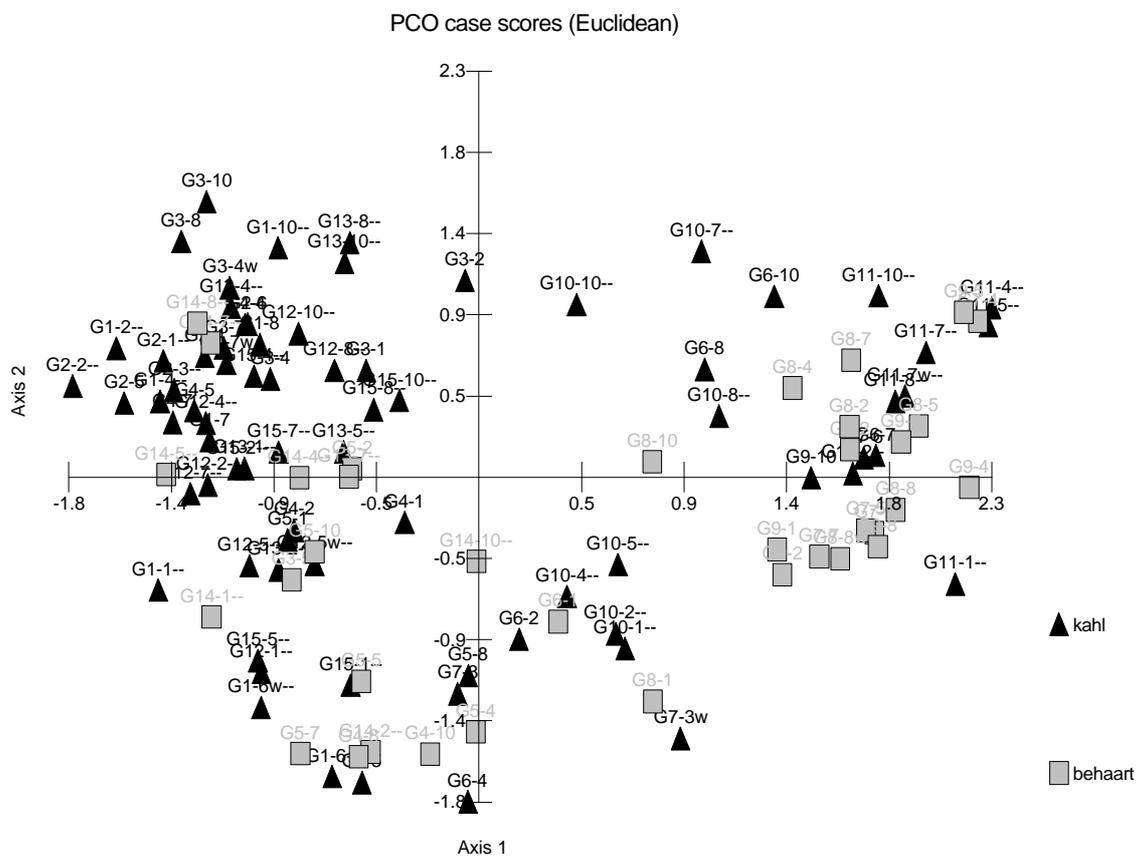


Abbildung 4-1: PCO der AFLP Daten für die drei Teildatensätze A, B und kombiniert, Individuenlabel: schwarzes Dreieck = kahl, graues Quadrat = behaart

4.1.5.3 Blatthöhe über dem Boden

Nach Hartmann (2006) weisen innerhalb der Gattung *Gibbaeum* folgende Arten in den Boden eingesenkte Blätter auf: *G. johnstonii*, *G. nebrownii* und *G. nuciforme*, wobei Klak (2000) *G. johnstonii* nicht als eigenständige Art, sondern als zu *G. nebrownii* gehörig aufführt. Die Blatthöhe über dem Boden ist bei der Art *G. nuciforme* ein Merkmalszustand, der von Boden und Niederschlag in der unmittelbaren Umgebung der Pflanzen abhängt und demnach auch über den Jahresverlauf veränderlich ist (Hartmann, 2001). Das Einsenken der Pflanzen in den Boden wird als Schutz vor Verdunstung interpretiert. Die Tiefe kann, je nach Wasserversorgung der Pflanze, schwanken (Hartmann, 2001). Glen (1974) beschreibt, dass die gesamte Pflanze nicht weit über die Bodenoberfläche hinaus wächst. Er leitet daraus auch eine Erklärung für die vermutete oder vermeintliche Seltenheit der Art ab, da sie gut getarnt ist und somit häufig übersehen wurde. Einen zusätzlichen Verdunstungsschutz bilden auch die Reste der vorjährigen Blätter, die als schützende Pergamenthülle das jüngste Blattpaar zeitweilig teilweise umgeben (Hartmann, 2001). Des Weiteren wird das Einsenken der Blätter als Schutz vor Fraß interpretiert, da die eingesenkten Blattkörper für grasende Wirbeltiere schlecht zu erreichen sind (Hartmann, 2006). Für *Fenestraria* (Aizoaceae) wird das Einsenken in den Boden vor allem als Schutz vor Sandstürmen und deren Sandstrahleffekt (Jürgens, 1996) angenommen. Sandstürme sind jedoch im Bereich der Kleinen Karoo kein Standortfaktor, es treten viele langlebige hochsukkulente Pflanzen auf, die keinerlei Schutzmechanismen vor Sandstürmen aufweisen. Hohe Bodenfeuchte kann der Grund für ein weites Herausragen der Pflanzen sein. Die Bodenfeuchte wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Pflanzen benachbarter Populationen und mit ähnlichen Boden- und Habitatverhältnissen wiesen ähnliche Ausprägungen auf. Ähnliche Höhen bei benachbarten Populationen können, unter anderem, auf ähnliche lokale Standortbedingungen, wie Niederschlag und Boden, zurückgeführt werden.

Im Gewächshaus ragen die Blätter nahezu vollständig aus dem Substrat heraus. Vermutlich ist hier die Wasserversorgung optimal und somit ein Einsenken nicht notwendig. Unter gärtnerischem Aspekt ist das starke Einsenken der Blätter in Kultur nicht erwünscht, da diese Pflanzen dann nur schwierig vor Pilzbefall bewahrt werden können.

Die lokale Anpassung der Individuen und die ökologische Plastizität der Pflanzen sind ausschlaggebend für das Einsenken in den Boden. Auch sind Individuen einer Population, je nach Habitatnische, sehr unterschiedlich hoch und zum Teil in Bezug auf dieses Merkmal stärker innerhalb einer Population von einander unterschieden als verschiedene Populationen. Dies fällt besonders stark bei Individuen auf, die im Schutz von anderen Pflanzen wachsen oder zwischen größeren Steinen eine Nische gefunden haben. Bei diesen ist (nach Feldbeobachtungen) die Höhe über dem Boden größer als bei frei stehenden Exemplaren.

Trotz der Schwankungen der Blatthöhen innerhalb von Populationen weisen die mittleren Ränge der Blatthöhe zwischen den beiden Populationsgruppen (Ost und West) hoch signifikante Unterschiede auf (Abschnitt 3.6). Es wird deutlich, dass die Individuen der Ost-

Gruppe - sie ragen im Mittel 6,8 mm aus dem Boden - tiefer eingesenkt sind als die Individuen der West-Gruppe, die im Mittel 9,5 mm aus dem Boden ragen. Der Ostteil der Kleinen Karoo befindet sich in der Übergangszone zwischen Winterregengebiet im Westen und Sommerregengebiet weiter im Osten. Die Angaben für die Stationen Montagu (im Westen der Kleinen Karoo) und Oudtshoorn (im Osten) weisen Unterschiede in der Verteilung des Niederschlags über den Jahresverlauf auf. In Oudtshoorn gibt es zwei kleinere Regenmaxima im November und im März. Im östlichen Verbreitungsgebiet überwiegt somit in jedem Monat die Verdunstungsrate gegenüber dem Niederschlag, so dass hier im Jahresverlauf durchgehend aride Verhältnisse herrschen. Im Westen (Montagu) hingegen herrscht in den Wintermonaten Mai bis August humides Klima, in dem der Niederschlag höher ist als die Verdunstungsrate. Die Ursache für die Unterschiede der Höhen der Blattpaare könnte mit den unterschiedlichen Niederschlagsregimen in Zusammenhang gebracht werden. Für die Pflanzen von *G. nuciforme* im Ostteil des Verbreitungsgebietes ist der Schutz vor Wasserverlust wegen der ariden Verhältnisse das gesamte Jahr über relevant. Im Westen gibt es den Zeitraum des Winterregens, in dem die Pflanzen photosynthetisch aktiv sind und aufgrund des humiden Klimas die Verdunstungsverluste durch den Niederschlag kompensieren können.

Fazit der Blatthöhenuntersuchung: Die Individuen der Ost-Populationen weisen eine geringere Höhe über dem Boden auf als die der West-Populationen. Es wird dahingehend spekuliert, dass das Merkmal der Blatthöhe über dem Boden als Indikator für die Wasserversorgung der Individuen interpretiert werden kann. Die Unterschiede zwischen den Populationsgruppen können sich über den Jahresverlauf möglicherweise verändern.

4.1.5.4 Transparente Bereiche der Blattspitze

Das Vorhandensein eines transparenten Bereiches in den Blattspitzen weist eine räumlich unterschiedliche Verteilung auf. In den Populationen G6 bis G11 weist die Mehrzahl der Individuen einen transparenten Bereich in der Blattspitze auf. In den anderen Populationen überwiegt entweder der Anteil der Pflanzen ohne transparente Bereiche (G1, G2, G4, G5 G13 und G14) oder beide Merkmalsausprägungen kommen zu gleichen Teilen vor. Letzteres ist in drei Populationen (G3, G12, G15) der Fall. Das Vorhandensein eines transparenten Bereiches in der Blattspitze ist ein Merkmal, das die Aufteilung der Populationen auf zwei Gruppen (Ost und West) unterstützt (Abbildung 3-9, Abbildung 4-2).

Die transparenten Bereiche der Blattspitze sind in einigen Arten zu einem Fenster ausgebildet. Dabei handelt es sich dann um eine durchgehende, einheitliche transparente Fläche, unter der sich lichtdurchlässiges Gewebe befindet. In anderen Arten sind es kleine Flächen, wie bei *G. nuciforme*, oder Linien an der Blattspitze, die transparent sind. In dem transparenten Bereich finden sich keine Spaltöffnungen (Krulik, 1980). Das Auftreten mehr oder weniger deutlicher transparenter Bereiche in den Blattspitzen ist für verschiedene Gattungen der Aizoaceae, wie *Fenestraria* und *Lithops*, als eine Anpassung an die Wachstumsbedingungen der Pflanzen interpretiert worden. Die Blätter der Pflanzen sind in den Boden eingesenkt (siehe 4.1.5.3); dies wird als Schutz vor Sandstürmen, die wie ein Sandstrahlgebläse wirken können, und vor hoher

Transpiration verstanden (Jürgens, 1996, Hartmann, 2001, Hartmann, 2006, Krulik, 1980, Hammer & Hartmann, 1990). Die transparenten Bereiche der Blattspitze leiten Licht in den eingesenkten Blattkörper. Krulik (1980) hat gezeigt, dass entsprechendes Licht durch die Zellschichten der Blätter zu den chlorophyllhaltigen Zellen durchdringen kann. Der transparente Bereich in der Blattspitze wirkt wie ein Oberlicht, welches das Sonnenlicht in den eingesenkten Blattkörper leitet. Nach Untersuchungen von Krulik (1980) wird die Fläche, auf die das Sonnenlicht fällt, bei einigen Taxa damit nahezu verdoppelt, ohne dass sich der Wasserverlust durch Transpiration erhöhen kann, da die Blattoberfläche nicht vergrößert wird. Diese Strategie wird von Krulik (1980) als optimal für Pflanzen mit eingesenkten Blättern und CAM-Photosynthese (Crassulacean Acid Metabolism) beschrieben. Egbert & Martin (2000) konnten in ihren Untersuchungen an drei verschiedenen Taxa, darunter auch *Lithops* (Aizoaceae), keine signifikante Steigerung der Photosyntheserate durch die Blattfenster messen. In ihren Experimenten wurden die Fenster der Pflanzen abgedeckt und der CO₂-Wechsel gemessen. Zwischen den abgedeckten und den unbedeckten Exemplaren konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden. So konnte die Annahme, dass die Blattfenster den Pflanzen zur Steigerung der Photosynthese dienen, bisher nicht bestätigt werden. Egbert & Martin (2000) haben in ihrem Experiment an Gewächshauspflanzen gearbeitet, die vorher nicht in den Boden eingesenkt kultiviert worden waren. Aus der Versuchsbeschreibung ist nicht ersichtlich, ob die Pflanzen unter Wasserstress waren. Für das Verständnis der ökophysiologischen Ursachen und Konsequenzen von Fensterblättern und transparenten Blattbereichen ist demnach weitere Forschungsarbeit notwendig. Sukkulente Pflanzen mit eingesenkten Blattkörpern und Blattfenstern treten in den Familien Asteraceae, Liliaceae (s.l.) und Aizoaceae verbreitet auf (Kruklik, 1980), so dass die Vermutung bestehen bleibt, dass das Blattfenster den Pflanzen unter bestimmten Bedingungen einen Selektionsvorteil bietet. Hartmann (1978a) interpretiert die Fensterbereiche der Blätter zudem als Expansionsbereich für die Erweiterung des Wasserspeichervolumens, welcher sich bei Wasseraufnahme des Blattes konvex aufwölbt und bei geringem Wassergehalt des Blattes konkav einsenkt.

Der Ostteil der Kleinen Karoo befindet sich klimatisch zwischen dem Winterregengebiet und einer Übergangszone zum weiter östlich gelegenen Sommerregengebiet. Möglicherweise ist dieses unterschiedliche Niederschlagsregime ein Grund dafür, dass die östlichen Populationen einen größeren Anteil Individuen mit transparenten Bereichen in den Blattspitzen aufweisen. Da im Osten der Niederschlag auch in den Sommermonaten fallen kann, wäre ein Schutz vor zu hoher Transpiration für die dann photosynthetisch aktive Pflanze wichtig. Die Befunde der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass transparente Bereiche im Blatt der Pflanzen unter bestimmten Niederschlagsregimen für die Pflanzen vorteilhaft sein können. Im Westen des Verbreitungsgebietes herrscht Winterregen vor, hier ist die Phase mit dem Hauptniederschlag nicht mit hoher Verdunstung durch hohe Temperaturen gekoppelt. Die transparenten Bereiche in den Blattspitzen können für die Pflanzen der östlichen Populationen einen Selektionsvorteil darstellen, zumindest in solchen Jahren, in denen das Niederschlagsregime in der Übergangszone eher in Richtung Sommerregen tendiert. Die heutige Verbreitung der

transparenten Bereiche in der Blattspitze in den Populationen kann auf die Ausstattung der vermutlichen Refugialpopulationen zurückgeführt werden. In Population G10 (im östlichen Refugium) überwiegt heute der Anteil der Pflanzen mit transparenten Bereichen in der Blattspitze (8 Individuen mit Transparenz, 2 ohne). Möglicherweise unterlag diese Population einem Selektionsdruck in Richtung der transparenten Bereiche in der Blattspitze, da es sich hier um (bezogen auf das Verbreitungsgebiet dieser Art) die Population handelt, die am stärksten den Übergangsbedingungen zum Sommerregen ausgesetzt war. In Population G5 wiesen alle betrachteten Individuen keine transparenten Bereiche der Blattspitzen auf. Folgt man der Annahme (Abschnitt 4.1.9), dass die Wiederbesiedlung der Kleinen Karoo mit *G. nuciforme* aus zwei Refugien (es werden Population G5 und G10 als Refugialpopulationen angenommen) erfolgte, so kann vermutet werden, dass der Selektionsdruck und der genetische Flaschenhals, denen die Refugialpopulationen unterworfen waren, zu der unterschiedlichen Verteilung des Merkmals „transparente Bereiche in der Blattspitze“ beigetragen hat.

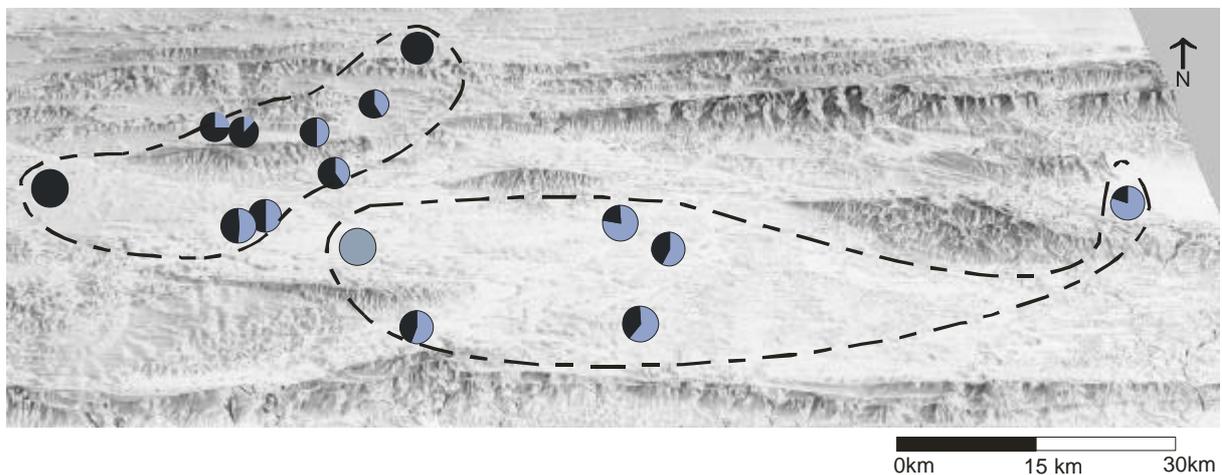


Abbildung 4-2: Kleine Karoo mit Kreisdiagrammen für transparente Bereiche in den Blattspitzen bei *G. nuciforme*, je Population dargestellt, grau= Individuen mit transparenten Bereichen, schwarz= Individuen ohne transparente Bereiche, 10 untersuchte Individuen pro Population, gestrichelte Linien fassen die Populationen nach Ost- bzw. Westgruppe zusammen

Betrachtet man die Diskussion der Ergebnisse zur Blatthöhe und die zu transparenten Bereichen in der Blattspitzen so zeigt sich, dass die Interpretation beider Merkmale zusammengehört, da die Transparenz der Blattspitzen erst in Kombination mit dem Einsenken der Blätter einen möglichen Standortvorteil bringen kann. Dieser Vorteil wird nur an Standorten wirksam, an denen entsprechende Bedingungen - wie der klimatische Übergangsbereich zum Sommerregengebiet - einen Selektionsdruck ausüben.

Fazit Blattspitzentransparenz: Der transparente Bereich in der Blattspitze ist ein Merkmal, das die Aufteilung der Populationen auf zwei Gruppen (Ost und West) unterstützt. Vor dem Hintergrund der klimatischen Unterschiede im Gebiet und in Kombination mit dem Einsenken der Blätter in den Boden ist das Merkmal nicht zufällig räumlich unterschiedlich verteilt.

4.1.5.5 Weitere Merkmale

Weitere Merkmale, die an den Pflanzen erfasst wurden, wie Blattmaße, Ausprägung des Blattspaltes oder der Blattform, lieferten wenig oder keine Informationen zu den Populationen oder der Gruppierung in eine Ost und West-Gruppe (vergl. Abschnitte 3.5 und 3.6).

Fazit weiterer Merkmale: Eine Zuordnung von Individuen zu Populationen ist über die erhobenen Merkmale - weder einzeln, noch in Kombination - nicht möglich. Die anhand der AFLP-Daten aufgezeigten Populationsgruppen werden durch einige Merkmale wie Blatthöhe oder transparente Blattbereiche unterstützt.

4.1.6 Einsatz von AFLPs zur Untersuchung von Populationen

AFLPs konnten für die Untersuchung von Unterschieden zwischen Individuen und Populationen von *G. nuciforme* erfolgreich eingesetzt werden. In einem Review fassen Savekoul et al. (1999) zusammen, dass AFLPs für unterschiedliche Organismen für phylogenetische und Diversitäts-Fragestellungen erfolgreich eingesetzt wurden. Gegenüber anderen Methoden waren AFLPs gut reproduzierbar und wiesen einen hohen Anteil an Polymorphismen auf (Savelkoul et al., 1999). Populationsuntersuchungen mit AFLPs haben unter anderem Schmidt & Jensen (2000) an *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae), Wang et al. (2003) an *Picea abies* (Pinaceae), Ellis et al. (2007) an *Argyroderma pearsonii* (Aizoaceae) oder Lindqvist-Kreuze et al. (2003) an *Rubus arcticus* (Rosaceae) erfolgreich durchgeführt. Verglichen mit den weiteren in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden wie RAPDs, ISSRs oder ccSSR, ließen sich die AFLPs zuverlässig reproduzieren. Daher wurden AFLPs für die Populationsuntersuchungen an *Gibbaeum nuciforme* und auch für die Gattungsuntersuchung umfangreich eingesetzt.

4.1.7 Marker im Chloroplastengenom

Für die Chloroplasten-Untersuchungen wurden nichtkodierende Abschnitte des Chloroplastengenoms amplifiziert, wie Introns und Spacer. In den untersuchten PCR-Produkten der eingesetzten Primerkombinationen und auch nach dem Schneiden der Produkte mit Restriktionsenzymen wurden keine Polymorphismen zwischen den untersuchten Individuen entdeckt. Untersuchungen mit Markern im Chloroplastengenom haben z. B. für *Quercus robur* (Dumolin et al., 1995), *Fagus sylvatica* (Demesure et al., 1996) oder *Fallopia* (Hollingsworth et al., 1999) Polymorphismen zwischen den Individuen einer Art und zwischen verwandten Arten ergeben. Mit den eingesetzten ccSSR-Primern (Chung & Staub, 2003) konnten keine Polymorphismen zwischen den untersuchten Individuen festgestellt werden. Der Einsatz von weiteren Primern und Individuen könnte dieses Bild möglicherweise verändern, dieses ist aber nicht sehr wahrscheinlich. Da die Vermutungen, dass im Chloroplastengenom kaum Polymorphismen zu detektieren sind, durch die Ergebnisse der Chloroplasten PCR-Restriktion sowie durch die Arbeit von Klak et al. (2003b) unterstützt werden, wurde die Arbeit mit diesen Markern nicht weiter verfolgt. Klak et al. (2003b) interpretieren das Fehlen von Polymorphismen im Chloroplastengenom auf Familienebene als Ergebnis schnellen Radiation der Arten, so dass

sich nur sehr wenige Mutationen im Chloroplastengenom entwickeln und manifestieren konnten. Dies gilt bei den Aizoaceae auch für die Ebene der Gattung und der Population.

4.1.8 Molekulare Varianz der Populationen

Fast 60 % der molekularen Varianz (AMOVA) der mit AFLPs untersuchten Individuen findet sich als Varianz innerhalb der Populationen. Somit zeigt sich in den Populationen eine hohe genetische Diversität. Dies deutet auf einen gewissen Grad von Isolation (der Populationen zueinander) hin, den Kimura & Weis (1964) postulieren, damit sich Unterschiede zwischen Populationen akkumulieren können. In Populationen krautiger Pflanzen wird weniger als ein Migrationsereignis zwischen Populationen pro Generation angenommen, wenn diese mehr als einen Kilometer Abstand voneinander haben (Hamrick, 1987). Diese Annahmen von Hamrick (1987) sind sehr generell und treffen nicht für alle krautigen Pflanzen zu. So können vermutlich Pflanzen mit windausgebreiteten Samen mehr Migrationsereignisse aufweisen. Die geringe Zahl der Migrationsereignisse macht deutlich, dass es zwischen den Populationen nur einen sehr geringen genetischen Austausch gibt und somit die genetische Varianz innerhalb der Populationen groß ist. Ellis et al. (2007) haben für Populationen von *Argyroderma pearsonii* (Aizoaceae) in der Knersvlakte sogar 91 % der genetischen Varianz innerhalb der Populationen festgestellt. Zwischen der Ost- und der West-Gruppe wird ein Viertel (25,81 %) der Varianz erklärt (Abschnitt 3.8.2.5). Dies weist darauf hin, dass zwischen den Gruppen der Genfluß stärker eingeschränkt ist - oder war - als innerhalb der jeweiligen Gruppe, da hier 15 % der Varianz auftreten. Die in dieser Untersuchung und auch die von Ellis et al. (2007) festgestellte, mosaikartige Struktur von genetisch unterschiedlichen und isolierten Populationen unterstreicht die reproduktive Isolation der Populationen. Diese Isolation führt zu einer Verstärkung der genetischen Diversität (Rieseberg et al., 2003). Die Annahmen von Ihlenfeldt (1994), dass eingeschränkter Genfluß sowie die Vielfalt von Habitatnischen der Sukkulente Karoo Mitursache für die schnelle Radiation der Aizoaceae ist, wird durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt.

