



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Karyogeografie des *Valeriana officinalis* – Aggregats in Mitteleuropa

angestrebter akademischer Grad

Magister/Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.) bzw.
Magister/Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser: Sabine Bressler
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): Diplomstudium Pharmazie
Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel

Wien, im Januar 2011

Vorwort

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Herrn ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel ganz herzlich bedanken für die zahlreichen interessanten Diskussionen, vor allem bei den statistischen Fragestellungen.

Weiters gilt mein Dank Dr. Christoph Dobeš, der mir das Thema vorgeschlagen hat und mir während der Arbeit mit seinem fachlichen Wissen stets zur Seite stand.

Großer Dank gilt auch Dipl. Biol. Valerie Klatte-Asselmeyer, die mit ihrer Begeisterung sofort mein Interesse für das Thema geweckt hat. Ihr möchte ich auch danken für die Bereitstellung der Sammeldaten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pharmakobotanik am Department für Pharmakognosie der Universität Wien möchte ich für das außerordentlich gute Arbeitsklima meinen Dank aussprechen.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mir das Studium nicht nur finanziell ermöglicht haben, sondern mir auch durch ihr Vertrauen viel Kraft gegeben haben.

Besonders herzlicher Dank gilt meinem Partner Christoph Buchegger, der mich auch in den schwierigen Phasen des Studiums immer mit seinem Glauben an mich zum Weitermachen motiviert hat.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	2
I. Einleitung.....	6
I.1 Allgemeines	6
I.2 Systematik des <i>Valeriana officinalis</i> agg.	7
I.3 Fortpflanzung und Artbildung	18
I.4 Pharmazeutische Bedeutung des <i>Valeriana officinalis</i> agg.....	23
I.5 Ziel der Diplomarbeit.....	25
II. Material und Methoden	28
II.1 Pflanzenmaterial	28
II.2 Durchfluss-Zytometrie.....	31
II.3 Chromosomenzählung	36
II.4 Statistik	39
III. Ergebnisse	41
III.1 Durchfluss-Zytometrie und Statistik.....	41
III.1.1 Einzelmessungen	41
III.1.2 Wiederholungsmessungen	50
III.2 Chromosomenzählung	56
IV. Diskussion.....	64
IV.1 Durchfluss-Zytometrie.....	64
IV.2 Chromosomenzählung	67
V. Zusammenfassung.....	71
VI. Summary	73
VII. Literaturverzeichnis	75
VIII. Anhang	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: morphologische Unterschiede zwischen den wichtigsten Typen.....	9
Abbildung 2: Verteilung der Typen auf die drei Ploidiestufen	9
Abbildung 3: Herbarbeleg des Grundtyps „ <i>exaltata</i> “	11
Abbildung 4: Herbarbeleg des Grundtyps „ <i>collina</i> “	12
Abbildung 5: Herbarbeleg des Grundtyps „ <i>procurrens</i> “	15
Abbildung 6: Herbarbeleg des Typs „ <i>sambucifolia</i> “	16
Abbildung 7: Herbarbeleg des Zwischentyps „ <i>versifolia</i> “	17
Abbildung 8: Entstehung der Autopolyploidie.....	20
Abbildung 9: getrocknete Baldrianwurzel.....	23
Abbildung 10: Karte, markiert mit den in Tirol und Vorarlberg gesammelten Populationen und Einzelpflanzen	28
Abbildung 11: Klimakammer an der Universität Wien.....	30
Abbildung 12: Freilandkultur der gesammelten Baldrianpflanzen.....	30
Abbildung 13: Prinzip der Durchfluss-Zytometrie.....	32
Abbildung 14: Partec Ploidy Analyser	34
Abbildung 15: Wurzelpräparation	37
Abbildung 16: Nikon ECLIPSE E600	39
Abbildung 17: durchfluss-zytometrische Messung eines diploiden Baldrians.....	42
Abbildung 18: durchfluss-zytometrische Messung eines tetraploiden Baldrians..	42
Abbildung 19: durchfluss-zytometrische Messung eines oktoploiden Baldrians..	43
Abbildung 20: Häufigkeiten der Indices.....	44
Abbildung 21: Regressionsdiagramm zwischen Index und Mean-X	45
Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der DNA-diploiden Baldrian-Pflanzen.....	46
Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der DNA-tetraploiden Baldrian-Pflanzen..	47
Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung der DNA-oktoploiden Baldrian-Pflanzen..	49
Abbildung 25: Verteilung der Häufigkeiten der DNA-diploiden, der DNA- tetraploiden und der DNA-oktoploiden Indices.....	50
Abbildung 26: Häufigkeiten der einfach gemessenen Baldrian-Pflanzen und der Wiederholungsmessungen.	52
Abbildung 22: Verteilung der Indices, nach den aufsteigenden Zahlen der Populationen geordnet	55