Nyboom (2004) hat in einem Vergleich von mehreren Populationsstudien mit molekularen Markern herausgearbeitet, dass die genetische Diversität innerhalb und zwischen den Populationen mit den „life history traits“ - wie z. B. Lebensform oder Fremdbestäubung - einer Art zusammenhängt. So zeigen langlebige, auskrenzende und in der Endphase der Sukzession auftretende Arten die höchste genetische Variabilität innerhalb der Populationen, während annuelle, selbstbestäubende und in der Anfangsphase der Sukzession auftretende Arten die höchste genetische Variabilität zwischen den Populationen aufweisen. *G. nuciforme* ist eine langlebige Art. Dass die Art *G. nuciforme* zudem hauptsächlich fremdbestäubt ist, ist eine Annahme, die sich auf Ergebnisse einer Untersuchung von Mayer & Pufal (eingereicht) an langlebigen Vertretern der Unterfamilie Ruschioideae (Aizoaceae) bezieht. Die Autorinnen konnten an Arten aus den Gattungen *Cheiridopsis*, *Leipoltia* und *Ruschia* zeigen, dass die Pflanzen kaum Früchte ansetzten, wenn Bestäuber ausgeschlossen waren bzw. wenn die Pflanzen mit eigenem Pollen von Hand bestäubt wurden. Aufgrund dieser Untersuchungen wird

hier auch für *G. nuciforme* Fremdbestäubung angenommen. Die Art tritt in langlebigen Gesellschaften und damit vermutlich zum Ende der Sukzession auf. Die Ergebnisse der AMOVA (mit 58,82 % Innerpopulations-Variabilität, Abschnitt 3.8.2.5) zeigen, dass die Annahmen, die Nybom (2004) machte, sich hier bestätigen lassen, nämlich dass die größte genetische Variabilität innerhalb der Populationen auftritt. Dies ist nach Nybom (2004) nahezu unabhängig davon, wie groß das Verbreitungsgebiet der Art ist. Für *Mesembryanthemum crystallinum*, eine annuelle und überwiegend selbstbestäubende Aizoaceae, die an gestörten Stellen in Küstennähe in frühen Stadien der Sukzession auftritt, konnte dagegen keine klare Übereinstimmung mit den Aussagen von Nybom (2004) gefunden werden (Elling, 2004). Für *M. crystallinum* wurde mit SSR Markern innerhalb von Populationen die höchste Variabilität (44,45 %) gefunden, jedoch ist die Variabilität zwischen den Gruppen mit 38,67 % nicht viel geringer (Elling, 2004). Diese hohe Variabilität zwischen den Gruppen unterscheidet die Befunde für *M. crystallinum* jedoch deutlich von denen für *G. nuciforme*.

Durka et al. (2004) haben mit AFLP-Analysen Populationsuntersuchungen an der in Namibia endemischen Scrophulariaceae *Chamaegigas intrepidus* durchgeführt. Die Art tritt auf Inselbergen in temporären Wasserbecken auf. Da es mehrere Becken auf einem Berg gibt, ergaben sich für die AMOVA drei Ebenen der Variation (in %): innerhalb eines Beckens (76,79 %), zwischen allen Becken eines Berges (6,27 %) und zwischen allen Bergen (16,94 %). Von einer Art, die insektenbestäubt und hauptsächlich auskreuzend ist, wird angenommen, dass lokale Populationen genetisch sehr variabel sind und dass die höchste Variabilität innerhalb von Populationen gefunden wird (Hamrick, 1987). Die Befunde der vorliegenden Arbeit stimmen mit der Analyse von Nybom (2004) überein. Für *Chamaegigas intrepidus* konnte weiter gezeigt werden, dass kleine Populationen genetisch nicht verarmt sein müssen, was mit langen und überlappenden Generationen und der hohen Individuendichte auf kleinem Raum, auch bei kleinen Populationen, erklärt wird (Durka et al., 2004). Für *C. intrepidus* wird, ähnlich wie für *G. nuciforme*, angenommen, dass die Art auf ein spezielles Habitat angewiesen ist, welches nur sehr limitiert vorkommt. Dadurch können die Vorkommen dieser Arten als isolierte Inseln in einer für die Art ansonsten unbewohnbaren Matrix angesehen werden.

Fazit der molekularen Varianz: Innerhalb der Populationen wurde eine hohe molekulare Varianz festgestellt. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden zu Pflanzen mit ähnlichen „life history traits“ wie Langlebigkeit der Art, Fremdbestäubung und das Vorkommen in späten Stadien der Sukzession.

4.1.8.1 Fragmentation der Habitate und Verlust von Standorten

Für *G. nuciforme* bedeutet der Verlust von Standorten und die Zerschneidung der Habitate durch die verstärkte Nutzung der Landschaft durch den Menschen möglicherweise eine Gefahr, da dann zu der natürlichen Fragmentiertheit des Vorkommens noch die anthropogen ausgelöste Fragmentierung tritt. Die Art weist, ähnlich wie *Argyroderma pearsonii* in der Knervlakte (Ellis et al., 2007), hohe Werte für die Varianz innerhalb der Populationen auf (Tabelle 3-19). Diese Varianz ist ein Hinweis auf die starke Isolierung der Populationen, welche

auch auf die natürliche Fragmentiertheit der Habitats hinweist. Sowohl *G. nuciforme* als auch *A. pearsonii* sind an die Quarzflächen angepasst, die von je her mehr oder weniger inselhaft ausgeprägt sind. Der rezente Verlust von Habitats ist möglicherweise eine Gefahr für die Arten, da die Prozesse der Habitatzerstörung und -zerschneidung sehr schnell ablaufen können. Dies bedeutet neben der natürlichen fragmentierten Anordnung der Habitats weitere Fragmentation, die die Möglichkeiten der Anpassungsfähigkeit und die Ausbreitungsmöglichkeiten der Art überschreiten können. Die Fragmentiertheit der Landschaft im südlichen Afrika war vermutlich ein wichtiger treibender Faktor für die Radiation verschiedener Taxa (Ihlenfeldt, 1994), da sich Arten entlang von unterschiedlichen Gradienten diversifizieren konnten. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung kann eine Auswirkung von heutiger, anthropogener Fragmentation auf die Populationen von *G. nuciforme* nicht nachgewiesen werden. Die genetische Isolierung der Populationen ist durch natürliche Faktoren, wie das Vorkommen von geeigneten Habitats, geprägt.

Die genetische Varianz innerhalb der Populationen ist bei *G. nuciforme* höher als z. B. die bei *Changium smyrnioides* (Apiaceae) (Qui et al., 2004). Hier ist die genetische Variation zwischen Populationen von *C. smyrnioides* (ca. 48 %) fast ebenso groß wie innerhalb von Populationen (etwa 52 %). *C. smyrnioides* ist eine seltene Art, deren Habitat in China durch Landnutzung stark der Fragmentierung unterworfen ist. Durch die Fragmentation ist der Genfluss zwischen den Populationen sehr niedrig, was auch mit der isolierten Lage der Populationen zueinander und der nur sehr geringen Ausbreitungsdistanz der Samen (unter 2 Meter) erklärt wird (Qui et al., 2004). Bei dieser Art scheint sich die Fragmentierung durch den Verlust von Allelen in Populationen auszuwirken, möglicherweise in engem Zusammenhang mit der Abnahme der Populationsgröße. Dies kann letztendlich zu einem Verlust von genetischer Varianz innerhalb von Populationen führen. Ein stärkerer Gen-Austausch könnte in der Vergangenheit - vor der anthropogenen Habitat-Fragmentierung - existiert und zu einem höherem Heterozygotiegrad innerhalb der Art geführt haben, der jetzt nicht mehr in diesem Maße existiert. Für *G. nuciforme* wird nicht angenommen, dass die Habitats in der Vergangenheit zusammenhängender waren als heute, da die Spezialhabitats der Quarzflächen immer schon eher inselhaft ausgeprägt waren.

Fazit zur Fragmentation der Habitats: Es können aufgrund der vorliegenden Ergebnisse mit hoher genetischer Varianz innerhalb der Populationen von *G. nuciforme* bisher keine negativen Auswirkungen von Habitat-Fragmentation nachgewiesen werden. Jedoch weisen die Ergebnisse deutlich die genetische Isolation der Populationen aufgrund der natürlichen Fragmentiertheit der Habitats auf. Die Verstärkung der Flächennutzung im Bereich der Kleinen Karoo in Kombination mit zukünftiger Klimaveränderung kann auch die Populationen von *G. nuciforme* betreffen, indem die Habitats der Art zerstört werden und somit die bisherige Isolation noch verstärkt wird. Dies kann sich negativ auf die genetische Varianz und damit auf die Anpassungsfähigkeit der Art auswirken.

4.1.9 Diskontinuität zwischen Populationen

Viele populationsgenetische Vorgänge sind mit der räumlichen Struktur der Landschaft verflochten (Epperson, 2003). Populationsstudien zeigen genetische und ökologische Unterschiede auf, die mit der räumlichen Struktur zusammenhängen (Manel et al., 2003). "Isolation by distance" (Wright, 1943) ist ein Faktor, der die genetische Struktur der Populationen mitbestimmt, jedoch nicht der einzige und nicht immer der bestimmende Faktor ist. Andere Faktoren, wie Barrieren für den Genfluß oder Einflüsse durch Klimaveränderungen können ebenfalls prägend oder entscheidend sein.

4.1.9.1 Klimaveränderungen im Gebiet des südlichen Afrikas

Zum Ende des Pleistozän (vor 1,75 Mio. bis 10.000 Jahren) und auch im Holozän (begann vor etwa 10.000 Jahren) sind im südlichen Afrika Klimaveränderungen aufgetreten. Dies wurde bisher anhand unterschiedlicher Untersuchungen nachgewiesen.

Zum Ende des Tertiärs, im späten Miozän, vor ca. 5 Millionen Jahren, hat sich das Winterregenklima herausgebildet (Axelrod & Raven, 1978). Als Ursache wird die Verstärkung des Benguela-Stromes vor der Südwest-Küste Afrikas angenommen (Coetzee, 1978, Linder et al., 1992, Siesser, 1980, Scott et al., 1997). Seit dem Ende des Tertiärs herrschen im südlichen Afrika vornehmlich aride Bedingungen.

Scott & Vogel (2000) schließen aus den Veränderungen der Nahrungszusammensetzung bei Klippschliefern, dass es pleistozäne und holozäne Klimaveränderungen im südlichen Afrika gegeben hat. Fossiler Klippschlieferdung wurde hinsichtlich seiner Zusammensetzung aus C-13 / C-12 Isotopen analysiert. Hieraus können Rückschlüsse über die Verhältnisse von C3- zu CAM- und C4-Pflanzen in der Nahrungszusammensetzung der Tiere gezogen werden. Veränderungen im Verhältnis der Isotope führten zu der Annahme, dass sich die Vegetationszusammensetzung ebenfalls geändert hat. Daraus ließ sich wiederum eine Klimaänderung ableiten (Scott & Vogel, 2000).

Scott et al. (1995) fanden, dass vor 15.000 bis 7.000 Jahren - im Übergang von Pleistozän zum Holozän - die Temperaturen im südlichen Afrika um etwa 5 °C gestiegen sind und somit in der Kleinen Karoo eine Veränderung der Vegetation hin zu mehr sukkulenten und verholzenden Pflanzen eintrat. Aus Ablagerungen in einer Quelle im Norden von Südafrika konnten Pollendaten erhoben werden. Hier zeigt sich ein vor etwa 10.700 Jahren einsetzender starker Anstieg von Aizoaceen-Pollen und ein gleichzeitiger Rückgang anderer Pollen u. a. von Chenopodiaceae und Asteraceae (Scott et al., 1995). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine starke Veränderung der Artenzusammensetzung der Vegetation. Die Daten legen die Vermutung nahe, dass es zu einer Klimaerwärmung und damit zu einem allgemein trockeneren Klima gekommen ist. Die allgemeine Feststellung ist, dass es vor etwa 12.000 Jahren im südlichen Afrika feuchter war als heute. Zwischen 14.000 und 10.000 Jahren vor heute gab es eine starke Veränderung in der Artendiversität und in der Zusammensetzung der Arten. Zwischen 11.000 und 10.000 Jahren vor heute wird eine Übergangsphase vom kalten, späten Pleistozän hin zu einer wärmeren, holozänen Umgebung vermutet. Insgesamt betonen die

Autoren, dass diese Veränderungen immer nur für lokal begrenzte Räume festgestellt werden können. Für den Drakensberg im östlichen Südafrika hat Lewis (2005) intensive Sediment-Untersuchungen durchgeführt. In Kombination mit archäologischen Untersuchungen und Radiokarbondatierungen konnte er zeigen, dass es im Spätglazial (vor etwa 15.000 bis 11.800 Jahren) vier Phasen mit erheblichen Klimaschwankungen gab. Hier änderten sich sowohl Temperaturen als auch Niederschlagsmengen. Für das Holozän wurden acht Phasen mit Klimaveränderungen identifiziert (Lewis, 2005).

Die Klimaveränderungen im südlichen Afrika waren lokal durchaus unterschiedlich, so dass die Ergebnisse der Untersuchungen vom Drakensberg nicht direkt auf die Gegebenheiten der Kleinen Karoo übertragen werden können. Die Ergebnisse machen jedoch deutlich, dass es holozäne Klimaveränderungen in dem Gebiet der Kleinen Karoo gegeben hat, die auch zu einer Veränderung der Vegetationszusammensetzung geführt haben, wie sie Midgley et al. (2001) modelliert haben.

4.1.9.2 Diskontinuitäten zwischen den Populationen im Verbreitungsgebiet

Die Ergebnisse der AFLP-Untersuchungen an den Populationen von *G. nuciforme* weisen durch eine Aufteilung der untersuchten Individuen auf Populationsgruppen eine räumliche Struktur auf (Abbildung 4-3). Die Zweiteilung in ein (nord)westliches und ein (süd)östliches Teilverbreitungsgebiet der Art wurde deutlich.

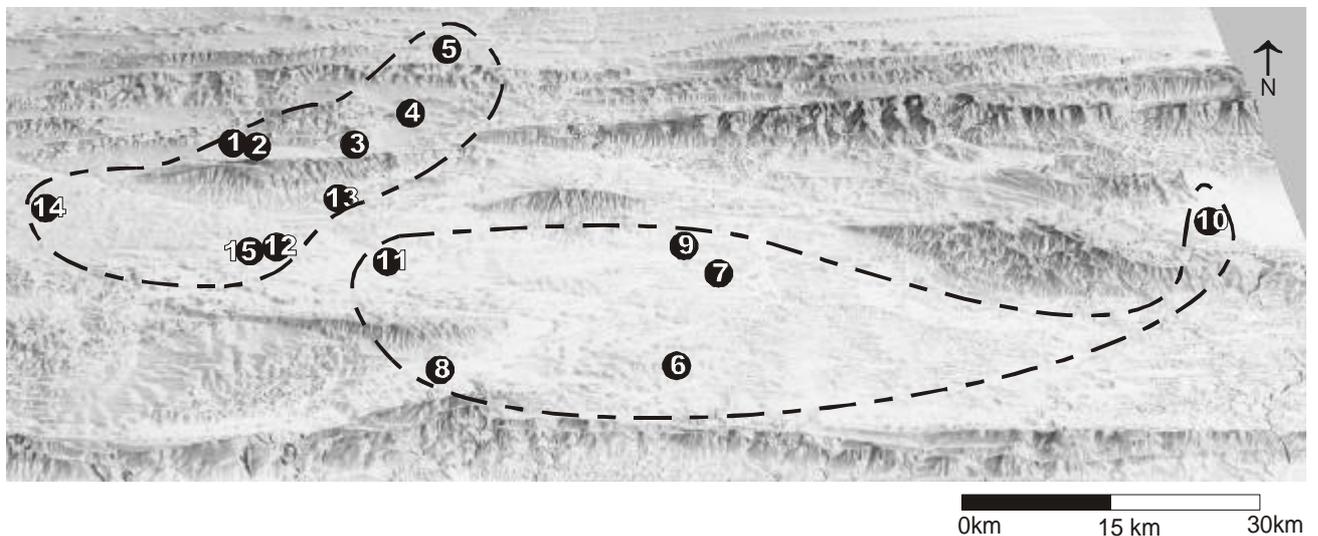


Abbildung 4-3: Höhenmodell der Kleinen Karoo, untersuchte Populationen sind mit schwarzem Kreis und Populationsnummer gekennzeichnet, Ost- und West-Gruppe durch gestrichelte Linien dargestellt

Im Ergebnisteil wurden diese Gruppen, aufgrund ihrer Anordnung im Raum, schon als Ost- und Westgruppe beschrieben (Abschnitt 3.8.2.5). Die Individuen der Populationen G1 bis G5 und G12 bis G15 konnten zu einer West-Gruppe zusammengefasst werden, die Individuen der Populationen G6 bis G11 zu einer Ost-Gruppe. Nur wenige Individuen widersprechen dieser Zuordnung. Die Ergebnisse des Clusteranalysen, der PCO und des Mantel-Tests zeigen, dass

die Beziehungen der Populationen nicht allein über das Konzept „isolation by distance“ (Wright, 1943) erklärt werden können. Bei dem Konzept der Isolierung durch Distanz wird angenommen, dass die Populationen mit zunehmender räumlicher Entfernung auch zunehmend größere genetische Distanzen aufweisen. Nach Kimura & Weiss (1964) ist ein gewisser Grad von Isolation von Individuen oder Gruppen notwendig, um Unterschiede, die durch lokal unterschiedlichen Selektionsdruck oder zufällig durch Mutationen entstanden sind, zu akkumulieren. Erst durch diese Akkumulation können diese Unterschiede deutlich zu Tage treten. Wenn die Migrationsdistanz von Individuen im Vergleich zum gesamten Verbreitungsgebiet kurz ist, dann ist die zufällige lokale Differenzierung von Genotypen wahrscheinlich: „isolation by distance“ (Wright, 1943). Diese Grundannahmen treffen für *G. nuciforme* zu, da die Samenausbreitung bei diesem Fruchttyp in der Regel wenige Meter beträgt (Parolin, 2001, Ihlenfeldt, 1975). Mit dem „stepping stone modell“ haben Kimura & Weiss (1964) die Annahmen von Wright (1943) überprüft. Es wird angenommen, dass die Gesamtpopulation in Kolonien unterteilt ist und die Migration von Individuen in einer Generation auf nahegelegene Kolonien beschränkt ist.

Der Anteil des Genflusses durch die Übertragung von Pollen zwischen Populationen von *G. nuciforme* verbleibt spekulativ. Wäre dieser Einfluss stark ausgeprägt, müsste die genetische Variabilität innerhalb der Populationen geringer sein, da mehr Allele zwischen den Populationen gleich wären. Die Isolierung der Populationen durch Distanz gilt demnach auch für die Bestäuber, da die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass ein Bestäuber mit Pollen die benachbarte Blüte anfliegt, als eine Pflanze aus der selben Population, die sich in größerer Distanz von der ersten Blüte befindet. Der Besuch einer anderen Population, die zumeist mehr als einen Kilometer weit entfernt liegt, ist ein noch selteneres Ereignis als der Besuch von weit entfernten Pflanzen innerhalb einer Population. Der Mantel Test für die untersuchten Populationen weist eine signifikante Korrelation der räumlichen und genetischen Distanzen auf, jedoch ist diese relativ niedrig. Werden diese Distanzen innerhalb der Ost- und West-Gruppe auf Korrelation getestet, so weist die West-Gruppe eine signifikante Korrelation auf, die Ost-Gruppe jedoch nicht. Demnach ist „isolation by distance“ nicht der alleinige prägende Faktor für die Musterbildung der Populationen von *G. nuciforme* in der Kleinen Karoo.

4.1.9.3 Welche Ursachen kann die Diskontinuität der Populationen im Verbreitungsgebiet haben?

Im folgenden Abschnitt werden Hypothesen formuliert, wie Diskontinuitäten innerhalb von Taxa erklärt werden können. Diese werden in Bezug zu den Ergebnissen der Untersuchungen an *G. nuciforme* gesetzt und diskutiert.

Hypothese A: Geografische Barrieren wie Gebirge oder Flüsse, die für die Organismen unüberwindbar sind, trennen die Populationen, oder haben sie in der Vergangenheit getrennt, so kam es zu einer Isolierung.

Für Skorpione im südlichen Afrika nimmt Prendini (2005) Trennungen von Populationen unter anderem durch Verlagerung von Flussläufen an. Die dauerhafte Fragmentierung einer Art, z. B. durch einen Fluss, bildet hier die Grundlage von Gruppen- und daraus resultierenden Artbildungsprozessen.

Eine physische Karte der Kleinen Karoo (Surveys & Mapping, 2000) weist in dem Bereich zwischen den beiden Populationsgruppen keinen Fluss auf, auch ist über einen Flussverlauf in diesem Bereich in der Vergangenheit nichts bekannt. Ebenso sind keine Hügel- oder Gebirgszüge, die eine Barriere bilden könnten, vorhanden. Das Gebiet der Kleinen Karoo ist randlich von Höhenzügen geprägt, in die die Populationen von *G. nuciforme* zum Teil hinein ragen. Im zentralen Bereich, in dem die vorliegende Untersuchung eine Abgrenzung von zwei Populationsgruppen festgestellt hat, gibt es jedoch keine ausgeprägten Höhenzüge. Auch fehlen Hinweise auf das Vorhandensein von Höhenzügen in diesem Bereich in der Vergangenheit. Die Gebirge im Kap-Orogen wurden während der variszischen Gebirgsbildungsphase vor 380 - 240 Millionen Jahren aufgefaltet (Schmidt & Walter, 1990). Klak et al. (2004) nehmen aufgrund phylogenetischer Untersuchungen an, dass die Familie der Aizoaceae vor ca. 26 Millionen Jahren mit der Diversifizierung begann und dass die Unterfamilie Ruschioideae der Aizoaceae, zu der *G. nuciforme* gehört, sich vor etwa 3,8 bis 8,7 Millionen Jahren diversifiziert hat.

Fazit Hypothese A: Aufgrund der deutlichen zeitlichen Trennung der Prozesse kann die Entstehung der Gebirge im südlichen Afrika keinen Einfluss auf die Trennung der Populationen der Art gehabt haben, da die Radiation der Ruschioideae deutlich später als die Gebirgsbildung stattfand. Demnach trifft die oben formulierte Hypothese nicht auf die Art in dieser Untersuchung zu.

Hypothese B: Verbreitungsgebiete an Klimagrenzen (Winter-Sommerregen) können bei Überschreitung der Grenzen zur Aufspaltung von Taxa führen.

Ritz et al. (2003) beschreiben aufgrund molekularphylogentischer Untersuchungen für die Sektion *Meleuphorbia* innerhalb der Gattung *Euphorbia* zwei monophyletische Gruppen. Das Verbreitungsgebiet der einen Gruppe liegt in der Kleinen Karoo mit hauptsächlich Winterregen, die andere Gruppe kommt weiter östlich in einer Region mit vorwiegend Sommerregen vor. Die Entstehung von einem abweichenden Regenfallregime (hier Winterregen, vor ca. 5 Millionen Jahren, (Axelrod & Raven, 1978) und das teilweise Vordringen eines Taxons in dieses wird als Auslöser für die Auftrennung der Sektion interpretiert (Ritz et al., 2003). Innerhalb der Kleinen Karoo wird ein Klimagradient beschrieben: im Westen herrscht Winterregen (Niederschläge von Mai bis August), weiter nach Osten fallen dann die Niederschläge hauptsächlich im frühen November und sehr späten Sommer (März) (Van Wyk & Smith, 2001). Nach van Wyk & Smith (2001) kommt *G. nuciforme* nur im Westen der Kleinen Karoo vor, in dem Winterregen vorherrscht. Der östliche Bereich des Verbreitungsgebietes von *G. nuciforme* liegt schon in der Übergangszone zwischen Winter- und Sommerregen-Gebiet. Hier herrscht ein gegenüber dem

Westen verändertes Niederschlagsregime. Der Übergang vom reinen Winterregen-Gebiet im Westen hin zu den variableren Niederschlägen der Übergangszone vollzieht sich graduell. Es gibt nur wenige Niederschlagsmessungen im Gebiet der Kleinen Karoo, die diesen graduellen Übergang dokumentieren. In Hartmann (2006) findet sich eine Karte mit Niederschlagslinien, die diesen Gradienten darstellt. Klimadiagramme von Montagu, Oudtshoorn, Spes Bona und Riversdale (Schmiedel & Mucina, 2006) weisen ebenfalls auf das unterschiedliche Niederschlagsregime hin. Das sich nach Osten hin verändernde Niederschlagsregime der Kleinen Karoo kann möglicherweise Einfluß auf die Populationen von *G. nuciforme*, in Form von lokal unterschiedlichem Selektionsdruck, ausüben. Wegen des graduellen Übergangs und der Beschränkung der Verbreitung auf den Winterregen- und Übergangsbereich erscheint dieser Einfluss allein jedoch nicht ausreichend, um eine Trennung der Populationsgruppen zu erklären. Die Gattung *Gibbaeum* hat sich zudem, im Gegensatz zu den von Ritz et al. (2003) untersuchten Euphorbiaceae, im Winterregengebiet entwickelt. Als verstärkende Kraft einer Trennung, aufgrund anderer Faktoren, ist das Niederschlagsregime allerdings zu berücksichtigen.

Fazit Hypothese B: Die klimatischen Unterschiede im Gebiet vollziehen sich graduell und können nicht die Abgrenzungen der Populationsgruppen erklären, sie können jedoch vorhandene Unterschiede zwischen den Gruppen möglicherweise verstärken.

Hypothese C: Das unterschiedliche Niederschlagsregime kann unterschiedliche Blütezeiten der Populationsgruppen zur Folge haben, so dass ein genetischer Austausch durch Pollenübertragung zwischen den Gruppen zeitlich nicht mehr möglich wäre.

Zum Zeitpunkt der Probenahme für die molekularen Untersuchungen in der Kleinen Karoo im Oktober wies keine der Populationen von *G. nuciforme* Blüten auf. In allen Populationen waren Individuen mit frischen Fruchtkapseln vorhanden, was als Anzeichen für eine ähnliche oder gleiche Blütezeit interpretiert wird. Nach mehrjährigen Beobachtungen von Thiede (mündlich) und Hartmann (2001) blüht *G. nuciforme* am Standort etwa von Juni bis August. Die Blütezeit der Pflanzen in der Sammlung des Botanischen Gartens der Universität Hamburg liegt um etwa 6 Monate verschoben, in den Monaten November bis Februar (eigene Beobachtungen, Thiede, unveröffentlichte Daten). Da diese Verschiebung für verschiedene Arten der Gattung *Gibbaeum* beobachtet wurde (Thiede, unveröffentlichte Daten) und Ellis et al. (2006) für *Argyroderma*-Arten eine Blühabfolge der Arten beobachteten, die auch im Gewächshaus aufrechterhalten wurde, kann angenommen werden, dass die Blütezeit der Arten an bestimmte äußere Faktoren, wie Tageslänge gekoppelt ist und möglicherweise zum Teil auch genetisch fixiert ist.

Die Blühabfolge der verschiedenen Herkünfte von *G. nuciforme* im Gewächshaus wurde beobachtet. Die Blühabfolge der Pflanzen der Hamburger Sammlung weist bisher nicht auf unterschiedliche Blütezeiten zwischen den verschiedenen Herkünften hin, so dass eine Trennung der Gruppen durch Blütezeiten zurzeit ausgeschlossen wird. Die Beobachtungen zur Blühabfolge werden fortgesetzt, da die bisherigen Daten nur für eine Blühperiode erhoben

wurden und nur wenige der beobachteten Individuen blühten. Einschränkend zu der Aussagekraft dieser Beobachtungen ist anzumerken, dass im Gewächshaus alle Individuen einem identischen Bewässerungsregime ausgesetzt sind. Wenn also der Niederschlag, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten fällt, ausschlaggebend für den Blühzeitpunkt der Pflanzen ist, ist dies im Gewächshaus nicht beobachtbar.

Fazit Hypothese C: Bisher ergeben die Beobachtungen der Blütezeiten keine Hinweise auf unterschiedliche Blühabfolgen der Populationsgruppen.

Hypothese D: Kaltzeiten als Erklärung der Diskontinuität. Kaltzeiten haben in verschiedenen Gebieten auf der Erde Auswirkungen auf die Populationsstrukturen gezeigt. Verdrängung aus dem Hauptverbreitungsgebiet durch Klimaveränderungen im Zuge von Kaltzeiten haben zu Aussterbeereignissen geführt, andere Arten konnten ungünstige klimatische Verhältnisse in einem oder mehreren günstigen Refugien überdauern, von denen sich die Art wieder in die Fläche ausgebreitet hat. Aufgrund von Gründer- und Flaschenhalseffekten ist die genetische Grundausstattung von Reliktpopulationen aus verschiedenen Refugien unterschiedlich.

Prozesse der Verdrängung von Arten durch Kaltzeiten sowie die Wiederbesiedlung nach Kaltzeiten sind verschiedentlich untersucht worden. Es liegen u. a. Untersuchungen aus Europa, Nord- und Südamerika sowie Asien an verschiedenen Organismen vor (Hewitt, 1999, Hewitt, 2000, Petit et al., 2003, Schönswetter et al., 2002, Bull-Hereñu, 2005). Für das südliche und weitere Afrika wurden derartige Untersuchungen bisher kaum veröffentlicht (Richardson et al., 2001).

Die periodische klimatische Fragmentierung von Verbreitungsgebieten verschiedener Taxa trat während der Fluktuationen der pleistozänen glazialen Zyklen im südlichen Afrika wiederholt auf (Richardson et al., 2001, Linder, 2003). Midgley et al (2001) zeigen, dass während des späten Quartärs, im letzten glazialen Maximum (LGM) vor etwa 18.000 Jahren, die mittleren regionalen Temperaturen im südlichen Afrika etwa 3,7 °C kühler waren als heute. Die Autoren legen dar, dass, aufgrund der vorherrschenden Klimabedingungen während des LGM, die räumliche Ausdehnung des Sukkulente Karoo Bioms bei weitem kleiner war als heute und dass es sich zudem möglicherweise weiter nach Norden erstreckte. Große Bereiche Südafrikas, die heute von Sukkulente Karoo Vegetation bestanden sind, waren während des LGM vermutlich mit Fynbos-Vegetation bedeckt (Midgley et al., 2001). Sukkulente Pflanzen, die an aride Umweltbedingungen angepasst sind, wurden von Taxa, die an die kühleren Bedingungen angepasst waren, verdrängt. Gerade Arten der Gattung *Gibbaeum* mit ihrem zwergigen Wuchs können durch Überwachsen rasch verdrängt werden. Eine Erwärmung des Klimas vor 15.000 bis 12.000 Jahren verbesserte die klimatischen Bedingungen für sukkulente Vegetation, was zu einer Ausdehnung der Verbreitung dieses Vegetationstyps führte (Midgley et al., 2001). Die Fynbos Vegetation wurde südwärts und in höher gelegene Bereiche zurück gedrängt, die in etwa den heutigen Grenzen ihrer Verbreitung entsprechen. Zeugnis für historische Veränderungen der Vegetation aufgrund von Klimaveränderungen in Südafrika geben

Pollenfunde in Klippschlieferhöhlen und in Stachelschweinurinablagerungen (Scott et al., 1995, Scott & Vogel, 2000) ebenso fluviale und archäologische Funde (Lewis, 2005).

Fazit Hypothese D: Das Verbreitungsgebiet von *G. nuciforme* wurde durch die Klimaveränderungen beeinflusst, somit hatten die Veränderungen auch Einfluss auf die Art. Möglicherweise wurde sie aus ihrem Hauptverbreitungsgebiet verdrängt und konnte in verschiedenen Refugien überdauern. Von diesen Refugien wurde nachfolgend das Gebiet wieder besiedelt. So kam es zu einer genetischen Trennung der Populationen. Ähnliches wurde in Europa z. B. für Eichen beobachtet (Petit et al., 2003) und in den Alpen für *Phyteuma globularifolium* (Schönswetter et al., 2002).

4.1.9.4 Potenzielle Refugien von *Gibbaeum nuciforme*

Über die Reaktion von Pflanzenarten auf die klimatischen Veränderungen in Afrika ist bisher wenig bekannt, in der Folge bestehen auch Kenntnislücken über potenzielle Refugien und Wiederbesiedlungswege. Auf der Basis von Verbreitungsmustern von verschiedenen Pflanzentaxa in den ariden Regionen Afrikas diskutiert Jürgens (1997) den Einfluss von Klimaveränderungen auf die heutige Verbreitung der Taxa. Danach haben in der Region der "Greater Cape Flora" (sensu Jürgens, 1991) verschiedene Pflanzengruppen klimatische Veränderungen überdauern können, da die bergige Topografie angemessene und unterschiedlichste Habitatnischen für das Überleben dieser Taxa bietet. Midgley et al. (2001) schlagen die Regionen Richtersveld und Knersvlakte (im Nordwesten Südafrikas) als potenzielle Rückzugsgebiete vor, in denen Arten überdauern konnten.

Da die Verdrängung von *G. nuciforme* durch Klimaveränderungen plausibel erscheint, stellt sich die Frage nach der Lage der Refugien. Wenn *G. nuciforme* ungünstige Klimabedingungen in Refugien überdauert und sich von diesen in die Fläche ausgebreitet hat: Wie waren diese Refugien beschaffen? Wo waren die Refugien? Nach Jürgens (1997) bieten gebirgige Bereiche im ariden Afrika sehr unterschiedliche Habitatnischen auf engstem Raum, z. B. je nach Hangexposition. Auch Goldblatt & Manning (2002) weisen auf ein Mosaik aus benachbarten sehr kontrastreichen Habitaten in der gesamten Kapregion hin. In den Randbereichen der Kleinen Karoo, in die auch Gebirgszüge hineinreichen, ist ein kleinräumiges Mosaik verschiedener Habitate vorhanden.

Die Betrachtung der räumlichen Lage der untersuchten Populationen zeigt für einige Populationen von *G. nuciforme* eine randliche Lage im Verbreitungsgebiet. Da das gesamte Verbreitungsgebiet der Art beprobt wurde, kann hier von randlich in Bezug auf die Verbreitung der Art gesprochen werden. In den PCO-Ergebnissen u. a. auf Abbildung 3-24 wird zum einen die Gruppenbildung deutlich, zum anderen kann die Anordnung der Individuen der Populationen G10 und G5 näher betrachtet werden: Beide Populationen sind randlich im Verbreitungsgebiet situiert. Population G10 befindet sich ganz im Osten und ist durch den Paaderberg (1.021 m), die Rooiberge (bis 1.490 m) und die Gamkaberger (bis 1.110 m) von der Ebene der westlich davon gelegenen Kleinen Karoo getrennt. Durch die Flussbetten des Groutrivier nach Süden und kleinere Flusseinschnitte wie der des Caledon Kloof Rivier nach Westen, besteht die

Möglichkeit einer Wander- oder Ausbreitungsrouten von und in das Hauptverbreitungsgebiet von *G. nuciforme* in der Kleinen Karoo. Population G5 befindet sich im Nordwesten des Verbreitungsgebietes südlich von Laingsburg. Der Standort ist durch die östlichen Ausläufer der Witberge (bis 1.412 m), die westlichen Ausläufer des Elandsberges (bis 1.427 m) und der Klein Swartberge (bis 1.700 m) von der Ebene der Kleinen Karoo getrennt. Durch die eingeschnittenen Schluchten des Buffelsrivier ist diese Fläche mit den Flächen der Kleinen Karoo verbunden.

Beide Populationen weisen Standorte auf, die vom direkten Klimageschehen in der Kleinen Karoo durch Gebirgszüge abgeschirmt sind, zudem weist die Umgebung vielfältige Habitatnischen u. a. durch das Relief auf. Dass die beiden Populationsstandorte direkt am ehemaligen Refugialstandort wachsen, ist möglich; zumindest legen die Ergebnisse nahe, dass sich Refugien der Art hier oder im Umfeld der beiden heutigen Populationen G5 und G10 befunden haben.

In der PCO-Analyse finden sich die Individuen beider Populationen mittig innerhalb des Koordinatensystems der PCO, sie weisen gegenüber den übrigen Populationen eine verbindende Sonderstellung auf. Die übrigen Individuen der Ost-Gruppe gruppieren weiter rechts im Koordinatensystem, die der Westgruppe weiter links. Die Individuen der Populationen G10 und G5 können als Nachfahren von Refugialpopulationen in diesem Bereich verstanden werden und bilden in der PCO ein verbindendes Element zwischen den Gruppen. Ihre Lage am Rand des Verbreitungsgebietes in Lagen, in denen unterschiedliche Habitatnischen auf engem Raum vorhanden sind, sowie die räumliche Anbindung an das Hauptverbreitungsgebiet, sind Indizien, die für eine solche Annahme sprechen. Von diesen Refugien aus konnte sich die Art, nach weiteren Klimaveränderungen - hin zu weniger Niederschlägen - in der Fläche ausbreiten. Die Populationen G5 und G10 weisen eine verbindende Stellung innerhalb der Struktur der Populationen auf. Demnach sind die Populationen der westlichen Gruppe aus Ausbreitungsereignissen von Population G5 (oder deren Vorgänger) entstanden. Hier weisen die Ergebnisse des Mantel-Tests für die West-Gruppe eine signifikante Korrelation von genetischer und räumlicher Distanz auf. Somit ist eine schrittweise Ausbreitung vom Refugium in die Kleine Karoo wahrscheinlich. Für diesen Bereich ist das Konzept der „Isolation by distance“ (Wright, 1943) anwendbar, da benachbarte Populationen näher mit einander verwandt sind als entfernte. Eine solche Aussage trifft hingegen auf Population G10 als Refugialpopulation so nicht zu. Der Mantel-Test für die Ost-Gruppe weist keinerlei Korrelation der räumlichen und genetischen Distanzen der Populationen innerhalb der Gruppe auf. Wenn es im Bereich der Population G10 ein Refugium der Art gegeben hat, können zwei Szenarien, möglicherweise auch gemeinsam, Erklärungsansätze für die Befunde liefern:

Szenario 1:

Die Populationen der Ost-Gruppe stammen alle von der Population G10 oder zumindest von Pflanzen aus diesem Refugium ab. Es gab keine schrittweise Besiedlung des Gebiets der Kleinen Karoo von diesem Refugium aus, sondern mehrere Ausbreitungsereignisse über eine große Strecke („long distance dispersal“) vom Refugium in die Fläche der Kleinen Karoo. Es

handelt sich dann nicht um eine schrittweise Ausbreitung über „Trittstein-Populationen“ und so kann es auch keine Korrelation von räumlicher und genetischer Distanz geben. Auf diesen Ausbreitungsereignissen gründeten sich die Populationen der Ostgruppe, so können hier Populationen räumlich benachbart, aber genetisch sehr unterschiedlich sein, da sie aus verschiedenen Fernausbreitungsereignissen hervorgegangen sind. Dies kann für die Populationen G11 und G8 angenommen werden. G11 liegt im Nordwesten des Warmwaterbergs und ist gleichzeitig die westlichste der untersuchten Populationen der Ostgruppe. Population G8 liegt im Südosten des Warmwaterberges. Die Ergebnisse für die Beziehungen dieser Populationen sind nicht eindeutig und widersprechen sich zum Teil. Einige legen nahe, dass die Populationen G6, G9 und G11 auf ein Ausbreitungsereignis zurückzuführen sind, andere lassen vermuten, dass die Populationen G6, G7, G8 und G9 auf ein Ausbreitungsereignis und G11 auf ein anderes zurückzuführen sein können. Dieses nicht klare Bild kann durch Genfluß zwischen diesen Populationen durch Pollen und durch Samenausbreitung über mittlere Distanzen nach oder während der Besiedlung entstanden sein.

Szenario 2:

Möglicherweise gab es im Bereich der Ost-Gruppe mehr als ein Refugium. So können im Gebiet eine oder mehrere weitere Refugialpopulationen existiert haben. Wenn aus diesen Populationen ebenfalls eine Wiederbesiedlung der Flächen im östlichen Bereich des Verbreitungsgebietes einsetzte, finden sich hier die Genome aus mehreren Refugialpopulationen. Im Südosten des Verbreitungsgebietes von *G. nuciforme* gibt es einen Bereich, in dem die Artenvielfalt der Quarzflächen Flora (QFF) hoch ist (Schmiedel & Mucina, 2006). Hier, im Bereich der Springfontein Farm (Schmiedel & Mucina, 2006), kommt auch *Gibbaeum hortenseae* (syn. *Muiria hortenseae*) endemisch vor, zudem siedeln dort weitere Arten der Gattung *Gibbaeum*, wie u. a. *G. dispar* und *G. velutinum*, die vorwiegend im südlichen Bereich der Kleinen Karoo vorkommen. Möglicherweise stellt dieser Bereich für mehrere QFF-Arten ein Refugium dar. Träfe dies auch für *G. nuciforme* zu, wäre es ein Erklärungsansatz für die niedrigen Werte des Mantel Test, speziell der Ost-Gruppe, da dann die Populationen der Ostgruppe aus verschiedenen Refugien stammten und sich die Genome im Zuge der Besiedlung der Kleinen Karoo vermischt hätten.

Die genannten Szenarien können auch in Kombination zutreffen. Sie verbleiben spekulativ; für eine genauere Untersuchung dieser Unterstrukturen müssten mehrere Populationen im Gebiet ausgiebig beprobt werden.

Die Populationen G5 und G10 weisen die meisten Früchte auf. Kann diese Feststellung mit der besonderen Stellung als Refugialpopulationen zusammenhängen? Kann man davon ausgehen, dass diese Refugialpopulationen eine hohe Reproduktionsrate aufweisen, da sich hier noch eine relativ hohe genetische Diversität innerhalb der Population findet? Diese Annahmen können durch die AFLP-Untersuchungen nicht unterstützt werden. Möglicherweise sind diese

Populationen Nachfahren von besonders vitalen Populationen im Gebiet, die anderen haben die ungünstigen Klimabedingungen nicht überlebt.

4.1.9.5 Quellen für Besiedlung der Quarzflächen

Ein weiteres Indiz für die Lage von Refugien von Vertretern der Flora am Rande oder im Bereich der Kleinen Karoo sind die Untersuchungen von Schmiedel (2004) zur Artenzusammensetzung der Quarzflächenflora im südlichen Afrika. Neben den Quarzflächen der Kleinen Karoo wurde in ihrer Arbeit die Vegetation der Quarzflächen des südlichen Afrikas in der Knersvlakte, in Riethuis Wallekraal, im Richtersveld sowie in der Warmbad und der Pofadder Region untersucht. In einem Vergleich der Florenähnlichkeit wiesen die meisten Regionen Überschneidungen im Arteninventar auf, nur die Quarzflächenflora der Kleinen Karoo wies keinerlei floristische Überschneidung mit den übrigen Quarzflächenflore auf (Schmiedel, 2004). Dies bedeutet, dass die Quarzflächenflora der übrigen Gebiete keine effektive Quelle für die Wiederbesiedlung der Quarzflächen der Kleinen Karoo nach ungünstigen Klimabedingungen darstellte. Die vermutete Lage von Refugien in Habitatnischen im Gebiet der Kleinen Karoo und randlich wird durch diese Erkenntnisse unterstützt.

4.1.10 Naturschutzaspekte

In den letzten Jahren hat sich der Naturschutz vom Artenschutz und dem Erhalt der Artenvielfalt um den Erhalt von genetischer Diversität innerhalb von Arten erweitert. Diesem Ansatz folgt der Schritt, auch die evolutionären Abläufe und Prozesse zu schützen, die die genetische Diversität verursachen und erhalten, wie es Cowling & Pressey (2001) vorschlagen. Das Ziel ist der Erhalt der Biodiversität auf verschiedenen Ebenen. In ihrer Benennung von Hotspots der Biodiversität weltweit fordern Myers et al. (2000) verstärkte Anstrengungen, um die Artenvielfalt der weltweit wichtigsten Biodiversitätshotspots, zu denen auch die Sukkulente Karoo gezählt wird, zu erhalten. Für die Sukkulente Karoo, die eine erstaunlich hohe Biodiversität, gerade für ein arides Gebiet (Cowling & Hilton-Taylor, 1999) aufweist, liegen bisher kaum Daten für die räumlich-genetische Struktur von Populationen vor. Die Arbeiten von Ellis et al. (2007) an *Argyroderna* geben erste Hinweise auf die räumliche Struktur von Arten aus diesem Gebiet; dem schließt sich die vorliegende Studie mit Erkenntnissen zur Populationsstrukturen bei *G. nuciforme* an.

4.1.10.1 Schutz von Evolutionsprozessen und genetischer Diversität

Nach den Modellierungen und der Interpretation der Klimafolgenmodelle durch Midgley et al. (2001) haben sich die Taxa, die heute die Sukkulente Karoo dominieren, aus kleinen Refugien in die Fläche ausgebreitet. Die Rückwanderung der Taxa aus Refugien in die Fläche ist ein Prozess, der uns heute Aufschluss geben kann über die Wiederbesiedlungswege und Strategien von spezialisierten Pflanzentaxa. Cowling & Pressey (2001) fordern für die Zukunft Räume und Wege für Refugien und Wiederbesiedlung nach klimatischen Veränderungen als wichtige Räume für evolutive Abläufe zu schützen, um die Rahmenbedingungen für zukünftig

ablaufende Evolutionsprozesse zu erhalten. Dieser Ansatz ist aus biologischer Sicht wichtig und nachvollziehbar. Inwieweit sich die Forderungen nach Prozessschutz im Raum und demnach Evolutionsschutz in dem erforderlichen großen räumlichen Maßstab umsetzen lassen, gerade vor dem Hintergrund der sehr verschiedenen Interessen und Nutzungsansprüche an den Raum, ist mehr als fraglich. Dennoch geben Cowling & Pressey (2001) wichtige Anstöße für die Schutzüberlegungen.

“Do not underestimate the contribution that spatially explicit expert derived data can make to the planning process“, schreibt Desmet (2004) im Rahmen seiner Empfehlungen zur Entwicklung eines Schutzkonzeptes für die Region der Knervlakte in Südafrika. So sollen hier auch die Ergebnisse der Populationsuntersuchungen vor dem Hintergrund der Anforderungen an den Schutz evolutiver Prozesse betrachtet werden.

Mittels AMOVA wurde die höchste molekulare Variabilität innerhalb der Populationen nachgewiesen; hier würde der Verlust einer Population von *G. nuciforme* auch einen hohen Verlust genetischer Vielfalt bedeuten. Solche Verluste können als Reaktion auf Druck durch Nutzungseinfluss des Menschen entstehen. Bei *G. nuciforme* handelt es sich um eine Art, die endemisch in einem Gebiet von etwa 200 km² vorkommt und hier nur auf Sonderstandorten, namentlich auf Quarzflächen. Durch Nutzung dieser Habitats durch den Menschen, vornehmlich als intensive oder extensive Weideflächen, aber auch durch Wegebau, besteht die Gefahr der Zerstörung der Pflanzen und der Standorte von *G. nuciforme*. In der Kleinen Karoo wird eine zum Teil intensive Straußenhaltung betrieben. Solche Flächen sind nahezu vegetationsfrei und bieten *G. nuciforme* keine Standorte mehr. Zudem konnte an einigen Standorten Bodenerosion beobachtet werden, die sich nachteilig auf die Art auswirkt. Andere Populationen von *G. nuciforme* wachsen stabil in bestehenden Schutzgebieten (Anysberg, Eyerpoort), die einen Tierbesatz bzw. -bestand (u. a. Springbock) aufweisen.

Eine Reduzierung der Populationen durch Klimaveränderungen konnte die Art in der Vergangenheit vermutlich überstehen, da sie in Nischen verdrängt wurde und in zumindest zwei von diesen überdauert hat. Ob dies in der heutigen Zeit und in der Zukunft noch möglich ist, ist offen. Viele Habitats und Nischen, oder die Korridore dort hin, sind heute für die Pflanze nicht zugänglich, da der Mensch diese durch Nutzung überprägt hat. Midgley et al. (2002, 2003) haben in ihren raumbezogenen Modellierungen für Proteaceae-Arten der Kap-Flora angeführt, dass sich durch Klimaveränderungen die potenziellen Verbreitungsareale dieser Taxa verschieben und es so zum Teil zu Überschneidungen mit Gebieten intensiver anthropogener Nutzung kommen kann. Für Fynbos Arten scheint dies nicht so stark zuzutreffen wie für die Arten der Sukkulente Karoo, da die Fynbos Arten eher in die höheren Lagen verschoben werden, in denen die Konkurrenz mit anthropogener Nutzung nicht so stark ist. In der Ebene hingegen wird die Sukkulente Karoo Flora verstärkt in Konkurrenz mit der anthropogenen Nutzung geraten und möglicherweise unterliegen.

Qiu et al. (2004) haben in Untersuchungen an der Apiaceae *Changium myrnioides* auch Empfehlungen zum Schutz der Art gegeben. Da die genetische Differenzierung zwischen den Populationen groß ist, sollten möglichst alle Populationen erhalten werden. In jedem Fall sollten

nicht nur die großen Populationen erhalten werden, sondern auch speziell jene kleinen Populationen besonders geschützt werden, die seltene Allele aufweisen. Bei einer ex situ Konservierung ist (unter anderem) darauf zu achten, dass beim Wiedereinbringen in die Natur die Individuen der verschiedenen Standorte nicht vermischt werden.

Für den Schutz und Erhalt von *G. nuciforme* müssen Populationen aus den beiden aufgezeigten Populationsgruppen erhalten werden. Da jede Population eine spezielle genetische Diversität aufweist, würde der Verlust jeder einzelnen die genetische Diversität der Art einschränken. Eine künstliche Vermischung von Individuen der Ost- und der Westgruppe sollte vermieden werden, da nicht auszuschließen ist, dass die Gruppen sich immer noch unterschiedlich entwickeln können.

4.1.10.2 Sanbona Wildlife Reserve

Studenten des PE Technikons (Port Elizabeth, Südafrika) haben für das Sanbona Wildlife Reserve einen Managementplan vorgelegt (Jaspers & van der Beek, 2004). Das Sanbona Wildlife Reserve liegt im Südwesten der Kleinen Karoo in einem Dreieck zwischen Montagu im Westen, Ladismith im Nordosten und Barrydale im Süden. Es umfasst eine Fläche von 54.000 Hektar. Ziel des Reservates ist es, eine natürliche Situation soweit wie möglich herzustellen und die durch den Menschen verursachten Schäden möglichst auszugleichen und ursprüngliches Land zu erhalten. Die Gattung *Gibbaeum* wird in diesem Plan speziell betrachtet, da mehrere Arten dieser Gattung auf den im Reservat gelegenen Quarzflächen vorkommen. Das Ziel des Management Plans ist eine Bestandserfassung der vorkommenden *Gibbaeum*-Arten und deren Zustand. Aus diesen Informationen werden Empfehlungen abgeleitet, deren Schwerpunkt ein Monitoring der *Gibbaeum*-Arten vorschlägt, um eine Bestandsentwicklung und mögliche Schädigung durch den Wildtierbesatz des Reservates zu untersuchen. Als häufigste Art wurde *Gibbaeum pubescens* auf den Quarzflächen des Reservates festgestellt, daneben kommen *G. heathii* und *G. nuciforme* regelmäßig auf den Quarzflächen im Reservat vor. In sechs von zwölf untersuchten Tälern mit Quarzflächen wurde *G. nuciforme* aufgenommen. An verschiedenen *Gibbaeum*-Arten wurden Bissspuren festgestellt, die oft mehr als die Hälfte der Blattpaare einer Pflanze betrafen. In welchem Ausmaß die Pflanzen durch diesen Verbiss geschädigt werden, ist bislang nicht untersucht worden. Auf der Hand liegt die Vermutung, dass die Pflanze durch den Verbiss einen hohen Wasserverlust erleidet. Es kommt zu direktem Verlust des Wassers, welches im abgebissenen Pflanzenkörper gespeichert war, sowie zu einem erhöhten Verdunstungsverlust, da die Bissstelle nicht durch Epidermis und Kutikula geschützt ist. Zudem verliert die Pflanze photosynthetisch aktives Gewebe. Durch den Verbiss wird nicht immer das im Inneren des Blattpaares angelegte neue Blattpaar geschädigt, so dass der einmalige Verbiss einer Pflanze diese nicht dauerhaft schädigen muss. Man kann weiterhin annehmen, dass die Fruchtkapseln der Blattpaare durch den Verbiss vernichtet werden und somit die Reproduktion der Pflanzen eingeschränkt ist. Dies könnte bei andauerndem Verbiss zu einer zu geringen Verjüngung der Populationen führen, da weniger Samen zur Verfügung stehen. Hier könnte das

vorgeschlagene Monitoring (Jaspers & van der Beek, 2004) bei regelmäßiger Durchführung mit der Zeit Aussagen liefern, die eine Bewertung von Verbisschäden ermöglicht.

An den Populationen von *G. nuciforme* der vorliegenden Untersuchung wurden vereinzelt Individuen beobachtet, die Verletzungen der Blätter aufwiesen. Die Verletzungen betrafen die Blattspitzen und waren zum Zeitpunkt der Beobachtung schon verschlossen. Eine umfassende Schädigung der Pflanzen von *G. nuciforme* durch Verbiss wird aufgrund der eigenen Beobachtungen nicht vermutet. Von den von Jaspers & van der Beek (2004) beobachteten Arten weist *G. nuciforme* durch den eingesenkten Wuchs den besten Schutz vor Verbiss durch Wirbeltiere auf. Möglicherweise stammen ein Teil der beobachteten Verletzungen der Blattpaare an *G. nuciforme* nicht von Verbiss, sondern sind durch Vertritt verursacht worden. Bei den vorgeschlagenen Beobachtungen wäre dies ein Punkt, der in das Monitoring einbezogen werden sollte.

4.1.10.3 Die Sukkulente Karoo als Hotspot der Biodiversität

Myers et al. (2000) benennen weltweit 25 terrestrische Biodiversitätshotspots, basierend auf der Anzahl der endemischen Pflanzenarten und dem Anteil der heutigen Fläche mit primärer Vegetation. Neben der Kap Provinz wird auch die Sukkulente Karoo als Biodiversitätshotspot benannt. Für die Sukkulente Karoo werden 4.849 Pflanzenarten, von denen 1.940 als Endemiten benannt sind, aufgeführt. Die endemischen Pflanzenarten machen 0,6 % der weltweit vorkommenden Pflanzenarten aus. Die ursprüngliche Verbreitung der Sukkulente Karoo wird mit 120.000 km² angegeben, von denen gegenwärtig noch ca. 30.000 km² (26,8 %) mit ursprünglicher Vegetation bestanden sind.

In Habitatnischen konnten Refugialpopulationen von *G. nuciforme* klimatisch ungünstige Zeiträume überdauern. Dies ist ein konkretes Beispiel für den Erhalt von Arten und damit von Biodiversität durch Habitatvielfalt. Die Habitatvielfalt, die in kleinräumigen Nischen unterschiedliche Wachstumsbedingungen umfasst, wird als ein wichtiger Faktor für die Entstehung und den Erhalt der Diversität im Bereich der Sukkulente Karoo angesehen (Ihlenfeldt, 1994, Schmiedel & Jürgens, 1999, Goldblatt & Manning, 2002). Ein Mosaik von unterschiedlichen und genetisch isolierten Populationen bildet eine gute Ausgangslage für Diversifizierung aufgrund von reproduktiver Isolation (Rieseberg et al., 2003). Auch die Erkenntnisse von Ellis et al. (2006) zur Gattung *Argyroderma*, die auch zur Unterfamilie der Ruschioidea gehört, unterstützen diese Annahmen.

4.1.11 Zusammenfassende Beantwortung der Fragen zu den Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Können im Feld Merkmale an den Individuen erhoben werden, die eine Zuordnung zu Populationen zulässt oder diese zumindest wahrscheinlich macht?

Eine Zuordnung von Individuen zu Populationen aufgrund der im Feld erhobenen Merkmale ist nicht ganz eindeutig möglich. Die Zuordnung der Individuen anhand dieser Daten zu den sich in den molekularen Ergebnissen abzeichnenden Populationsgruppen ist in 3/4 der Fälle möglich.

Lässt sich die Verteilung der Merkmale vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus den molekularen Untersuchungen interpretieren?

Die Verteilung der Merkmale „Höhe der Blätter über dem Boden“ sowie das Vorhandensein oder Fehlen von durchscheinenden Bereichen in der Blattspitze wird anhand der Populationsgruppen und vor dem Hintergrund des Niederschlagsregimes interpretiert.

*Kann mit molekularen Markern die Hypothese unterstützt werden, dass es sich bei den Individuen von *G. nuciforme*, die eine Quarzfläche besiedeln, um die Individuen jeweils einer Population handelt? Sind die Individuen von *G. nuciforme* demnach über molekulare Merkmale den Herkunftspopulationen zuordbar?*

Durch den Einsatz von AFLPs konnte gezeigt werden, dass die Individuen einer Quarzfläche zu einer Population gehören. Über die molekulare Charakterisierung sind die Individuen ihren Herkunftspopulationen zuordbar.

Sind AFLPs ein angemessener Marker für die Untersuchungen der Populationen?

Die hohe Anzahl polymorpher Banden und die über Diskriminanzanalysen abgesicherte Zuordnungen weisen AFLPs als einen passenden Marker für die Populationsuntersuchungen aus.

Sind geografisch benachbarte Populationen auch genetisch benachbart? Sind genetische Distanzen und geografische Distanzen miteinander korreliert?

Geografisch benachbarte Populationen sind nur zum Teil auch genetisch benachbart, demnach wurde nur bei einem Teil der Populationen eine Korrelation der Distanzen aufgezeigt.

Sind Muster in den Daten erkennbar und lassen sich die Muster räumlich abbilden? Sind solche Muster durch Hintergrundinformationen wie Vegetationszusammensetzung oder Klimageschichte interpretierbar?

Die Ergebnisse der AFLP-Untersuchungen für die Populationen spiegeln eine räumliche Verteilung der Populationen wider. Eine Verteilung der Populationen auf zumeist zwei Gruppen wurde deutlich: Es handelt sich um eine Diskontinuität im Genfluss zwischen den Gruppen. Diese Diskontinuität wird anhand der Klimageschichte der Kleinen Karoo interpretiert. Durch Klimaveränderungen kam es zu einer Verdrängung der Art in Refugien, aus denen sie sich später wieder ausbreitete. Daher sind geografisch benachbarte Populationen in der Mitte der Kleinen Karoo zum Teil unterschiedlicher als die Individuen der Refugialpopulationen.

Lassen sich aus den Antworten auf die vorangestellten Fragen Schlussfolgerungen ableiten, inwieweit das Vorkommen der Art auf den speziellen azonalen Quarzflächen einen Einfluss auf die Populationsstruktur der Art hat?

Das Vorkommen der Art auf Inselhabitaten hat dazu geführt, dass ein Großteil der genetischen Variabilität sich innerhalb der einzelnen Populationen befindet

Können aus den Ergebnissen der Populationsuntersuchungen Hinweise für den Schutz der Art und allgemeine Hinweise für den Naturschutz abgeleitet werden?

Durch die genetische Isolierung der Populationen voneinander (höchste genetische Variabilität innerhalb der Populationen) kann der Erhalt jeder einzelnen Population für die Art essentiell sein. Gerade in Hinblick auf zukünftige Veränderungen von Klima und Landnutzung ist die Art auf eine hohe genetische Variabilität angewiesen, um auf mögliche Veränderungen zu reagieren.

4.2 Untersuchungen zur Phylogenie der Gattung *Gibbaeum*

Die Stabilisierung von neuen Eigenschaften und Anpassungen von Individuen ist in Habitaten, in denen die Ausgangsart vorkommt und daran gut angepasst ist, eher unwahrscheinlich (Levin, 2003). Dies kann als Argument für die Hypothese gewertet werden, dass sich die Anpassung an die Wachstumsbedingungen auf Quarzflächen innerhalb der Gattung *Gibbaeum* mehrfach unabhängig von einander etabliert hat. Demnach leitet sich eine Quarzflächen-Art meist von einer nicht auf Quarzflächen spezialisierten Art ab. Ähnliches vermutet Hartmann (1978b) für die Gattung *Argyroderma* (Aizoaceae), eine Gattung, die in der Knersvlakte vorkommt. Einige Arten der Gattung sind, ähnlich wie in der Gattung *Gibbaeum*, auf Quarzflächen spezialisiert und kommen nur auf diesen vor. Hartmann (1978b) nimmt an, dass die Quarzflächen-Arten mehrfach von Generalisten abgeleitet sind. Die Ergebnisse von Ellis et al. (2006) für *Argyroderma* stimmen damit jedoch nicht überein, vielmehr zeigen die Autoren, dass die quarzflächenbewohnenden Arten von *Argyroderma* in Untersuchungen mit AFLPs eine einheitliche Gruppe bilden und demnach auf eine einmalig erfolgte Besiedlung der Quarzflächen zurückgeführt werden können.

Um die Besiedlung der Quarzflächen in der Kleinen Karoo durch verschiedene Arten der Gattung *Gibbaeum* zu beleuchten, wurde versucht, mit molekularen Markern eine Phylogenie der Gattung zu erstellen. Diese ist weitestgehend nicht gelungen und wird in den nachstehenden Abschnitten diskutiert. Schmiedel (2002) hat im Rahmen ihrer ökologischen Untersuchungen zu den Quarzflächen der Kleinen Karoo eine direkte Gradientenanalyse von Vegetationsaufnahmen und Umweltparametern für 12 *Gibbaeum*-Arten (inklusive *Muiria hortenseae* = *G. hortenseae*) erstellt. Die Vegetationsaufnahmen für Arten der Gattung *Gibbaeum* werden gruppiert und mit Angaben zur Wuchsformen und zu Habitatbedingungen ergänzt.

Eine eindeutige Gruppierung von Arten, die ähnliche Wuchsformen aufweisen oder Quarzflächenspezialisten sind, konnte anhand der Auswertung der molekularen Daten in der

vorliegenden Untersuchung nicht festgestellt werden (vergleiche Abschnitt 3.8.3). Vielmehr weisen einzelne Kleingruppen in den Dendrogrammen darauf hin, dass sich die Wuchsformen und auch die Besiedlung von Quarzflächen mehrfach innerhalb der Gattung entwickelt haben, diese Annahme ist jedoch schon spekulativ. Ellis et al. (2006) hingegen konnten für die Gattung *Argyroderma* zeigen, dass alle Arten der Gattung, die auf Quarzflächen wachsen, eine Gruppe bilden. Basal zu dieser Gruppe steht eine Art, die als Generalist gilt und von der angenommen wird, dass sie Merkmale der Ausgangsart aufweist, von der sich die Quarzflächenspezialisten abgespalten haben. Möglicherweise ist die Etablierung von speziellen Quarzflächenarten in den Gattungen *Argyroderma* und *Gibbaeum* unterschiedlich abgelaufen. Bei *Argyroderma* wird eine Ausgangsart und eine monophyletische Gruppe der Quarzflächenarten der Gattung angenommen (Ellis et al., 2006), für *Gibbaeum* wird eher vermutet, dass es mehrere Ausgangsarten und damit keine monophyletische Gruppe der Quarzflächenarten gibt.

Ellis et al. (2006) vermuten, dass die Speziation in der Gattung *Argyroderma* durch die inselhafte Lage der Quarzflächen in der Knersvlakte stark geprägt ist. Die Flächen waren in der Vergangenheit möglicherweise noch stärker isoliert als heute. Dies könnte auch die Speziation verstärkt haben, indem sich Unterschiede zwischen Populationen durch die Isolation schnell etabliert haben. Diese Annahmen können auch für die Quarzflächen der Kleinen Karoo gemacht werden. Hier kommen mehrere verschiedene Arten der Gattung *Gibbaeum* zum Teil gemeinsam auf den Quarzflächen vor. Möglicherweise kam es erst nach der abgeschlossener Artbildung zur Überschneidung der Verbreitungsareale der Arten.

4.2.1 ITS Sequenzen

4.2.1.1 ITS-Phylogenie

Die aufgrund der ITS-Sequenzen errechneten Dendrogramme ergeben keine eindeutige Phylogenie der Gattung, die prägende Struktur ist eine Polytomie (Abbildung 3-29). Die Daten der ITS-Sequenzierung liefern keine ausreichende Zahl an Merkmalen um Aussagen zur Phylogenie der Gattung *Gibbaeum* machen zu können. Es werden nur kleine Gruppen die wenige Arten umfassen angedeutet.

4.2.1.2 ITS-Sequenzen für Gattungs-Phylogenien

Sequenzdaten aus dem ITS-Bereich ergaben in verschiedenen Untersuchungen auf Gattungsebene genügend Polymorphismen, um belastbare Annahmen zu phylogenetischen Beziehungen innerhalb einer Gattung zu machen, so z. B. für die Gattungen *Dahlia* (Asteraceae) (Gatt et al., 2000) oder *Sisymbrium* (Brassicaceae) (Warwick et al., 2002). Für die Gattung *Gibbaeum* wurden in dieser Arbeit sehr wenige informative Veränderungen der ITS Sequenz festgestellt, daher ist eine Auflösung der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Gattung ist aufgrund der vorliegenden ITS-Sequenzen nicht abschließend möglich. Die Untersuchungen von Gatt et al. (2000) für 17 Arten der Gattung *Dahlia* und zwei Aussengruppentaxa weisen insgesamt 169 variable Positionen im Alignment der ITS Sequenz

auf, von denen 112 informativ sind. Warwick et al. (2002) haben bei ITS-Sequenzen für 72 Arten (inkl. 4 Arten von Aussengruppen) der Gattung *Sisymbrium* (Brassicaceae) 238 Polymorphismen im Alignment festgestellt, von denen 192 als informativ eingestuft wurden. Huang et al. (2002) wiesen bei der Untersuchung der Gattung *Ipomoea* (Convolvulaceae) für 20 Arten der Gattung 85 informative Veränderungen der ITS-Sequenz nach. Innerhalb der Gattung *Ipomoea* tritt eine Gruppe „Bataten“ auf, deren 13 Arten nur 10 informative Veränderungen der ITS-Sequenz aufweisen. Diese Gruppe bildet eine Polytomie und konnte mit den ITS-Sequenzdaten nicht aufgelöst werden. Ritz et al. (2003) haben für 20 Arten der Subsektion *Meleuphorbia* innerhalb der Gattung *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in der gesamten ITS Sequenz 53 informative Veränderungen detektiert.

In der vorliegenden Untersuchung wurden 10 informative Veränderungen der ITS-Sequenzen in der Gattung *Gibbaeum* festgestellt. Klak et al. (2003b) haben mit vier sequenzierten Bereichen aus dem Chloroplastengenom innerhalb der Aizoaceae Unterfamilien ausgliedern können, diese konnte Thiede (2004) mit ITS-Sequenzen bestätigen. Mit verschiedenen Genomabschnitten, u. a. auch mit ITS-Sequenzen, haben Klak et al. (2003a) innerhalb der Ruschioideae die *Lampranthus*-Gruppe untersucht und die zentrale *Lampranthus*-Gruppe nicht auflösen können, sie verblieb als Polytomie. Thiede (mündliche Mitteilung) hat in seinen Untersuchungen an verschiedenen Arten der Ruschioideae nur sehr wenige Unterschiede in der ITS-Sequenz feststellen können.

Klak et al. (2004) führen die geringe Auflösung von verschiedenen Sequenzen innerhalb der Ruschioideae auf eine extrem schnelle und starke Radiation in der Unterfamilie der Ruschioideae und speziell der Gruppe der „core-Ruschioideae“ zurück. Dies wird durch die Etablierung von Schlüsselinnovationen wie Breitband-Tracheiden oder Fruchtkapselmerkmalen innerhalb der Gruppe unterstützt (Klak et al., 2004, Landrum, 2001). Der Beginn für die Radiation der „core-Ruschioideae“ wird von Klak et al. (2004) in den Zeitraum zwischen 3,8 und 8,7 Millionen Jahren gelegt. Dies fällt auch mit dem Zeitpunkt, welcher für die Etablierung des Winterregenklimas im südlichen Afrika vor ca. 5 Millionen Jahren (Axelrod & Raven, 1978) angenommen wird, zusammen. Der Zeitpunkt der Abspaltung der Aizoaceae von den Nyctaginaceae und Phytolaccaceae wird von Klak et al. (2004) mit etwa vor 26 Millionen Jahren angegeben. Zum Vergleich: Für die Cactaceae in Amerika nehmen Hershkovitz & Zimmer (1997) eine Radiation an, die vor mehr als 65 Millionen Jahren begonnen hat.

Die hohe Homogenität ihrer ITS-Sequenzen interpretieren Huang et al. (2002) für die Bataten-Gruppe innerhalb der Gattung *Ipomoea* als Anzeichen für häufige Hybridisierung der Arten untereinander aufgrund fehlender Kreuzungsbarrieren. Hybridisierungen während und nach der Artaufspaltung innerhalb der Gattung *Gibbaeum* können nicht ausgeschlossen werden, da die Arten nicht immer räumlich getrennt vorkommen, sondern vielmehr die gesamte Gattung in der Kleinen Karoo vorkommt, häufig treten mehrere Arten der Gattung in einer Fläche gemeinsam auf. Glen (1974) beschreibt eine vermutete natürliche Hybride \times *Muiriogibbaeum* zwischen *Gibbaeum album* und *Muiria hortenseae* (= *Gibbaeum hortenseae*) und eine weitere Hybride

×*Gibbaeophyllum* aus *Gibbaeum pubescens* und *Glottiphyllum spec.*, die in Kultur bekannt ist. Hammer (o.J.) beschreibt, dass im Gewächshaus durch Handbestäubungen verschiedene Arten der Gattung *Gibbaeum* erfolgreich gekreuzt werden können. Die Hybride ×*Gibbaeophyllum* ist nach Hammer mehrfach in Kultur, er vermutet jedoch einen natürlichen Ursprung dieser Gattungshybride. Mehrfache Hybridisierungsereignisse innerhalb der Entwicklung einer taxonomischen Gruppe erschweren es, die Phylogenie nachzuvollziehen, da eine Grundannahme für die phylogenetischen Berechnungen verletzt ist. Die reticulaten Muster der Hybridisierungsereignisse sind inkompatibel mit den hierarchischen Annahmen, die die Grundlagen für die phylogenetische Rekonstruktion darstellen (Judd et al., 1999). Die Annahme für die phylogenetische Rekonstruktion ist, dass zwei divergente Linien, wenn sie sich einmal getrennt haben, nie wieder genetische Informationen austauschen. Wenn Hybridisierung häufig in der untersuchten Gruppe auftritt, dann können Pflanzen, die nicht näher miteinander verwandt sind, abgeleitete Merkmale teilen. Bildlich gesprochen führen mehrfache Hybridisierungsereignisse zu einer Topologie der Verwandtschaftsverhältnisse, die nicht einem sich dichotom verzweigendem Baum entspricht, sondern eher einem Stück Makramee (Judd et al., 1999). Studien mit bekannten F1-Hybriden in der Gattung *Aphelandra* (Acanthaceae) (McDade, 1992) zeigten, dass die Topologie der Phylogenie durch die Hybriden nicht verändert wurde, der Consistency Index (CI) der phylogenetischen Analyse war jedoch erniedrigt, was auf Homoplasie hinweist. Da die Hybridisierungsereignisse in der Gattung *Gibbaeum* vermutlich nicht als F1-Generation vorliegen, sondern in historischen Zeiträumen - während und nach der Artenbildung - vermutet werden, ist die Identifizierung und Bewertung von Hybriden hier nicht möglich.

Klak et al. (2003a) vermuten zudem das verstärkte Auftreten von Homoplasien innerhalb der ITS-Sequenzen von Vertretern der Aizoaceae. Danach können in der Sequenz Polymorphismen als Synapomorphien interpretiert werden, die eigentlich Homoplasien sind, da sie sich unterschiedlich ableiten. Dies führt dazu, dass sich die Merkmale widersprechen können. Klak et al. (2003a) machen diese Annahme an einem vergleichsweise niedrigen Retentionsindex (RI) von 0,497 für die Berechnungen der Dendrogramme in PAUP* fest. Für die untersuchten Taxa der Gattung *Gibbaeum* weist der Homoplasie-Index (HI) einen Wert von 0,1887, der Retentionsindex einen Wert von 0,913 auf, daher ist Homoplasie für die Merkmale der ITS-Sequenz in der vorliegenden Untersuchung eher unerheblich. Es besteht vorrangig ein Mangel an Polymorphismen. Der Mangel an Unterschieden zwischen den ITS-Sequenzen der einzelnen Arten wird am besten mit der schnellen und jungen Radiation der Gruppe erklärt, zudem können noch mögliche Hybridisierungsereignissen innerhalb der Gattung eine Rolle bei der Homogenisierung der Sequenzen spielen.

4.2.2 AFLP-Untersuchungen zur Gattungs-Phylogenie

Ebenso wie ITS-Sequenzen wurden auch AFLPs in verschiedenen Untersuchungen erfolgreich zur Untersuchung von Gattungsphylogenien genutzt. Für Gruppen, für die die ITS-Sequenzen nicht ausreichend Informationen lieferten, wurden AFLPs eingesetzt (Huang et al., 2002). So

wurden AFLPs auch in der Gattung *Lactuca* erfolgreich für das Erstellen einer Gattungsphylogenie eingesetzt und lieferten auf dieser Ebene mehr Informationen als die ebenfalls untersuchten ITS-Sequenzen (Koopman, 2005). Koopman (2005) beschreibt jedoch auch Limitierungen für den Einsatz von AFLPs für phylogenetische Untersuchungen. Die auftretenden Fragmente sind nicht alle unabhängig voneinander, die Annahme, dass gleich lange Fragmente homolog sind, ist nicht immer erfüllt und es gibt Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit des Auftretens oder des Verlustes von Fragmenten im Genom. Zudem sind AFLPs dominante Marker und es kann nicht zwischen homozygoten und heterozygoten Fragmenten unterschieden werden.

Die AFLP-Analysen für die Gattung *Gibbaeum* weisen zumeist große Polytomien auf, auch sind die Dendrogramme statistisch nicht abgesichert, da die meisten Bootstrap-Werte für die Dendrogramme unter 50 % liegen und somit als nicht gesichert gelten müssen. Zudem kann die als Aussengruppe verwendete Gattung *Corpuscularia* nicht eindeutig von der Gattung *Gibbaeum* abgegrenzt werden. Daher ist eine Aussage zur Phylogenie der Gattung auf Grund der AFLP-Ergebnisse nicht zu treffen. Über die Etablierung von Taxa auf Quarzflächen kann hier nur spekuliert werden. Die Anordnung der Quarzflächenarten innerhalb der Gattung weist vordergründig auf eine mehrfache unabhängige Etablierung von Quarzflächenarten hin. Die Quarzflächenarten bilden keine monophyletische Gruppe und sind zudem meist zu anderen Arten benachbart. Warum weisen die AFLP Daten zwar viele Polymorphismen auf, beinhalten jedoch keine erkennbare und verwertbare Struktur zur Gliederung der Gattung? Ein Grund dafür kann das Auftreten von Homoplasie sein. Der hohe Wert des Homoplasieindex (HI = 0,6889) der AFLP Gattungsuntersuchung verweist darauf, dass die AFLP-Daten Homoplasien beinhalten und von diesen stark geprägt sind. Klak et al. (2003a) hatten für ihre ITS-Sequenzen innerhalb der Ruschioideae einen hohen Grad an Homoplasie festgestellt, die Autoren gaben dafür den Retentionsindex (RI) mit 0,497 an (je niedriger dieser, desto höher ist der Grad an Homoplasie) in den AFLP-Gattungsdaten für *Gibbaeum* ist der Wert RI = 0,3635 und weist somit ebenfalls auf einen hohen Grad an Homoplasie hin.

Verschiedene Untersuchungen zur Methode AFLPs (Vekemans et al., 2002) haben gezeigt, dass ca. 10 % Homoplasie in den Untersuchungen auftreten können ohne die Ergebnisse signifikant zu beeinflussen. Höhere Homoplasie-Raten können zwar durchaus auftreten, verringern dann aber zunehmend die Auflösung und können sogar zu irreführenden Gruppierungen führen. Der in der vorliegenden Untersuchung aufgetretene hohe Anteil von Homoplasie überschreitet das „normale Maß“ bei weitem und ist vermutlich der Hauptgrund, warum die AFLP-Daten für eine Gattungsphylogenie keine gesicherten Ergebnisse liefern. Mehrfache Hybridisierungen während und nach der Entstehung der Arten können dazu beigetragen haben, dass sich die Genome der Arten verschiedentlich miteinander vermischt haben. Dies könnte erklären, warum es zwar Polymorphismen gibt, diese jedoch keinen eindeutigen Trend für die Phylogenie der Gattung aufweisen.

Fazit AFLP-Untersuchungen zur Gattungs-Phylogenie: Der Einsatz von AFLPs für die Untersuchung der Gattung *Gibbaeum* führte nicht zu der erwarteten guten Auflösung der Phylogenie. Es wurden viele Polymorphismen detektiert, deren Analyse führte jedoch zu unaufgelösten Polytomien und einem Hinweis auf einen hohen Anteil von Homoplasie in den Daten. Daher wird angenommen, dass Homoplasie das mögliche phylogenetische Signal überlagert.

4.2.3 ccSSR

Die Auswertung der ccSSRs ergab keine Auflösung der Gattung *Gibbaeum*, die meisten Marker waren monomorph, nur drei Primerkombinationen weisen wenige Unterschiede zwischen einigen untersuchten Taxa auf. Bei zwei Primerkombinationen fehlte bei einigen Taxa das PCR-Produkt vollständig. Dies wurde als Merkmal ausgewertet; es kann jedoch auch sein, dass hier die PCR-Reaktion (mehrfach) nicht funktionierte. In diesem Fall weist dann nur eine Primerkombination Polymorphismen auf. Die Autoren der Primer (Chung & Staub, 2003) beschreiben, dass die ccSSR-Primer für die phylogenetische Auflösung innerhalb von Gattungen einsetzbar seien. So wiesen die damit erzielten PCR-Produkte für Arten der Gattung *Cucurbita* (Cucurbitaceae) viele Polymorphismen auf und auch Kultivare einer Art konnten unterschieden werden (Chung & Staub, 2003). Klak et al. (2003) erzeugten auf Basis von 4 Sequenzen aus dem Chloroplastengenom Phylogenien der Familie der Aizoaceae, in denen die Unterfamilie der Ruschioideae nahezu eine einzige Polytomie aufwies. Auch hier zeichnete sich also ein eklatanter Mangel an Polymorphismen für dieses Taxon ab.

Das hier verwendete Markersystem (ccSSR) detektiert Polymorphismen in hochvariablen Bereichen des Chloroplastengenoms. Da dieses Genom nicht der Rekombination unterliegt, treten hier generell weniger Mutationen auf als in den variabelsten Bereichen des Kerngenoms. Zudem wirken sich Hybridisierungsereignisse nicht auf das Genom aus. Da jedoch auch andere als hochvariabel angenommene Bereiche im Chloroplastengenom dieser Familie und speziell bei den Ruschioideae kaum Unterschiede aufwiesen (Klak et al., 2003b), stehen die Befunde der vorliegenden Untersuchung mit anderen im Einklang. Die Annahmen zur schnellen und jungen Radiation der Ruschioideae können auch hier den Mangel an Polymorphismen erklären.

4.2.4 ISSR

Treutlein et al. (2003) haben u. a. mit ISSR Markern in der Gattung *Haworthia* Erkenntnisse zur Phylogenie gewonnen. Die Auswertung der ISSR-Ergebnisse für *Gibbaeum* ergab, ähnlich wie bei den vorangegangenen Markern, keine nennenswert strukturierten Dendrogramme für die Gattung. Die statistische Absicherung mit Bootstraps war nicht möglich. In erster Linie reicht die Anzahl der informativen Merkmale nicht aus. Vermutlich ist dies auf die schon genannte schnelle und starke Radiation der Gruppe zurückzuführen. Der verwendete Marker detektiert Mikrosatelliten-Veränderungen im gesamten Genom, demnach können vor allem Hybridisierungsereignisse zwischen den verschiedenen Arten die möglichen phylogenetischen Informationen überdecken.

4.2.5 Kombination der verschiedenen molekularen Marker

Es ist möglich, die Polymorphismen, die mit den unterschiedlichen Markersystemen für die Gattung erhoben wurden, zu kombinieren, um so möglicherweise eine aussagekräftige Datenmatrix zu erhalten. Die Ergebnisse der einzelnen Markeruntersuchungen weisen einzeln auf das Vorkommen von Homoplasie hin und lassen auch Hybridisierungsereignisse innerhalb der Gattung vermuten. Dieses kann durch die Kombination der unterschiedlichen Ergebnisse weiter verstärkt werden, so dass von einer Kombination der Daten abgesehen wurde. Zudem kann eine Veränderung in der Sequenz durch verschiedene Marker unabhängig voneinander detektiert werden. Würden diese Daten kombiniert, entstünden ungewollte Verstärkungseffekte, die die Berechnungen der Phylogenien noch weiter beeinträchtigen würden.

4.2.6 Zusammenfassende Beantwortung der Fragen zur Untersuchung der Phylogenie der Gattung *Gibbaeum*

*Sind die eingesetzten molekularen Marker wie ITS-Sequenzen oder AFLPs angemessene Markersysteme um eine Phylogenie der Gattung *Gibbaeum* zu erstellen?*

Mit den eingesetzten molekularen Methoden wie ITS-Sequenzen und AFLPs konnte die Phylogenie der Gattung nicht erstellt werden. Die Sequenzen wiesen eine zu geringe Zahl von Polymorphismen auf. In den AFLPs wird das mögliche phylogenetische Signal von anderen überlagert, die auf einen hohen Grad von Homoplasie hinweisen.

*Lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungen aussagen, ob sich die verschiedenen Arten der Gattung *Gibbaeum* unabhängig voneinander auf Quarzflächen etabliert haben und inwieweit sich Wuchsformtypen mehrfach entwickelt haben?*

Anhand der spärlichen Ergebnisse für die Phylogenie der Gattung lassen sich Hinweise ableiten, dass sich die Quarzflächenspezialisten innerhalb der Gattung verschiedentlich entwickelt haben. Auch die Entwicklung hin zu kompakten kleinen Wuchsformen ist vermutlich mehrfach abgelaufen.

4.3 Methodendiskussion

4.3.1 Kontamination als mögliche Fehlerquelle

Saar et al. (2001) weisen auf die Problematik von Verunreinigung bei Angiospermen-DNA mit Pilz-DNA hin. Verschiedene mündliche Berichte von Kollegen (A. Jürgens, B. Rudolph) wie auch die in dem Artikel von Saar et al. (2001) zitierten Beispiele belegen, dass diese Fehlerquelle in jedem Fall ernst genommen werden muss. Dies trifft im Besonderen auf nicht-sequenzbezogene Untersuchungsmethoden wie AFLPs und RAPDs zu. Aber auch Untersuchungen mit universellen Primern können durch Kontamination mit Pilz-DNA zu irritierenden und falschen Ergebnissen und Interpretationen führen. Eine vorbeugende

Maßnahme gegen epiphytische Pilze ist die genaue Untersuchung des verwendeten Pflanzenmaterials mittels Lupe oder Mikroskop.

Saar et al. (2001) empfehlen die Verwendung spezifischer und unspezifischer Primer für die gleiche Probe. Bei ITS-Amplifikationen von Angiospermen mit universellen ITS-Primern kommt es bei vorhandener Kontamination durch Pilz-DNA meist zu Doppelbanden, da die ITS Region der häufig auftretenden Pilzgruppen etwas kürzer ist als in den Angiospermen. Ein Abgleich in der Datenbank (z. B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) für die sequenzierten ITS Abschnitte ermöglicht die schnelle Einordnung der Probe zu taxonomischen Gruppen, da in der Datenbank auch die ITS Sequenzen verschiedener Pilzgruppen vorhanden sind.

Bei den ITS-Amplifikationen für die Gattung *Gibbaeum* mit ITS1F und ITS4R traten keine Doppelbanden auf. Die verwendeten Primer sind universelle Primer, mit denen auch die ITS Region von Pilzen untersucht wurde. Die Datenbank-Suche ergab, dass sämtliche eingegebenen Sequenzen den Aizoaceae zugeordnet wurden. Sie wiesen hohe Ähnlichkeiten mit den in der Datenbank vorhandenen ITS-Sequenzen von Vertretern der Gattungen *Lampranthus* und *Delosperma* auf, von denen von Klak et al. (2003a) Einträge in der Datenbank vorhanden sind. Die Ähnlichkeit der Sequenzen liegt bei bis zu 100 %. Diese Ergebnisse ermöglichen es, die Problematik der Kontamination der verwendeten DNA mit Pilz-DNA für die vorliegende Untersuchung als gering bis nicht vorhanden einzustufen.

4.3.2 Einsatz von „bulked“ DNA

Michelmore et al. (1991) haben den Ansatz der „bulked“ DNA etabliert, um Marker für ein bestimmtes Merkmal (z. B. Resistenzen) zu finden. Eine für das Merkmal aufspaltende Nachkommenschaft wurde in zwei Gruppen nach dem Merkmal aufgeteilt. Diese wurden dann mittels „bulked“ DNA und molekularen Methoden wie RFLPs und RADPs auf Unterschiede, also potenzielle Marker, untersucht.

Fu et al. (2003) berichten kritisch über den Ansatz, „bulked“ DNA für AFLP Untersuchungen einzusetzen. In ihrer Studie an drei verschiedenen Poaceae wurden Einzelindividuen mit AFLPs untersucht. Die Ergebnisse wurden denen aus AFLP Untersuchungen an „bulked“ DNA derselben Pflanzen gegenübergestellt. Die Autoren stellten fest, dass bei Einsatz von „bulked“ DNA zwischen 19 und 44 % weniger AFLP Banden detektiert wurden als bei der Untersuchung der Einzelindividuen mit AFLPs. Unter den nicht detektierten Banden in der „bulked“ DNA Untersuchung waren auch solche, die in den Einzelindividuen durchgängig vorhanden waren. Zudem traten bei „bulked“ DNA AFLPs noch zwischen 3 und 13 % neue, unerwartete Banden auf, die die Autoren nicht erklären konnten. Fu (2000) berechnet, dass bei Einsatz von dominanten Markern, wie es AFLPs sind, für „bulked“ DNA weniger AFLP Banden detektiert werden als bei Untersuchung von Einzelindividuen, deren Ergebnisse nachträglich zusammengefasst werden.

In dieser Arbeit wurde, neben der Untersuchung von Einzelindividuen, der Ansatz mit AFLPs und „bulked“ DNA auf die Populationsuntersuchungen an *G. nuciforme* übertragen. Hier wird die Zugehörigkeit zu einer Population zum gemeinsamen Merkmal der Individuen der „bulked“

DNA angenommen. Trotz der Einschränkungen, die Fu et al. (2003) für diese Prozedur anführen, kann die Anwendung von „bulked“ DNA für AFLPs sinnvoll sein, wenn es darum geht, sich einen Überblick über viele zu untersuchende Individuen zu verschaffen, die in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden. Auch bilden begrenzte Geld- und Zeit-Ressourcen einen Aspekt, der für den Einsatz von „bulked“ DNA sprechen kann.

Der Einsatz von „bulked“ DNA ist kein Ersatz für die Untersuchung einzelner Individuen bei Populationsuntersuchungen. In der vorliegenden Untersuchung lieferten die Ergebnisse der „bulked“ DNA-Untersuchungen Hinweise, dass die molekularen Daten eine räumliche Struktur aufweisen können. Durch das Auftreten von AFLP-Fragmenten in nur einem Individuum kann die Position des gesamten „bulkes“ in der Analyse überproportional beeinflusst werden. Für Voruntersuchungen, ob sich aufwändige Untersuchungen mit vielen Individuen verschiedener Populationen lohnen, können AFLPs anhand von „bulked“ DNA gut eingesetzt werden. Den Voruntersuchungen sollten sich dann gegebenenfalls Untersuchungen anhand von Einzelindividuen anschließen.

5 Ausblick

5.1 Populationsuntersuchungen

5.1.1 Populationen von *Gibbaeum nuciforme*

Um weitere Aussagen zu Populationsstrukturen innerhalb der Art *G. nuciforme* zu erreichen, sollten weitere Populationen untersucht werden. Das gilt insbesondere für den Bereich, in dem die Populationsgruppen mögliche Überschneidungen aufweisen. Seit kurzem liegt (dank U. Schmiedel) dazu Material von vier weiteren Populationen aus dem Gebiet vor, so dass hier zusätzliche AFLP-Untersuchungen durchgeführt werden können. Die Untersuchung von weiteren Populationen im Südosten der Ost-Populationsgruppe kann Aufschluss über die diskutierten weiteren Refugien im Gebiet geben.

5.1.2 Untersuchung weiterer Taxa

Weit wichtiger als die detailliertere Untersuchung der Populationsstrukturen innerhalb von *G. nuciforme* erscheint die Überprüfung der postulierten Refugien und des damit zusammenhängenden Szenarios der Reaktion von Arten auf die Klimaveränderungen im Bereich der Kleinen Karoo und der gesamten Sukkulenten Karoo in der Vergangenheit. Hierfür sollten weitere Taxa aus dem Gebiet der Kleinen Karoo und auch aus der gesamten Sukkulenten Karoo in Betracht gezogen werden. Zum einen kommen, aufgrund ihrer hohen Artenzahl und ihrer zum Teil begrenzten Verbreitung, weitere Vertreter der Aizoaceae in Frage. Zum anderen sollten Taxa aus anderen Familien, wie eventuell den Crassulaceae, identifiziert werden, an denen sich die Hypothesen der Refugien im Bereich der Kleinen Karoo überprüfen lassen.

5.1.3 Weitere Marker für die Erstellung einer Gattungsphylogenie

Für die Erstellung einer gut abgesicherten Phylogenie der Gattung *Gibbaeum* sollten andere Abschnitte des Genoms, die möglicherweise eine höhere Variabilität aufweisen, versuchsweise sequenziert werden. Die Suche nach einem geeigneten Marker wird jedoch durch die schnelle Radiation, die wenig Veränderungen im Genom hinterlassen hat, erschwert. Zudem können die schon bisher vermuteten Homoplasien die Erstellung und Absicherung von Phylogenien erheblich erschweren.

6 Zusammenfassung

Populationsuntersuchungen: In der Kleinen Karoo in Südafrika tritt auf Quarzflächen die Aizoaceae *Gibbaeum nuciforme* endemisch auf. Die Quarzflächen bilden azonale Habitatsinseln und wurden von Schmiedel in Hinsicht auf Vegetationszusammensetzung und Habitatparameter untersucht (Schmiedel, 2002, Schmiedel & Jürgens, 2004). Die Frage in dieser Arbeit war, ob - möglicherweise aufgrund des Vorkommens in inselhaften Habitaten - Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen der Art aufgezeigt und interpretiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden 15 Populationen von *G. nuciforme* untersucht. Die untersuchten Populationen decken das gesamte Verbreitungsgebiet der Art ab. Es wurden im Feld Parameter erhoben, die u. a. das Habitat, die Begleitvegetation, die Dichte der Individuen in der Population sowie Erhebungen an den Individuen umfassen. Es wurden Anzahl der Blattpaare, Anzahl der Früchte und makroskopische Blattmerkmale erhoben. Die Daten wurden ausgewertet und auf ihre Eignung für die Zuordnung der Individuen zu den jeweiligen Populationen mittels Diskriminanzanalyse geprüft. Als Ergebnis konnte keine eindeutige Zuordnung aufgrund der Merkmale getroffen werden. Die Individuen der Populationen wurden mit molekularen Markern (AFLPs) untersucht. Die Charakterisierung der Individuen mittels AFLP-Marker ist möglich, da jedes Individuum ein einmaliges AFLP-Profil aufweist. Die Auswertung der AFLP-Ergebnisse mittels Diskriminanzanalyse ergab eine (signifikant) gute Zuordnung der untersuchten Individuen zu den Herkunfts-Populationen. In der Darstellung der PCO zeigt sich jedoch auch, dass die Populationen Überlappungsbereiche aufweisen. In der Auswertung mittels PCO und Distanzberechnungen zeichneten sich zwei Populationsgruppen ab, die aufgrund ihrer geografischen Anordnung innerhalb der Kleinen Karoo als Ost- und Westgruppe bezeichnet wurden. Die Zuordnung der Individuen zu den Gruppen lässt sich durch eine Diskriminanzanalyse unterstützen. Vor dem Hintergrund dieser beiden Populationsgruppen wurden die Merkmale der Individuen auf diese Gruppen hin überprüft. So werden für die Merkmale: „Höhe der Blätter über dem Boden“ und „transparenter Bereich in der Blattspitze“ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt und in Bezug auf die Besonderheiten von Klima und Anpassungen an lokale Gegebenheiten diskutiert.

Zudem wird diskutiert woraus die aufgezeigte Diskontinuität der Populationen (Gruppenbildung) innerhalb des Verbreitungsgebietes resultieren kann. Hier werden Zusammenhänge mit den Klimaveränderungen während des letzten Glazialen Maximums und danach vermutet. Diese können zu einer Verdrängung der Art in mindestens zwei Refugien geführt haben, aus denen sich die Art später in die Fläche ausgebreitet hat. Die mögliche Lage von zwei Refugien im Randbereich der Kleinen Karoo wird in der Diskussion vorgestellt.

Ein Mantel-Test ergab für alle 15 Populationen eine niedrige aber signifikante Korrelation von genetischer und geografischer Distanz. Der Korrelationswert ist innerhalb der Westgruppe etwas höher und für die Ostgruppe sehr niedrig und nicht signifikant. Isolierung durch Distanz ist demnach nicht der prägende Faktor zwischen den Populationen.

Mittels AMOVA wurde die genetische Varianz innerhalb der Populationen mit 59 % festgestellt, die zwischen den Populationsgruppen beträgt dagegen 26 %. Im Vergleich mit anderen Studien

sind diese Werte typisch für Populationen von Arten, die langlebig und vorwiegend auskruzend sind und zudem noch zum Ende der Sukzession auftreten. Diese Annahmen können auch für *G. nuciforme* gemacht werden.

Erstellung einer Gattungsphylogenie für die Gattung *Gibbaeum*: Neben *G. nuciforme* treten noch weitere Arten der Gattung, die nur in der Kleinen Karoo und angrenzenden Bereichen vorkommt, auf Quarzflächen auf. Zudem weisen innerhalb der Gattung einige Arten eine ähnliche Wuchsform wie *G. nuciforme* auf. Die Erstellung einer auf molekularen Daten basierenden Phylogenie der Gattung kann möglicherweise Aufschluß darüber geben, ob sich die Anpassung an das Habitat Quarzfläche mehrfach unabhängig voneinander innerhalb der Gattung entwickelt hat, ähnliches gilt für die Wuchsform als Nanochameaeophyten. Es kamen verschiedene Marker zum Einsatz, ITS-Sequenzen, AFLPs, ccSSRs und ISSRs. Die ITS Sequenzen ergaben für die 16 untersuchten Arten der Gattungen sowie der Außengruppe 10 phylogenetisch potenziell informative Veränderungen der Sequenz. Dies reicht nicht aus, um eine Phylogenie zu erstellen, die statistisch abgesichert werden kann. Auch die Ergebnisse der ccSSR- und ISSR-Markeruntersuchungen weisen einen Mangel an Polymorphismen auf. Dieser Mangel wird mit der starken, schnellen und jungen Radiation der gesamten Unterfamilie der Ruschioideae erklärt. Die AFLP-Daten weisen hingegen viele Polymorphismen auf, diese ergeben in der phylogenetischen Berechnung jedoch keine Strukturen. Es wird daher vermutet, dass es während der Entstehung der Arten mehrfach zu Hybridisierungsereignissen zwischen den Pflanzen gekommen ist und somit kein klares phylogenetisches Signal aus den Daten für die Gattung zu erwarten ist. Die Daten weisen ebenfalls einen hohen Homoplasieindex auf. Aufgrund der berechneten Phylogenien wird spekuliert, dass sich sowohl die Etablierung von Arten auf Quarzflächen als auch die Wuchsformen mehrfach innerhalb der Gattung entwickelt haben könnten.

7 Abstract

Populations of *Gibbaeum nuciforme*: The Aizoaceae *Gibbaeum nuciforme* is endemic to the quartz fields of the Little Karoo in South Africa. The quartz fields form azonal habitat islands. Schmiedel conducted intensive research on quartz fields in South Africa concerning the vegetation and the habitat parameters (Schmiedel, 2002, Schmiedel & Jürgens, 2004). A subject of this work was to implicate the island like distribution of the plants habitat with possible detectable differences between individuals and populations. 15 populations of *G. nuciforme* were sampled for this study; with this the whole distribution area of the species is covered. Parameters concerning the habitat, vegetation and certain plant characteristics were assessed. Number of leaf-pairs, number of fruits and macroscopic leaf characteristics were collected. Data were evaluated and the assignment of individuals to populations was tested by discriminant analysis. However, no clear assignment was detected.

The molecular marker AFLP was applied to the populations. The individuals can be characterised by AFLPs as each individual shows a unique AFLP-profile. Analysis of the AFLP-data by discriminant analysis showed a highly significant assignment of individuals and the origin population. The graphic picture of a PCO displays overlapping areas of populations. Analysing the data by PCO and distance measures, two groups of populations emerge. The both groups were conferred to as western- and eastern population group, according to their occurrence in the Little Karoo. Against the background of the groups the characters of the individuals were tested for these groups and some were found to show significant differences between individuals of the western and the eastern group. This was the height of leaves above ground and the existence of translucent areas in the leaf tips. The findings are discussed and interpreted in combination with the climate and adaptations. Furthermore, the genetic discontinuity of the populations in the distribution area is considered. Changes in the climate during and after the last glacial maximum are discussed to have had influence on the recent structure. It probably resulted in displacing the species into refugia. Two hypothetical refugia in border areas of the Little Karoo are suggested.

A Mantel-test shows for the 15 populations low but significant correlation of genetic and geographic distances. For only the western-group the factor increases little, the eastern group shows no significant correlation at all. Isolation by distance is probably not the most driving factor between the populations.

AMOVA shows the highest amount of genetic variation to be situated within the populations (58 %), followed by the variance between the two population groups with 26 %. This is in accordance with other studies which show this to be typical for long living, mainly out crossing plants that occur in later stadiums of succession.

Phylogeny of the genus *Gibbaeum*: Not only *G. nuciforme* grows exclusively on quartz fields but also some other species of the genus *Gibbaeum* do. Furthermore some species in the genus also show the same growth form as *G. nuciforme* with highly succulent leaves and a rounded shaped leaf pair body. Constructing a phylogeny of the genus could help to

understand how often the adaptation to the quartz habitat occurred, same for the growth forms. ITS-sequences as well as AFLPs, ccSSRs and ISSRs were employed. The ITS-sequences resulted in to ten informative polymorphisms between the 16 species and one outgroup. This is not sufficient to construct a phylogeny of the genus, saying nothing of bootstrap confirmation. Also ccSSR and ISSR marker showed low amount of polymorphisms. These findings are in accordance with the thesis that the subfamily Ruschioideae has undergone a recent, strong and very fast radiation. In contrast to the other markers AFLPs showed a high amount of polymorphic fragments, but no phylogenetic structure was detected in the analysis. It is assumed that during the speciation process hybridisation took place several times. The data show a high signal for homoplasy. Based on the trials to analyse the phylogentic structure of the genus, some small groups were supported by bootstraps. The interpretation of these groups leads to the hypothesis that growth form and colonisation of the quartz field probably occurred manifold in the genus.

8 Literatur

- Ag-Boden (1994) *Bodenkundliche Kartieranleitung*, Hannover.
- Axelrod, D. I. & Raven, P. H. (1978) Late Cretaceous and Tertiary vegetation history. IN WERGER, M. J. A. (Ed.) *Biogeography and Ecology of Southern Africa*. The Hague.
- Bittrich, V. (1986) Untersuchungen zum Merkmalsbestand, Gliederung, Abgrenzung der Unterfamilie Mesembryanthemoideae (Mesembryanthemaceae FENZL.). *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg*, 21, 5-116.
- Bittrich, V. & Hartmann, H. E. K. (1988) The Aizoaceae. a new approach. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 97, 239-254.
- Bull-Hereñu, K., Martínez, E. A., Squeo, F.A. (2005) Structure and genetic diversity in *Colliguaja odorifera* Mol. (Euphorbiaceae), a shrub subjected to Pleistocene-Holocene natural perturbations in a mediterranean South American region. *Journal of Biogeography*, 32, 1129-1138.
- Chung, S.-M. & Staub, J. E. (2003) The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence regions in a diverse array of plant taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 757-767.
- Coetzee, J. A. (1978) Climatic and biological changes in south western Africa during the late Cainozoic. *Palaeoecology of Africa*, 10-11, 13-29.
- Cowling, R. M. & Hilton-Taylor, C. (1999) Plant biogeography, endemism and diversity. IN DEAN, W. R. J. & MILTON, S. J. (Eds.) *The Karoo: ecological patterns and processes*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Cowling, R. M. & Pressey, R. L. (2001) Rapid plant diversification: Planning for an evolutionary future. *PNAS*, 98, 5452-5457.
- Demesure, B., Comps, B. & Petit, R. J. (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 50, 2515-2520.
- Demesure, B., Sodzi, N. & Petit, R. J. (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4, 129-131.
- Desmet, P. G. & Cowling, R. M. (1999) The climate of the karoo - a functional approach. IN DEAN, W. R. J. & MILTON, S. J. (Eds.) *The karoo, Ecological patterns and processes*. 1 ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- Desmet, P. H. (2004) Designing a Living Landscape for Biodiversity Conservation in the Knersvlakte Region of the Succulent Karoo, South Africa: A Systematic Conservation Planning Approach. Cape Town, University of Cape Town.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M. H. & Petit, R. J. (1997) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, 6, 189-191.
- Dumolin, S., Demesure, B. & Petit, R. J. (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 1253-1256.
- Durka, W., Voitke, M., Hartung, W., Hartung, S. & Heilmeier, H. (2004) Genetic diversity in *Chamaegigas intrepidus* (Scrophulariaceae). *Proceedings of the 2nd Symposium of the A.F.W. Schimper-Foundation*, 257-265.
- Egbert, K. J. & Martin, C. E. (2000) Light penetration via leaf windows does not increase photosynthesis in three species of desert succulents. *Journal of Plant Physiology*, 157, 521-525.

- Elling, B. (2004) Untersuchungen zur weltweiten Verbreitung von *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Aizoaceae) mit molekularen Methoden, Diplomarbeit. *Biologie*. Hamburg, Universität Hamburg.
- Ellis, A. G. & Weis, A. E. (2006) Coexistence and differentiation of "flowering stones": the role of local adaptation to soil microenvironment. *Journal of Ecology*, 94, 322-335.
- Ellis, A. G., Weis, A. E. & Gaut, B. S. (2006) Evolutionary radiation of "stone plants" in the genus *Argyroderma* (Aizoaceae): unraveling the effects of landscape, habitat, and flowering time. *Evolution*, 60, 39-55.
- Ellis, A. G., Weis, A. E. & Gaut, B. S. (2007) Spatial scale of local adaptation and population genetic structure in a miniature succulent, *Argyroderma pearsonii*. *New Phytologist*.
- Epperson, B. K. (2003) *Geographical Genetics*, Princeton and Oxford, Princeton University Press.
- Fu, Y. B. (2000) Effectiveness of bulking procedures in measuring population-pairwise similarity with dominant and co-dominant genetic markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1284-1289.
- Fu, Y. B., Whitwill, S., Fernandez, Y. S. N., Coulman, B. E. & Richards, K. W. (2003) Bulking generated considerable bias in detection of amplified fragment length polymorphism variation in oat, fringed brome and smooth brome grass. *Molecular Ecology Notes*, 3, 476-478.
- Gallagher, K. G., Schierenbeck, K. A. & D'antonio, C. M. (1997) Hybridization and introgression in *Carpobrotus* ssp. (Aizoaceae) in California II. Allozyme Evidence. *American Journal of Botany*, 84, 905-911.
- Gatt, M. K., Hammet, K. R. W. & Murray, B. G. (2000) Molecular phylogeny of the genus *Dahlia* Cav. (Asteraceae, Heliantheae-Coreopsidinae) using sequences derived from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133, 229-239.
- Genecodes Sequencher 3.1.1.
- Glen, H. F. (1974) A Revision of the Gibbaeinae (Mesembryanthemaceae), Master Thesis. Cape Town, University of Cape Town.
- Glen, H. F. (1975) The history of the genus *Gibbaeum* and its allies. *Aloe*, 13, 81-87.
- Goldblatt, P. & Manning, J. (2000) *Cape Plants, a conspectus of the Cape Flora of South Africa*, Pretoria and St. Louis, National Botanical Institute of South Africa and MBG Press.
- Goldblatt, P. & Manning, J. C. (2002) Plant diversity of the Cape Region of Southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 89, 281-302.
- Hall, T. A. (1999-2004) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- Hammer, S. (o.J.) The New Mastering the Art of Growing Mesembs. <http://homepages.nyu.edu/~ms689/NMAGM.html>, Stand Januar 2007.
- Hammer, S. & Hartmann, H. E. K. (1990) Shedding light on windows - in Conophytum. *Cact. Succ. J.*, 62, 35-42.
- Hamrick, J. L. (1987) Gene flow and distribution of genetic variation on plant populations. IN URBANSKA, K. M. (Ed.) *Differentiation pattern in higher plants*. London, Academic Press.
- Hartmann, H. (1978a) Zur Kenntnis der Gattung *Cephalophyllum* N.E.Br. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 99, 264-302.
- Hartmann, H., E.K. (2001) *Gibbaeum Ruschioideae*. IN HARTMANN, H. E. K. (Ed.) *Illustrated Handbook of succulent plants Aizoaceae F-Z*. Springer.

- Hartmann, H. E. K. (1978b) Monographie der Gattung *Argyroderma* N.E.Br. (Mesembryanthemaceae Fenzl.). *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg*, 15, 121-135.
- Hartmann, H. E. K. (1988) Fruit Types in Mesembryanthema. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 63, 313-349.
- Hartmann, H. E. K. (2006) Adaptations and phytogeography in the ice-plant family (Aizoaceae) - the interaction of the genetic equipment and ecological parameters. II Hide-and-see: plants sunk into the ground. *Bradleya*, 24, 1-38.
- Heinze (2001) A data base for PCR primers in the chloroplast genome. San Diego, USA, <http://bfw.ac.at/200/1859.html>.
- Hershkovitz, M. A. & Zimmer, E. A. (1997) On the evolutionary origins of cacti. *Taxon*, 46, 217-232.
- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907-913.
- Hewitt, G. M. (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68, 87-112.
- Hollingsworth, M. L., Bailey, J. B., Hollingsworth, P. M. & Ferris, C. (1999) Chloroplast DNA variation and hybridization between invasive populations of Japanese knotweed and giant knotweed (*Fallopia*, Polygonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 129, 139-154.
- Huang, J., Corke, H. & Sun, M. (2002) Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49, 541-550.
- Ihlenfeldt, H.-D. (1975) Some trends in the evolution of the Mesembryanthema. *Boissiera*, 24, 249-254.
- Ihlenfeldt, H.-D. (1978) Morphologie und Taxonomie der Gattung *Oophytum* N.E.Br. (Mesembryanthemaceae). *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 99, 303-328.
- Ihlenfeldt, H.-D. (1994) Diversification in an arid world: The Mesembryanthemaceae. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 25, 521-546.
- Jaspers, D. & Van Der Beek, J. G. M. (2004) Management plan for *Gibbaeum* species on Sanbona Wildlife Reserve, Western Cape. *Management plan*, 1-23.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A. & Stevens, P. F. (1999) Plant Systematics a phylogenetic approach. 1-464.
- Jürgens, N. (1986) Untersuchungen zur Ökologie sukkulenter Pflanzen des südlichen Afrikas. *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg*, 21, 139-365.
- Jürgens, N. (1991) A new approach to the Namib Region I: Phytogeographic subdivision. *Vegetatio*, 97, 21-38.
- Jürgens, N. (1996) Psammophilous plants and other adaptations to desert ecosystems with high incidence of sandstorms. *Feddes Repertorium*, 107, 345-359.
- Jürgens, N. (1997) Floristic biodiversity and history of African arid regions. *Biodiversity and Conservation*, 6, 495-514.
- Kimball, R. T., Crawford, D. J., Page, J. R. & Harmon, P. J. (2001) Inter-simple sequence repeat (ISSR) diversity within *Monarda fistulosa* var. *brevis* (Lamiaceae) and divergence between var. *brevis* and var. *fistulosa* in West Virginia. *Brittonia*, 53, 511-518.
- Kimura, M. & Weiss, G., H. (1964) The Stepping Stone Model of Population Structure and the Decrease of Genetic Correlation with Distance. *Genetics*, 49, 561-576.
- Klak, C. (2000) Aizoaceae. IN GOLDBLATT, P., MANNING, J (Ed.) *Cape Plants, a conspectus of the Cape Flora of South Africa*. Pretoria and St. Louis, National Botanical Institute of South Africa and MBG Press.

- Klak, C., Hedderson, T. A. & Linder, H. P. (2003a) A molecular systematic study of the Lampranthus group (Aizoaceae) based on the Chloroplast TrnL-trnF and nuclear ITS and 5S NTS sequence data. *Systematic Botany*, 28, 70-85.
- Klak, C., Khunou, A., Reeves, G. & Hedderson, T. A. (2003b) A phylogenetic hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) based on four plastid DNA regions. *American Journal of Botany*, 90, 1433-1445.
- Klak, C., Reeves, G. & Hedderson, T. (2004) Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature*, 427, 63-65.
- Koopman, W. J. M. (2005) Phylogenetic Signal in AFLP Data Sets. *Systematic Biology*, 54, 197-217.
- Kovach, W. (1999) Multi-Variate Statistical Package Version 3.1. Pentraeth, Kovach Computing Services.
- Kruckeberg, A. R. & Rabinowitz, D. (1985) Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 16, 447-479.
- Krulik, G. A. (1980) Light transmission in window-leaved plants. *Canadian Journal of Botany*, 58, 1591-1600.
- Landrum, J. V. (2001) Wide-band tracheids in leaves of genera in Aizoaceae: the systematic occurrence of a novel cell type and its implications for the monophyly of the subfamily Ruschioideae. *Plant Systematics and Evolution*, 227, 49-61.
- Levin, D. A. (2003) The ecological transition in speciation. *New Phytologist*, 161, 91-96.
- Lewis, C. A. (2005) Late glacial and Holocene palaeoclimatology of the Drakensberg of the Eastern Cape, South Africa. *Quaternary International*, 129, 33-48.
- Linder, H. P. (2003) The radiation of the Cape flora, southern Africa. *Biological Review*, 78, 597-638.
- Linder, H. P., Meadows, M. E. & Cowling, R. M. (1992) The history of the Cape flora. IN COWLING, R. M. (Ed.) *The ecology of fynbos*. Cape Town, Oxford University Press.
- Lindqvist-Kreuzer, H., Koponen, H. & Valkonen, J. P. T. (2003) Genetic diversity of arctic bramble (*Rubus arcticus* L. subsp. *arcticus*) as measured by amplified fragment length polymorphism. *Canadian Journal of Botany*, 81, 805-813.
- Liston, A. (1992) Variation in the chloroplast genes rpoC1 and rpoC2 of the genus *Astragalus* (Fabaceae): evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment. *American Journal of Botany*, 79, 953-961.
- Lynch, M. & Milligan, B. G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3, 91-99.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 189-197.
- Mayer, C. & Pufal, G. (eingereicht) Investigation of the breeding systems of four Aizoaceae species in Namaqualand, South Africa.
- Mc Dade, L. (1992) Hybrids and phylogenetic systematics. I. Patterns of character expression in hybrids and their implications for cladistic analysis. *Evolution*, 44, 1685-1700.
- Mc Garigal, K. C., Cushman, S. & Stafford, S. (2000) *Multivariate Statistics for Wildlife and Ecology research*, New York, Berlin, Springer.
- Michelmore, R. W., Paran, I. & Kesseli, R. V. (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88, 9828-9832.

- Midgley, G. F., Hannah, L., Millar, D., Rutherford, M. C. & Powrie, L. W. (2002) Assessing the vulnerability of species richness to anthropogenic climate change in a biodiversity hotspot. *Global Ecology & Biogeography*, 11, 445-451.
- Midgley, G. F., Hannah, L., Millar, D., Thuiller, W. & Booth, A. (2003) Developing regional and species-level assessments of climate change impacts on biodiversity in the Cape Floristic Region. *Biological Conservation*, 112, 87-97.
- Midgley, G. F., Hannah, L., Roberts, R., Macdonald, D. J. & Allsopp, J. (2001) Have Pleistocene climatic cycles influenced species richness patterns in the Greater Cape Mediterranean Region? *Journal of Mediterranean Ecology*, 2, 137-144.
- Miller, M. P. (1997) Tools for population genetics analysis (Tfpga) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. distributed by the author, <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/tfpga.asp>.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics*, 83, 583-590.
- Nybom, H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143-1155.
- Parolin, P. (2001) Seed expulsion in fruits of *Masembryanthema* (Aizoaceae): A mechanistic approach to study the effect of fruit morphological structures on seed dispersal. *Flora*, 196, 1-10.
- Petit, R. J., Csaikl, U. M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., Dam Van, B., Deans, J. D., Dumolin-Lapegue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A., Glaz, I., Goicoechea, P. G., Jensen, J. S., König, A. O., Lowe, A. J., Madsen, S. F., Mátyás, G., Munro, R. C., Olalde, M., Pemonge, M. H., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., Turchini, D., Vries De, S. G. M., Ziegenhagen, B. & Kremer, A. (2003) Chloroplast DNA variation in European white oaks Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*, 156, 5-26.
- Prendini, L. (2005) Scorpion diversity and distribution in Africa: pattern and process. IN HUBER, B. A., BRADLEY, J. S. & LAMPE, K.-H. (Eds.) *African Biodiversity*. New York, Spinger.
- Qui, Y.-X., Hong, D.-Y., Fu, C.-X. & Cameron, K. M. (2004) Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae). *Biochemical systematics and ecology*, 32, 583-596.
- Richardson, J. E., Weitz, F. M., Fay, M. F., Cronk, Q. C. B., Linder, H. P., Reeves, G. & Chase, M. W. (2001) Rapid and recent origin of species richness in the Cape flora of South Africa. *Nature*, 412, 181-183.
- Rieseberg, L. H., Church, S. A. & Morjan, C. L. (2003) Integration of populations and differentiation of species. *New Phytologist*, 161, 59-69.
- Ritz, C. M., Zimmermann, N. F. A. & Hellwig, F. H. (2003) Phylogeny of subsect. *Meleuphorbia* (A. Berger) Pax & Hoffm. (*Euphorbia* L.) reflects the climatic regime in South Africa. *Plant Systematics and Evolution*, 241, 245-259.
- Rudolph, B. (2001) *Entwicklung, Charakterisierung und genetische Kartierung von Mikrosatelliten-Markern beim Raps (Brassica napus L.)*, Göttingen, Cuvillier Verlag.
- Saar, D. E., Polans, N. O., Sorensen, P. D. & Duvall, M. R. (2001) Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 249-260.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning - A laboratory manual*, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.

- Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., De Haas, J., Dijkhoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W., Schouls, L. & Lenstra, J. A. (1999) Minireview: Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*, 3083-3091.
- Schmidt, K. & Jensen, K. (2000) Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *American Journal of Botany*, 87, 678-689.
- Schmidt, K. & Walter, R. (1990) *Erdgeschichte, 4. Auflage*, Berlin, Walter de Gruyter.
- Schmiedel, U. (2002) The Quartz Fields of Southern Africa: flora, phytogeography, vegetation, and habitat ecology, Dissertation. *Department of Biology*. University of Colone.
- Schmiedel, U. (2004) The phytogeography of the obligate quartz field flora of southern Africa. *Biodiversity & Ecology*, 2, 181-205.
- Schmiedel, U. & Jürgens, N. (1999) Community structure on unusual habitat islands: quartz-fields in the Succulent Karoo, South Africa. *Plant Ecology*, 142, 57-69.
- Schmiedel, U. & Jürgens, N. (2002) Untersuchungen zur Steuerung der Lebensformzusammensetzung der Quartzflächen-Vegetation im ariden südlichen Afrika. *Berichte der Reinhold-Tüxen-Gesellschaft*, 14, 45-58.
- Schmiedel, U. & Jürgens, N. (2004) Habitat ecology of southern African quartz fields: studies on the thermal properties near the ground. *Plant Ecology*, 170, 153-166.
- Schmiedel, U. & Mucina, L. (2006) Vegetation of the quartz fields in the Little Karoo, Tanqua Karoo and eastern Overberg (Western Cape Province, South Africa). *Phytocoenologia*, 36, 1-44.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Schönswetter, P., Tribsch, A., Barfuss, M. & Niklfeld, H. (2002) Several Pleistocene refugia detected in the high alpine plant *Phyteuma globularifolium* Sternb. & Hoppe (Campanulaceae) in the European Alps. *Molecular Ecology*, 11, 2637-2647.
- Scott, L., Anderson, H. M. & Anderson, J. M. (1997) Vegetation history. IN COWLING, R. M., RICHARDSON, D. M. & PIERCE, S. M. (Eds.) *Vegetation of Southern Africa*. Cambridge, Cambridge University press.
- Scott, L., Steenkamp, M. & Beaumont, P. B. (1995) Palaeoenvironmental conditions in Southern Africa at the pleistocene-holocene transition. *Quaternary Science Reviews*, 14, 937-947.
- Scott, L. & Vogel, J. C. (2000) Evidence for environmental conditions during the last 20 000 years in Southern Africa from ^{13}C in fossil hyrax dung. *Global and Planetary Change*, 26, 207-215.
- Siesser, W. G. (1980) Late Miocene Origin of the Benguela Upwelling System off Northern Namibia. *Science*, 208, 283-285.
- Silvertown, J. (1987) *Introduction to Plant Population Ecology*, Harlow, Longman Sci. Techn Burnt Mill.
- Surveys & Mapping (2000) 3320 Ladismith 1:125.000 South Africa. Surveys and Mapping, South Africa.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
- Thiede, J. (2004) Phylogenetics, systematics and classification of the Aizoaceae: a reconsideration based on molecular data. *Biodiversity & Ecology*, 2, 51-58.

- Treutlein, J., Smith, G. F., Van Wyk, B.-E. & Wink, M. (2003) Evidence for the Polyphyly of *Haworthia* (Asphodelaceae Subfamily Alooideae; Asparagales) Inferred from Nucleotide Sequences of *rbcl*, *matK*, ITS1 and Genomic Fingerprinting with ISSR-PCR. *Plant biology*, 5, 513-521.
- Urbanska, K. M. (1992) Populationsbiologie der Pflanzen, Grundlagen, Probleme, Perspektiven. 1-374.
- Van Rooyen, M. W., Theron, G. K. & Grobbelaar, N. (1990) Life form and dispersal spectra of the flora of Namaqualand, South Africa. *Journal of Arid Environments*, 19, 133-145.
- Van Wyk, A. E. & Smith, G. F. (2001) *Regions of floristic endemism in Southern Africa, a review with emphasis on succulents*, Hatfield, Umbadus Press.
- Vekemans, X. (2002) AFLP-SURV version 1.0. Bruxelles, Distributed by the author, Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles.
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M. & Roldan-Ruiz, I. (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, 11, 139-151.
- Vivrette, N. J. & Muller, C. H. (1977) Mechanism of invasion and dominance of costal grassland by *Mesembryanthemum crystallinum*. *Ecological Monographs*, 47, 301-318.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- Wang, X.-R., Chhatre, V. E., Nilsson, M.-C., Song, W., Zackrisson, O. & Szmidt, A. E. (2003) Island population structure of Norway Spruce (*Picea abies*) in northern Sweden. *International Journal of Plant Science*, 164, 711-717.
- Ward, J. H. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236-244.
- Ware, S. (1990) Adaptations to substrate - and lack of it - in rock outcrop plants- *Sedum* and *Arenaria*. *Am. J. Bot.*, 77, 1095-1110.
- Warwick, S. I., Al-Shehbaz, I. A., Price, R. A. & Sauder, C. (2002) Phylogeny of *Sisymbrium* (Brassicaceae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, 80, 1002-1017.
- Weather-Bureau (1988) Climate of South Africa. Climate statistics up to 1984. *Department of Environment Affairs*.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J. & WHITE, T. J. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, Academic Press.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wolfe, A. D. (2000) ISSR Resource Website, <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>.
- Wright, S. (1943) Isolation by Distance. *Genetics*, 28, 114-138.
- Ziegenhagen, B., Bialozyt, R., Kuhlenkamp, V., Schulze, I., Ulrich, A. & Wulf, M. (2003) Spatial patterns of maternal lineages and clones of *Galium odoratum* in a large ancient woodland: inferences about seedling recruitment. *Journal of Ecology*, 91, 578-586.

9 Anhang

9.1 Daten aus den Populationsuntersuchungen an *Gibbaeum nuciforme*

Tabelle 9-1: Angaben zur Matrix-Vegetation, Quarzbedeckung in der Population, Individuendichte und Populationsgröße der Populationen von *G. nuciforme*

Populationsnummer	G1	G2	G3	G4	G5
Matrix Vegetation außerhalb der Quarzfläche	keine Angaben	keine Angaben	<i>Pteronia pallens</i> , <i>Pteronia succulenta</i> , <i>Ruschia cardockensis</i> <i>Salsola spec.</i> , <i>Malephora lutea</i>	<i>Pteronia pallens</i> , <i>Salsola sp.</i>	<i>Pteronia pallens</i> ,
Quarzbedeckung %	keine Angaben	30 (20 Sandstein)	50, (30 dunkler Sandstein)	80	Sandsteinschotter zu 90%, >20cm durchm.
Neigung %	0	-	8	4	0
Individuen pro m2	4	15	0	7	4
Individuen pro m2	3	1	0	8	2
Individuen pro m2	0	16	1	12	0
Individuen pro m2	4	12	4	15	6
Individuen pro m2	0	9	2	2	3
Mittelwert Ind /m2	2,2	10,6	1,4	8,8	3
Anzahl Individuen geschätzt	150	150	150	1000	400
Länge Pop m	25	12	60	190	40
Breite Pop m	11	2	5	75	20

Populationsnummer	G6	G7	G8	G9	G10
Matrix Vegetation	<i>Pteronia pallens</i> , <i>Pteronia sculenta</i>	<i>Gibbaeum heathii</i> <i>Salsola sp.</i>	<i>Pteronia pallens</i> , <i>Malephora lutea</i> , <i>Ruschia cf. cymosa</i> , <i>Salsola sp.</i>	<i>Pteronia pallens</i> , <i>Drosanthemum lique.</i> , <i>Psilocaulon lept</i>	<i>Pteronia pallens</i> ,
Quarzbedeckung %	80	40	10	90	10 (80 Sandstein)
Neigung %	6	0	0	0	
Individuen pro m2	1	1	14	6	8
Individuen pro m2	26	6	80	9	1
Individuen pro m2	35	0	4	0	0
Individuen pro m2	43	4	0	0	22
Individuen pro m2	23	0	1	1	1
Mittelwert Ind /m2	25,6	2,2	19,8	3,2	6,4
Anzahl Individuen geschätzt	1000	50	500	50	250
Länge Pop m	25	11,5	22	5	10
Breite Pop m	16	7	3	3	10

Populationsnummer	G11	G12	G13	G14	G15
Matrix Vegetation	<i>Pteronia pallens</i> ,	<i>Pteronia pallens</i> ,	<i>Pteronia pallens</i> , <i>Malephora lutea</i>	<i>Gibbaeum gibbosum</i> , <i>Berkeia</i>	<i>Pteronia pallens</i> , <i>Drosanthemum spec. (fein, Adventivwurzeln)</i>
Quarzbedeckung %	90 (5 Sandstein)	95	10 - 40	90	30-90
Neigung %	0	2	0	0 - 1	1
Individuen pro m2	3	0	2	4	0
Individuen pro m2	23	32	0	4	0
Individuen pro m2	0	19	3	1	0
Individuen pro m2	0	1	0	2	8
Individuen pro m2	0	9	0	0	2
Mittelwert Ind /m2	5,2	12,2	1	2,2	2
Anzahl Individuen geschätzt	250	1000	250	500	250
Länge Pop m	30	130	250	350	120
Breite Pop m	25	50	20	330	30

Tabelle 9-2: Feld-Daten und Messungen an den einzelnen Individuen von *G. nuciforme*

Nummer (aus Population & Individuum)	G1-1	G1-2	G1-3	G1-4	G1-5	G1-6	G1-7	G1-8	G1-9	G1-10	G2-1	G2-2	G2-3	G2-4	G2-5	G2-6	G2-7
Anzahl Blattpaare/Individuum	5	7	14	3	28	6	10	9	45	6	16	3	14	7	14	15	12
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	f	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	nb	0	0	1	0	0	1	0	0	nb	nb	0	0	nb	1	0	0
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	20	17	12	14	14	14	27	29	23	13	18	17	19	14	18	32	15
Höhe von Boden bis Spitze mm	8	12	6	2	10	6	8	25	15	6	3	6	1	3	15	9	6
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	9	8	6	9	8	8	15	16	10	8	12	10	12	8	11	17	8
Länge kurzes Blatt in mm	nb	9	5	5	6	6	10	13	10	6	6	7	7	6	7	12	6
Länge des Spaltes in mm	8	6	7	8	6	6	8	13	7	6	11	8	14	5	10	10	5
Tiefe des Spaltes in mm	2	1,5	1	1	1,5	0	2	3	2	1	0,5	1,5	1,5	1	2	2	1,5
Anzahl frischer Fruchtkapseln	0	0	0	0	0	0	4	1	0	0	1	0	0	0	0	9	0
Anzahl alter Fruchtkapseln	0	3	7	0	22	3	0	0	10	0	7	2	8	0	1	20	0
Durchmesser Ind. in mm	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb	nb									

Nummer (aus Population & Individuum)	G2-8	G2-9	G2-10	G2-1	G2-2	G2-3	G2-4	G2-5	G2-6	G2-7	G2-8	G2-9	G2-10	G3-1	G3-2	G3-9	G3-4
Anzahl Blattpaare/Individuum	5	3	16	16	3	14	7	14	15	12	5	3	16	18	9	62	13
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	0	0	0	nb	0	0	nb	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	26	15	25	18	17	19	14	18	32	15	26	15	25	18	18	16	17
Höhe von Boden bis Spitze mm	8	1,5	11	3	6	1	3	15	9	6	8	1,5	11	8	5	10	10
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	14	7,5	13	12	10	12	8	11	17	8	14	7,5	13	10	12	9	8
Länge kurzes Blatt in mm	12	6	11	6	7	7	6	7	12	6	12	6	11	7	6	6	8
Länge des Spaltes in mm	11	4,5	12	11	8	14	5	10	10	5	11	4,5	12	6	5	7	6
Tiefe des Spaltes in mm	3	1	4	0,5	1,5	1,5	1	2	2	1,5	3	1	4	nb	1,5	2	1,5
Anzahl frischer Fruchtkapseln	0	0	0	1	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	3
Anzahl alter Fruchtkapseln	4	0	3	7	2	8	0	1	20	0	4	0	3	1	0	0	5
Durchmesser Ind. in mm	60	30	95	nb	60	30	95	70	60	140	65						

Nummer (aus Population & Individuum)	G3-5	G3-6	G3-7	G3-8	G3-3	G3-10	G4-1	G4-2	G4-3	G4-4	G4-5	G4-6	G4-7	G4-8	G4-9	G4-10	G5-1
Anzahl Blattpaare/Individuum	4	6	13	30	14	12	23	7	49	30	25	15	11	25	17	23	2
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	19	12	22	25	17	22	18	13	19	16	15	18	18	22	10	21	22
Höhe von Boden bis Spitze mm	15	9	5	10	8	10	10	8	9	6	6	6	5	20	5	10	20
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	10	7	13	14	9	12	11	6	10	10	8	11	11	13	5	13	11
Länge kurzes Blatt in mm	7	5	10	11	6	10	8	6	8	7	7	7	7	9	5	10	10
Länge des Spaltes in mm	9	4	8	13	6	9	6	5	6	11	7	8	9	9	6	8	8
Tiefe des Spaltes in mm	nb	1	nb	nb	0,5	2	1	2	2	1,5	2	3	1,5	4	2	2	nb
Anzahl frischer Fruchtkapseln	3	0	5	12	0	3	0	0	7	0	4	0	0	13	0	5	1
Anzahl alter Fruchtkapseln	2	1	5	1	0	2	0	0	0	3	9	4	1	3	0	5	0
Durchmesser Ind. in mm	35	40	75	110	55	100	80	40	120	90	110	80	65	130	60	90	35

Anhang

Nummer (aus Population & Individuum)	G5-2	G5-3	G5-4	G5-5	G5-6	G5-7	G5-8	G5-9	G5-10	G6-1	G6-2	G6-3	G6-4	G6-5	G6-6	G6-7	G6-9
Anzahl Blattpaare/Individuum	11	4	11	16	17	3	11	5	11	53	17	28	15	5	3	9	18
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	18	18	22	19	22	20	24	12	24	17	15	20	14	20	11	20	23
Höhe von Boden bis Spitze mm	10	6	20	7	15	10	12	5	20	8	10	12	10	10	3	9	14
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	10	10	11	11	13	10	13	7	14	8	8	10	8	11	6	10	14
Länge kurzes Blatt in mm	7	7	9	7	9	9	11	5	11	8	7	10	5	9	5	10	11
Länge des Spaltes in mm	9	6	10	8	8	8	11	5	9	5	11	8	5	12	7	10	14
Tiefe des Spaltes in mm	1	1	2	1	1	1	3	0,5	2,5	1	2	2	2	3	1	3	2
Anzahl frischer Fruchtkapseln	1	0	7	7	8	1	10	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Anzahl alter Fruchtkapseln	7	0	5	9	6	0	35	0	14	12	1	2	0	0	0	0	2
Durchmesser Ind. in mm	60	50	120	100	120	35	110	30	110	110	60	70	50	55	35	65	80

Nummer (aus Population & Individuum)	G6-8	G6-10	G7-1	G7-2	G7-3	G7-4	G7-5	G7-6	G7-7	G8-1	G8-2	G8-3	G8-4	G8-5	G8-6	G8-7	G8-8
Anzahl Blattpaare/Individuum	30	14	10	4	39	25	6	5	6	24	28	40	5	39	15	7	4
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	f	r	f	r	f	r	f	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	nb	0	1	0	1
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	17	15	22	13	22	23	12	19	16	14	11	12	15	16	16	17	24
Höhe von Boden bis Spitze mm	5	6	10	4	9	12	4	6	5	5	2	3	6	20	5	2	16
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	10	8	13	8	12	12	7	12	9	7	6	7	9	8	10	10	14
Länge kurzes Blatt in mm	7	6	7	4	9	10	4	7	6	6	4	5	6	8	6	5	9
Länge des Spaltes in mm	8	6	12	6	10	7	4	8	5	7	4	8	5	7	10	7	17
Tiefe des Spaltes in mm	2	2	1,5	4	1	3	0,5	3	0,5	1,5	2	1	0,5	4	1,5	2	5
Anzahl frischer Fruchtkapseln	0	0	3	0	1	0	0	0	0	4	6	2	0	6	8	3	0
Anzahl alter Fruchtkapseln	0	3	2	0	6	0	0	4	1	4	6	3	3	12	5	1	0
Durchmesser Ind. in mm	85	60	65	23	150	140	25	50	30	70	90	85	50	135	70	70	70

Nummer (aus Population & Individuum)	G8-9	G8-10	G9-1	G9-2	G9-3	G9-4	G9-5	G9-6	G9-7	G9-8	G9-9	G9-10	G10-1	G10-2	G10-3	G10-4	G10-5
Anzahl Blattpaare/Individuum	80	11	16	16	9	6	10	11	17	25	8	11	6	6	7	22	20
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r	f	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	nb	1	1	0	1	1	1
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	11	13	15	17	19	11	12	18	12	23	15	17	21	14	18	19	17
Höhe v. Boden bis Spitze mm	5	4	6	5	2	0,5	2	7	2	6	3	3	9	8	7	7	8
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	7	6	9	8	11	6	6	11	6	14	8	9	11	7	9	11	9
Länge kurzes Blatt in mm	4	5	6	8	8	4	4	7	6	9	7	7	6	5	7	8	8
Länge des Spaltes in mm	7	5	5	8	6	3	5	7	5	7	5	6	8	5	5	6	5
Tiefe des Spaltes in mm	2	1,5	1	2	1,5	1	2	1,5	1	2	nb	1,5	2	1	2	2	2
Anzahl frischer Fruchtkapseln	17	0	0	0	3	0	3	0	5	12	0	0	6	0	3	8	12
Anzahl alter Fruchtkapseln	10	5	0	6	6	0	1	3	0	4	1	3	7	0	1	9	12
Durchmesser Ind. in mm	130	50	55	60	50	35	40	65	60	120	50	50	50	35	55	80	100

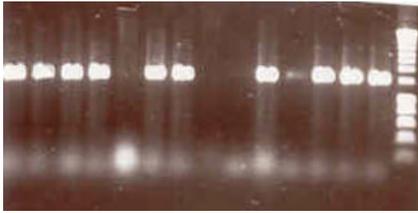
Anhang

Nummer (aus Population & Individuum)	G10-6	G10-7	G10-8	G10-9	G10-10	G11-1	G11-2	G11-3	G11-4	G11-5	G11-6	G11-7	G11-8	G11-9	G11-10	G12-1	G12-2
Anzahl Blattpaare/Ind	10	2	41	20	9	10	10	22	10	9	6	6	15	7	16	43	15
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r	r	r	f	r	r	r	f	f	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	19	18	23	16	22	15	16	19	19	14	12	16	18	17	22	23	17
Höhe v.Boden bis Spitze mm	12	5	10	5	8	3	2	2	8	1	1	1	10	6	12	10	4
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	8	8	12	9	12	8	9	9	11	9	7	9	10	11	13	13	9
Länge kurzes Blatt in mm	8	7	9	6	8	7	5	7	7	5	5	6	7	5	8	9	8
Länge des Spaltes in mm	6	6	10	11	8	7	9	6	9	9	6	8	11	12	8	7	8
Tiefe des Spaltes in mm	1,5	1	2	2	1	3	1	1	1	3	1	1,5	3	2	1,5	3	2
Anzahl frischer Fruchtkapseln	5	0	20	12	7	2	0	0	2	1		0	0	0	5	8	2
Anzahl alter Fruchtkapseln	0	1	20	19	7	0	1	0	0	0	2	2	1	4	7	3	0
Durchmesser Ind. in mm	55	30	125	90	75	70	70	110	60	50	45	45	60	70	110	155	65

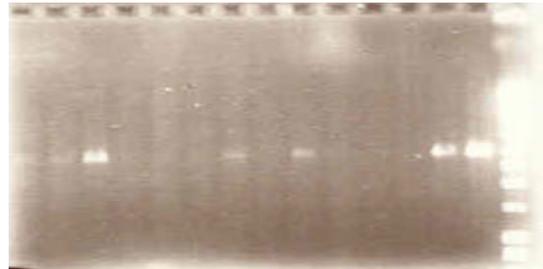
Nummer (aus Population & Individuum)	G12-3	G12-4	G12-5	G12-6	G12-7	G12-8	G12-9	G12-10	G13-1	G13-2	G13-3	G13-4	G13-5	G13-6	G13-7	G13-8	G13-9
Anzahl Blattpaare/Ind	18	8	20	57	4	27	132	10	32	22	13	11	17	58	15	327	74
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	15	18	16	20	17	22	17	20	18	24	18	27	19	14	17	18	19
Höhe v.Boden bis Spitze mm	4	15	8	10	11	15	10	9	4	6	6	11	3	5	5	5	10
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	9	10	9	12	9	13	9	12	11	12	9	14	9	7	8	13	11
Länge kurzes Blatt in mm	6	7	6	6	8	8	7	8	7	10	8	11	9	6	7	6	8
Länge des Spaltes in mm	7	8	5	10	8	7	7	7	6	8	5	7	11	8	5	5	9
Tiefe des Spaltes in mm	1,5	2	1	4	1,5	5	3	1	1,5	2	0,5	2	2	2	1,5	1	4
Anzahl frischer Fruchtkapseln	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	0	3	5	3	0	0	0
Anzahl alter Fruchtkapseln	0	0	0	5	3	1	7	0	13	6	0	0	6	5	0	20	8
Durchmesser Ind. in mm	70	70	75	180	40	120	220	80	145	95	60	70	85	180	65	330	150

Nummer (aus Population & Individuum)	G13-10	G14-1	G14-2	G14-3	G14-4	G14-5	G14-6	G14-7	G14-8	G14-9	G14-10	G15-1	G15-2	G15-3	G15-4	G15-5	G15-6
Anzahl Blattpaare/Individuum	32	5	5	17	24	23	7	6	12	24	25	12	23	12	18	22	33
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	28	18	18	18	13	15	19	22	31	14	23	15	19	23	18	21	18
Höhe von Boden bis Spitze mm	8	10	10	10	5	13	8	8	18	9	8	10	13	16	7	8	10
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	13	11	10	11	8	8	10	11	16	7	12	7	12	12	12	11	9
Länge kurzes Blatt in mm	12	7	8	8	5	7	8	9	13	6	11	6	7	10	7	9	6
Länge des Spaltes in mm	9	7	8	9	6	9	8	6	7	5	14	10	6	8	13	15	10
Tiefe des Spaltes in mm	2	1	1,5	2	1	2	1	0,5	3	1	5	4	3	3	2	6	4
Anzahl frischer Fruchtkapseln	0	0	0	4	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0
Anzahl alter Fruchtkapseln	2	2	0	5	2	0	5	2	8	0	4	1	7	8	23	0	0
Durchmesser Ind. in mm	140	50	40	80	75	80	60	55	140	70	110	70	95	100	100	110	950

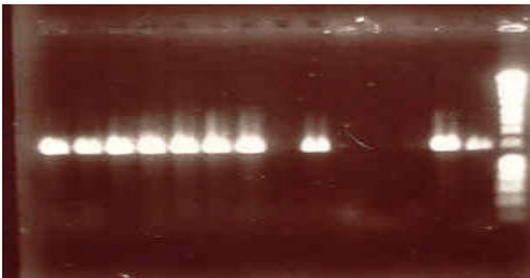
Nummer (aus Population & Individuum)	G15-7	G15-8	G15-9	G15-10
Anzahl Blattpaare/Individuum	16	27	28	18
Blätter oberseits rund (r) oder abgeflacht (f)	r	r	r	r
Durchscheinende Stellen im Blatt: 1 = vorhanden, 0 = fehlend	0	1	1	0
Breite des Blattpaares (Aufsicht) mm	14	21	23	22
Höhe v. Boden bis Spitze mm	4	8	14	11
Behaarung der Blätter, 0 = kahl, 1 = kurz behaart	0	0	0	0
Länge langes Blatt in mm (von Spalt bis Spitze)	7	12	14	11
Länge kurzes Blatt in mm	6	8	9	10
Länge des Spaltes in mm	5	14	9	8
Tiefe des Spaltes in mm	2	5	1	5
Anzahl frischer Fruchtkapseln	0	8	0	0
Anzahl alter Fruchtkapseln	0	4	16	0
Durchmesser Ind. in mm	60	160	130	120



15,14,13,12,11,10, 9, 8, 7, 6,5, 4, 3,1,Marker
Primerkombination G



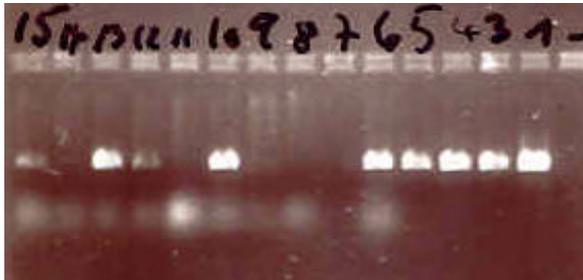
15,14, 13,12,11,10, 9, 8, 7,6, 5, 4, 3, 1,Marker
Primerkombination PK3



15,14,13,12,11,10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, M
Primerkombination E, erste PCR

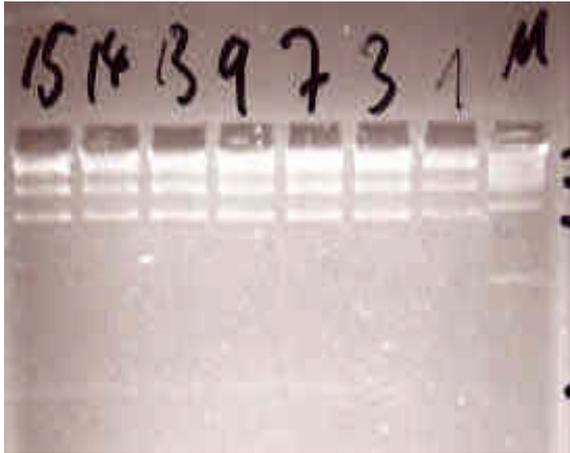


15,14,13,12,11,10,9,8, 7, 6, 5, 4, 3, 1,M
Primerkombination E, zweite PCR

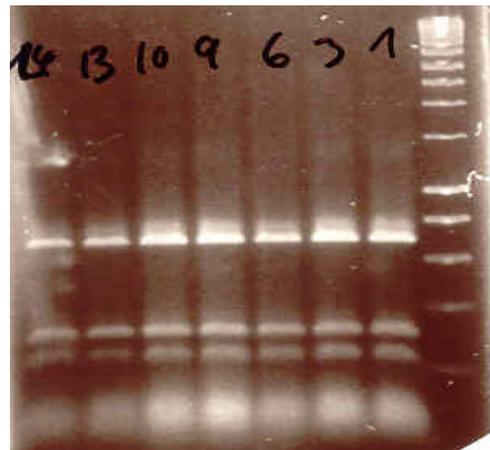


15,14,13,12,11,10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 1, -
Primerkombination J

Abbildung 9-1: Chloroplasten PCRs, Fotos der gefärbten Agarosegele der verschiedenen Primerkombinationen, die Zahlen beziehen sich auf die untersuchte Population. M = Längenmarker



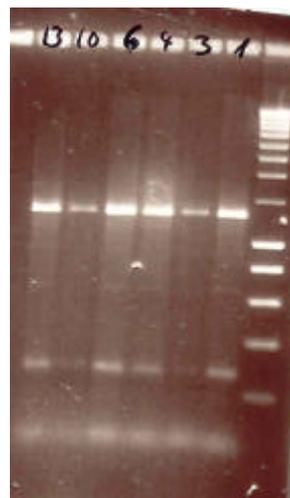
Primerkombination E mit BsuR1



Primerkombination G mit Alu



Primerkombination G mit BsuRI



Primerkombination G mit TaqI

Abbildung 9-2: Geschnittene Chloroplasten PCR-Produkte, Fotos der gefärbten Agarosegele für mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittene Fragmente, die Ziffern auf den Fotos beziehen auf die Populationen

Tabelle 9-3: Matrix der AFLP Daten für die Populationsuntersuchungen, Teildatensatz A, die Länge der Fragmente in Basenpaaren und der Reihenfolge wie sie in der unten stehenden Liste von links nach rechts (für drei Primerkombinationen) aufgeführt sind: 63, 68, 79, 80, 83, 89, 115, 117, 131, 149, 150, 152, 155, 176, 178, 179, 189, 195, 200, 220, 224, 228, 238, 247, 250, 264, 268, 270, 282, 292, 295, 313, 395, 478, 577, 578, 33, 35, 37, 41, 42, 50, 58, 60, 73, 92, 102, 104, 116, 128, 136, 139, 145, 146, 151, 155, 164, 167, 172, 180, 182, 193, 207, 221, 226, 234, 237, 239, 246, 251, 256, 260, 263, 282, 283, 307, 326, 331, 336, 365, 369, 372, 395, 397, 399, 404, 408, 460, 463, 470, 542, 591, 621, 87, 94, 99, 101, 103, 105, 109, 115, 125, 129, 132, 134, 136, 139, 141, 143, 149, 155, 157, 162, 167, 168, 175, 184, 186, 190, 197, 211, 213, 220, 223, 233, 244, 247, 260, 265, 274, 281, 286, 294, 306, 313, 329, 332, 345, 350, 353, 359, 364, 368, 419

Table with 2 columns: Identifier (e.g., G1-1, G1-2, G1-4) and a long binary string of 0s and 1s representing AFLP data for each identifier.

Tabelle 9-4: Matrix der AFLP Daten für die Populationsuntersuchungen, Teildatensatz B, die Länge der Fragmente in Basenpaaren und der Reihenfolge wie sie in der unten stehenden Liste von links nach rechts (für drei Primerkombinationen) aufgeführt sind: 67, 75, 88, 96, 97, 101, 103, 116, 120, 122, 126, 132, 141, 149, 153, 155, 170, 174, 176, 183, 193, 196, 202, 204, 213, 217, 222, 224, 234, 236, 239, 247, 250, 255, 257, 263, 269, 282, 284, 292, 294, 295, 304, 317, 318, 345, 348, 377, 385, 395, 426, 428, 432, 486, 497, 575, 34, 43, 83, 84, 86, 87, 95, 103, 108, 121, 131, 134, 139, 145, 161, 167, 197, 217, 228, 244, 245, 252, 257, 258, 260, 342, 350, 351, 357, 363, 394, 418, 469, 470, 45, 49, 54, 72, 76, 88, 91, 95, 100, 104, 111, 118, 129, 133, 136, 137, 138, 143, 151, 155, 158, 161, 164, 167, 171, 176, 179, 184, 220, 223, 224, 227, 228, 244, 265, 282, 284, 286, 290, 306, 314, 315, 334, 344, 352, 356, 362, 367, 370, 374, 390, 423, 428, 499, 527, 531, 533, 536, 558, 572, 588

Table with 15 rows (G1-6 to G15-5) and binary data columns. Each row represents a different primer combination and contains a long string of 0s and 1s representing AFLP data points.

Tabelle 9-5: Matrix der AFLP Daten für die Populationsuntersuchungen, Teildatensatz C, die Länge der Fragmente in Basenpaaren und der Reihenfolge wie sie in der unten stehenden Liste von links nach rechts (für drei Primerkombinationen) aufgeführt sind: 101, 105, 109, 116, 122, 124, 126, 132, 136, 150, 153, 155, 162, 166, 170, 174, 176, 192, 194, 196, 201, 205, 209, 211, 213, 217, 228, 239, 250, 256, 264, 270, 275, 277, 282, 292, 294, 317, 339, 357, 362, 363, 366, 384, 392, 395, 418, 422, 426, 428, 430, 438, 441, 442, 445, 451, 456, 493, 498, 512, 516, 519, 572, 576, 37, 47, 83, 96, 99, 111, 115, 117, 122, 124, 125, 131, 134, 137, 143, 150, 160, 168, 177, 193, 196, 200, 207, 209, 215, 218, 227, 247, 250, 260, 262, 265, 272, 302, 315, 331, 333, 374, 404, 410, 417, 424, 431, 45, 87, 90, 91, 95, 100, 103, 105, 110, 112, 122, 124, 127, 128, 129, 133, 134, 136, 137, 142, 143, 144, 145, 150, 156, 157, 163, 164, 167, 171, 175, 178, 184, 193, 197, 198, 220, 222, 223, 224, 232, 233, 238, 239, 244, 258, 265, 269, 282, 284, 285, 291, 295, 307, 315, 346, 347, 353, 357, 361, 363, 367, 424, 425, 450

Table with 15 columns (G1-7w to G15-10) and 15 rows of binary data (0s and 1s).

Tabelle 9-6: Kombinierte AFLP-Datenmatrix aus den Teildatensätzen A, B, und C für drei Primerkombinationen, in der Kopfzeile sind die Bandenpositionen aus jeder Primerkombination Gel in Basenpaaren angegeben

	117	131	150	152	155	176	195	200	238	250	264	268	282	292	295	395	577	87	94	99	103	132	136	139	143	155	157	162	167	175	184	220	223	244	265	281	286	306	313	345	368	145	226	260				
G1-1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0			
G1-2	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
G1-4	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
G1-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
G1-7	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
G1-8	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
G1-10	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
G2-1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
G2-2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
G2-3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
G2-4	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
G2-5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G2-6	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
G3-1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
G3-2	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
G3-4	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1		
G3-5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G3-7	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
G3-8	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
G3-10	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1		
G4-1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
G4-2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0		
G4-4	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1		
G4-5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0		
G4-7	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
G4-8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0			
G4-10	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
G5-1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
G5-2	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0		
G5-4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G5-5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G5-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
G5-8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
G5-10	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G6-1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G6-2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
G6-4	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G6-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	

G12-7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
G12-8	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
G12-10	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0			
G13-1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G13-2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
G13-4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0				
G13-5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0			
G13-7	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0			
G13-8	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0			
G13-10	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
G14-1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
G14-2	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G14-4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0		
G14-5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
G14-7	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
G14-8	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
G14-10	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G15-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G15-2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
G15-4	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
G15-5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
G15-7	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G15-8	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
G15-10	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabelle 9-7: AFLP-Datenmatrix für die Populationsuntersuchungen mit "bulked" DNA, jeweils zwei „bulkes“, A und B, für eine Population, Wiederholungen sind mit w oder x gekennzeichnet, Daten auf der Grundlage von vier Primerkombinationen

G1A	1101100100001110011000101010101000011100000010011011100001110001000001110010110000000101000010111001100010010
G1Axw	110110010000011001100010101010100000110000001001101110000011000000001110010110000000101000000111001100011010
G1B	1101000100001111011000101110101000011100000010011011100000110100010001110010110000000101000010100001100011010
G2A	110100010000100101100010101010100000110000001000101100000011000000001110100110000000101000010000001001000010
G2B	1101000100001011011000101011101010011100000010011011100001110000010001110010110000000101000110100001001010010
G3A	1101110100110110001000101011101011001100010010011011100011110001010001000010010010000101000101111001001011001
G3B	1101000100110110001000100010001010001100011010011011100000110000010001000000100001000101000000111001001011001
G4A	110100010010111000100010001010100000110001001001101100000011000000001000010110000000101000011101001001011101
G4B	10010001001011100100001010000011100011000000010110101000100000001010001000100000001000100111100110100011000
G5A	1011100100101000001000101001001011001100000100111011100011110001000000010000000010000101000010101001100011010
G5B	10111001001010000010001000000001010110000010010101110001111000000000010010000000100101000010101001000011011
G6A	1011000110000000010010011101101010111100010010011010101000000100010010010000010000000111100010100011000011001
G6Ax	1001100101000000010010000000010101111001100010111110101000100010110010010110000000110100010100111100001001
G6B	110100010001000001101010010110100001111001100010111101010001010001010001000000000000110100010100101010011001
G7A	1001000100000110011000001100001000010100000010011010101010000100000001010010110000001101110111101001101011101
G7B	100100010010000000100000100100110010000010000010101011100000000000100000001000000001000010111101010101011101
G8A	10111101000000110100001010000000001110000000000101010100111000000000010010110000001111110010101001101011001
G8B	100100010010100000100000001010011010000000000000000010100001000000000000000010000001000000000100110100011000
G9A	110100010000101000101011111011000001100111000101010111010000000010100001000010010000100100010100101010011011
G9B	1101000100001110001000011111011000011110111000101110110110000100010100010000000100000110101110100100110011000
G9Bx	100110010000111000100011000000100001111010100010101011010100010001010001000010000100100101110100100010011010
G10A	11011000000101000111100100000001001011100101010101010000000110000000100000000100100000101101100111001000001011
G10B	11011000000101000011100100000001011011100111110101001010000110000000000000000100100000101101100111001000011011
G11A	1001000100100010001000101101001001001110111100101010010011000010010100001000000100000100101110100100011011000
G11Ax	1001000100100000001000011000001001101110111100101011110001001100010100010010100000000100101110100100011011000
G11B	1101000100100000011000111101001000001110111100101011000000001000101000100000000000100100010100100011011000
G12A	10010001001010010100000011110011010111100010001110101010100000000010010000000000001100010000100011100010000
G12B	100101010010100101100010101100100000110000011001101100000000000101000010000000000000100010001100001101010000
G13A	1101000100110000001000101011011010001100011010011011100000010000010100000100000010000100100010101001011000
G13B	110100010001100000101001110001100000110001101001101110000111000011010000110000000000101100010100001101011000
G14Ax	101100010000100101000010100000111101110011101011101010100000000001000010010100001001000000100100010000000000
G14B	1011100100011000010000000000000001011110111010001010110000110000010000101001101100011001100010100000100000000
G15A	1101010100001001011000001011001011001101000110011011100000010000010101000010100000000101000001100001000011000
G15B	100101010000101000100000101100100000110100001010101010001001010001010110000000000000000000011100011100011000

9.2 Daten und Ergebnisse der Untersuchungen an der Gattung *Gibbaeum*

```

>Contig103wRF AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig98FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Con27RF AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGY
>Con23RF AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GMGGCCTCGC
>Con84wRF AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig_3-9FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig49wRF AACACGTTTA AACACATGGG AGGGATGCAT GCGGCCTCGT
>Contig_88FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig_40FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGY
>Contig_11-7 AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig_101FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGT
>Contig25FRkurz AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig52FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig_99wRF AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig100RF AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Cons30FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig35wkurz AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig_92FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig_104FR AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
>Contig_89fr AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
#1
.....
AACACGTTTA AACACATGGG AGGGACGCAT GCGGCCTCGC
* + *

>Contig103wRF GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig98FR GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Con27RF GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Con23RF GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCCCTCG
>Con84wRF GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig_3-9FR GTCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGTA CGCCCC:TCG
>Contig49wRF GCCGCCTGTC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig_88FR GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TTG
>Contig_40FR GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig_11-7 GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig_101FR GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig25FRkurz GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig52FR GCCACCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGTGCG CGCCCC:TCG
>Contig_99wRF GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig100RF GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Cons30FR GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig35wkurz GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig_92FR GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCT TGCCCC:TCG
>Contig_104FR GCGGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
>Contig_89fr GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
#41
.....
GCCGCCTGCC CCCTCCCCAC GCCGGGGGCG CGCCCC:TCG
**+ * * ** * *

>Contig103wRF CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig98FR CGGGCGTCCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Con27RF CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Con23RF CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Con84wRF CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_3-9FR CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig49wRF CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_88FR CGGGCGTCCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_40FR CGGGCGACCC CCGTCAAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC

```

Anhang

```

>Contig_11-7   CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_101FR  CGGGCGACCC CTGTTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig25FRkurzCGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig52FR    CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_99wRF  CGGGCGTCCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig100RF   CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Cons30FR      CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig35wkurzCGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_92FR   CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_104FR  CGGGCGTCCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
>Contig_89fr   CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
#81
.....
CGGGCGACCC CCGTCGAAAC AACGAACCCC GGCGCGGACC
          *      *      *

```

```

>Contig103wRF  GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GTGCC
>Contig98FR    GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GCGCC
>Con27RF       GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GCGCC
>Con23RF       GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GCGCC
>Con84wRF      GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig_3-9FR  GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig49wRF   GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC

```

```

>Contig_88FR   GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GCGCC
>Contig_40FR   GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GCGCC
>Contig_11-7   GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig_101FR  GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GCGCC
>Contig25FRkurzGCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig52FR    GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig_99wRF  GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCMY:GCGCC
>Contig100RF   GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGYGCC
>Cons30FR      GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCC:GTGCC
>Contig35wkurzGCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig_92FR   GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig_104FR  GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
>Contig_89fr   GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
#121
.....
GCGCCAAGGA ACATGAACAC ATAGCGTGCC CCCCCGCGCC
          ++* *

```

```

>Contig103wRF  CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig98FR    CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Con27RF       CGGTTCGCCG GMGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Con23RF       CGGTTCGCCG GCGTGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Con84wRF      CGGTTCGCCG GCGTGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_3-9FR  CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig49wRF   CGGTTAGCCG GYGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_88FR   CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_40FR   CGGTTTGCCG GAGTGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_11-7   CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_101FR  CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig25FRkurzCGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig52FR    CGGTTCGCCG GTGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_99wRF  CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig100RF   CGGTTYGCCG GCGTGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Cons30FR      CGGTTCGCCG GCGYCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig35wkurzCGGTTCGCCG GCGTGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_92FR   CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_104FR  CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
>Contig_89fr   CGGTTCGCCG GCGTGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
#161
.....
CGGTTCGCCG GCGCGCGGGT CGTGCACCTG TCCATACTTA
          *      * *

```

```

>Contig103wRF TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig98FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Con27RF TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Con23RF TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Con84wRF TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_3-9FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig49wRF TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_88FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_40FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_11-7 TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_101FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig25FRkurzTTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig52FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_99wRF TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig100RF TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Cons30FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig35wkurz TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_92FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_104FR TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
>Contig_89fr TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC
#201
.....
TTAAACGACT CTCGGCAACG GATATCTCGG CTCTCGCATC

```

```

>Contig103wRF GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig98FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Con27RF GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Con23RF GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Con84wRF GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_3-9FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig49wRF GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_88FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_40FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_11-7 GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_101FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig25FRkurzGATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig52FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_99wRF GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig100RF GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Cons30FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig35wkurz GATMAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_92FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_104FR GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
>Contig_89fr GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG
#241
.....
GATGAAGAAC GTAGCGAAAT GCGATACTTG GTGTGAATTG

```

+

```

>Contig103wRF CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig98FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Con27RF CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Con23RF CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Con84wRF CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_3-9FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig49wRF CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_88FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_40FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_11-7 CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_101FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig25FRkurzCAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig52FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC

```

Anhang

```

>Contig_99wRF CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig100RF CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Cons30FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig35wkurz CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_92FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_104FR CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
>Contig_89fr CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC
#281
.....
CAGAATCCCG TGAACCATCG AGTCTTTGAA CGCAAGTTGC

>Contig103wRF GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig98FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Con27RF GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Con23RF GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Con84wRF GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_3-9FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig49wRF GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_88FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_40FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_11-7 GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_101FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig25FRkurzGCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig52FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_99wRF GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig100RF GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Cons30FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig35wkurz GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_92FR GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_104FR GCCYGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
>Contig_89fr GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
#321
.....
GCCCGAAGCC TTCGGGCCGA GGGCACGTCT GCCTGGGCGT
+

>Contig103wRF CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig98FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGTG
>Con27RF CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Con23RF CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Con84wRF CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig_3-9FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig49wRF CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig_88FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGTG
>Contig_40FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig_11-7 CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig_101FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig25FRkurzCACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig52FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig_99wRF CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGTG
>Contig100RF CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Cons30FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig35wkurz CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig_92FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
>Contig_104FR CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGTG
>Contig_89fr CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
#361
.....
CACGCATCGC GTCTCCCCCT CCCACCTCGC GTGGGGGGGAG
*

>Contig103wRF GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig98FR GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGTTGGC
>Con27RF GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Con23RF GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC

```

Anhang

```

>Con84wRF      GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_3-9FR GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig49wRF   GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_88FR   GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_40FR   GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_11-7   GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_101FR  GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig25FRkurzGAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig52FR    GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_99wRF  GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig100RF   GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Cons30FR      GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig35wkurz GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_92FR   GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_104FR  GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
>Contig_89fr   GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
#401
.....
GAGGAGGATG GCCTCCCGTG CCTCACCGGG CGCGGCTGGC
+
*

>Contig103wRF CTAAAATGGG AGCCYACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig98FR    CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Con27RF       CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Con23RF       CTAAAATGTG AGCCCACGGC GACCAGCAGC CGCGGCGATT
>Con84wRF      CTAAAATGTG AGCCCACGGC GACCAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig_3-9FR CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig49wRF   CTAAAAAGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig_88FR   CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig_40FR   CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig_11-7   CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig_101FR  CTAAAATAGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig25FRkurzCTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig52FR    CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig_99wRF  CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig100RF   CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Cons30FR      CTAAAATGGG AGCCTACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig35wkurz CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGMGATT
>Contig_92FR   CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
>Contig_104FR  CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT

>Contig_89fr   CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
#441
.....
CTAAAATGGG AGCCCACGGC GACTAGCAGC CGCGGCGATT
***      *      *      +

>Contig103wRF GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig98FR   GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Con27RF      GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Con23RF      GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Con84wRF     GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig_3-9FR GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig49wRF  GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig_88FR  GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig_40FR  GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig_11-7  GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig_101FR GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig25FRkurzGGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig52FR   GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig_99wRF GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig100RF  GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Cons30FR     GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig35wkurz GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT
>Contig_92FR  GGTGGTGTGT AAGCATCGGT TAGCCGTCGC GCGCTCACGT

```

Anhang

```

>Contig_104FR  GGTGGTGTGT  AAGCATCGGT  TAGCCGTCGC  GCGCTCACGT
>Contig_89fr   GGTGGTGTGT  AAGCATCGGT  TAGCCGTCGC  GCGCTCACGT
#481           .....
                GGTGGTGTGT  AAGCATCGGT  TAGCCGTCGC  GCGCTCACGT

>Contig103wRF  CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig98FR    CGCCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Con27RF       CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Con23RF       CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Con84wRF      CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_3-9FR  CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig49wRF   CGCCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_88FR   CGCCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_40FR   CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_11-7   CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_101FR  CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig25FRkurzCGTCGGGGGA  GCTCGAAGCA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig52FR    CGTCGGGGGA  GATCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_99wRF  CGCCGGAGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig100RF   CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Cons30FR      CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig35wkurzCGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_92FR   CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_104FR  CGCCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
>Contig_89fr   CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
#521           .....
                CGTCGGGGGA  GCTCGAAGGA  CCCCGGGCGA  AAGCCCACAA
                *      *      *      *

>Contig103wRF  CCTTTGC
>Contig98FR    CCTTTGC
>Con27RF       CCTTTGC
>Con23RF       CCTTTGC
>Con84wRF      CCTTTGC
>Contig_3-9FR  CCTTTGC
>Contig49wRF   CCTTTGC
>Contig_88FR   CCTTTGC
>Contig_40FR   CCTTTGC
>Contig_11-7   CCTTTGC
>Contig_101FR  CCTTTGC
>Contig25FRkurzCCTTTGC
>Contig52FR    CCTTTGC
>Contig_99wRF  CCTTTGC
>Contig100RF   CCTTTGC
>Cons30FR      CCTTTGC
>Contig35wkurzCCTTTGC
>Contig_92FR   CCTTTGC
>Contig_104FR  CCTTTGC
>Contig_89fr   CCTTTGC
#561           .....
                CCTTTGC
                *

```

Abbildung 9-3: ITS Sequenz-Alingment (Export aus Sequencher), die Zahlen im jeweiligen Contignamen beziehen sich auf die Labornummern in Tabelle 2-1, Basen nach UPAC-Standard, unterste Zeile im Block ist die Consensussequenz mit + und * darunter als Hinweis für Ambiguitäten oder Polymorphismen

Tabelle 9-8: AFLP-Matrix für die untersuchten Arten der Gattung *Gibbaeum*

	1_G.heathii	2_G.nuciforme	25_G.album	29_G.gibbosum	32_G.dispar	44_G.pubescens	54_Jacobsenia	55_Lithops	57_Delosperma	58_G.pachypodium	59_G.velutinum	60_G.angulipes	62_G.pachypodium	65_G.esterhuyseniae	23_G.shandii	69_G.nuciforme	70_G.gibbosum_süd	71_G.geminum	72_G.nebrowii	36_G.petrense	74_Corpuscularia	75_Delosperma	14_G.nuciforme	7_G.hortenseae
60	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
81	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
91	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
95	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
132	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
147	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
156	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
159	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
162	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
166	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
171	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
183	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
187	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
190	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
197	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
199	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
201	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1
211	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1
227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
228	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
230	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
236	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
241	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
247	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
256	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
272	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
353	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
405	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
410	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
441	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
491	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
493	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
520	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
536	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
542	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
545	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
78	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
83	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
95	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
111	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
113	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
123	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
126	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
129	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang

130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
131	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
134	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
137	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
141	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
145	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1
154	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
156	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
161	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
163	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
171	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
176	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1
191	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
202	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
216	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
227	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
240	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
243	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
246	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
263	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
269	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
271	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
284	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
328	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
333	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
341	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
355	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
359	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
362	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
363	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
368	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
374	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
381	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
391	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
405	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
415	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
420	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
429	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
431	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
436	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
445	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
468	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
475	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
71	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
81	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
92	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
98	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0
102	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1
103	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
104	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1
105	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
108	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
111	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
112	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
113	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
118	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
122	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
124	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
128	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0

Anhang

510	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
40	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
57	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
58	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
60	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
61	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
63	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
71	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
77	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
90	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
94	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
97	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
104	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
107	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
109	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
111	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
113	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
116	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
121	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
126	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
128	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
133	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
135	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
137	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
152	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
159	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
162	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
166	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	
170	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
175	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
189	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
193	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
197	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
203	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
207	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
209	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
212	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
216	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
217	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
218	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
221	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
224	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
232	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
235	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
245	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
252	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
254	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
256	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
266	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
271	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
275	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
277	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
281	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
307	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
309	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
313	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang

323	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
328	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
331	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
344	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
347	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
352	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
353	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
354	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
356	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
374	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
377	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
385	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
389	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
397	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
486	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
529	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9-9: Ergebnistabelle der ccSSR Untersuchungen für die Gattung *Gibbaeum*

			ccSS R_7	ccS SR _9	9	9	ccS SR_ 11	ccS SR_ 12	ccS SR1 6	ccS SR_ 19	ccS SR_ 21	ccS SR_ 22
		bp	190	200	210	190	180	250	350	370	100	200
33693	<i>Corp lehman</i>	74	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
33825	<i>Corpusc. gracilis</i>	48	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
33672	<i>Corpusc. lehman.</i>	51	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
110138	<i>G.album</i>	25	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
110161	<i>G.angulipes</i>	60	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
104724	<i>G.angulipes</i>	64	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
109788	<i>G.austriicola</i>	30	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
110200	<i>G.austriicola</i>	39	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
pop11-10	<i>G.nuciforme</i>	11-- 10	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
110144	<i>G.nuciforme</i>	12	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
109850	<i>G.dispar</i>	32	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
109868	<i>G.dispar</i>	85	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
PvB/1	<i>G.esterhuy.</i>	65	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
110151	<i>G.geminum</i>	35	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
110158	<i>G.geminum</i>	71	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
110192	<i>G.gibbosumsü d</i>	28	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
110368	<i>G.gibbosum</i>	31	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
110185	<i>G.gibbosum</i>	67	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
110191	<i>G.gibbosum süd</i>	70	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
110174	<i>G.heathii</i>	Gh1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
110183	<i>G.nebrown</i>	20	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
102185	<i>G.nebrownii</i>	92	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
109863	<i>G.pachypod.</i>	58	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
110159	<i>G.pachypod.</i>	43	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
104991	<i>G.petrense</i>	36	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
110137	<i>G.petrense</i>	91	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
110181	<i>G.pubescen.</i>	44	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
109887	<i>G.pubescen.</i>	45	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
109887	<i>G.pubescen.</i>	88	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
110153	<i>G.shandii</i>	24	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
110146	<i>G.shandii</i>	68	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Barydale 1	<i>G.velutinum</i>	59	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
109804	<i>G.velutinum</i>	89	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
102417	<i>Jacobsenia vriegata</i>	54	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
102238	<i>Lithlops herrei</i>	55	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
104993	<i>G.hortens.</i>	Mh2	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
109878	<i>G.hortens.</i>	52	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

Tabelle 9-10: Auswertungstabelle Primer ISSR 5 und 4 für die Gattung *Gibbaeum*

Primer ISSR	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
~ bp	420	490	510	570	600	700	720	780	800	900	960	1000	1010	1200	3000	200	280	300	350	400	500	520	590	700	1000		
G_nuciforme_12	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0		
G_shandii_24	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
G_album_25	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
G_gibbosum_S_27	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	
G_gibbosum_S_28	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	
G_austriicola_30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	
G_geminum_34	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	
G_geminum_35	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	
G_austriicola_39	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
G_esterhuuse_40	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
G_pachypodium_43	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	
G_pubescens_45	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
G_pachypodium_47	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1
Corpusc_gracilis_49	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
G_hortenseae_52	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
G_dispar_84	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	
G_pubescens_88	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
G_velutinum_89	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
G_pertense_91	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	
G_nebrowii_92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
G_heathii_98	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
G_petrense_99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
G_gibbosum_100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
G_pachypod_101	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	
G_angulipes_104	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	