Abbildung 23: frühe Metaphase - Voff 34/4	58
Abbildung 24: Skizze des Teilungsstadiums aus Abbildung 23.....	58
Abbildung 25: frühe Metaphase - Voff 17/19	59
Abbildung 26: Skizze des Teilungsstadiums aus Abbildung 25.....	59
Abbildung 27: frühe Metaphase - Voff 14/6	60
Abbildung 28: Skizze des Teilungsstadiums aus Abbildung 27.....	60
Abbildung 29: Häufigkeitsdiagramm der Indices und die Fluoreszenz-Indices der chromosomal untersuchten Individuen.....	63
Abbildung 30: Karte mit den Ploidiestufen der Populationen von Tirol und Vorarlberg.....	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: statistische Verarbeitung der durchfluss-zytometrischen Ergebnisse der DNA-diploiden Populationspflanzen.....	45
Tabelle 2: statistische Verarbeitung der durchfluss-zytometrischen Ergebnisse der DNA-tetraploiden Populationspflanzen.....	46
Tabelle 3: statistische Verarbeitung der durchfluss-zytometrischen Ergebnisse der DNA-oktoploiden Populationspflanzen.....	47
Tabelle 4: zusammenfassende Statistik zu den durchfluss-zytometrisch vermessenen Baldrian-Pflanzen der Populationen	49
Tabelle 5: Ergebnisse der dreifachen Messwiederholungen der DNA-diploiden Pflanzen	51
Tabelle 6: Ergebnisse der dreifachen Messwiederholungen der DNA-tetraploiden Pflanzen	51
Tabelle 7: Ergebnisse der dreifachen Messwiederholungen der DNA-oktoploiden Pflanzen	51
Tabelle 8: Gegenüberstellung der CV% und der 95%-Konfidenzintervalle (Konf.int.) der Indices der diploiden Wiederholungsmessungen und der jeweiligen Populationen.....	53
Tabelle 9: Gegenüberstellung der CV% und der 95%-Konfidenzintervalle (Konf.int.) der Indices der tetraploiden Wiederholungsmessungen und der jeweiligen Populationen.....	53
Tabelle 10: Gegenüberstellung der CV% und der 95%-Konfidenzintervalle (Konf.int.) der Indices der oktoploiden Wiederholungsmessungen und der jeweiligen Populationen.....	53
Tabelle 11: Werte der zehnfachen Messwiederholungen.....	56
Tabelle 12: Ergebnisse der Chromosomenzählungen der diploiden Baldriane.....	61
Tabelle 13: Ergebnisse der Chromosomenzählungen der tetraploiden Baldriane.....	61
Tabelle 14: Ergebnisse der Chromosomenzählungen der oktoploiden Baldriane.....	62
Tabelle 15: Liste der Populationen mit den Beschreibungen der Sammelorte, Sammler und Sammeldatum.....	80
Tabelle 16: die durchfluss-zytometrisch ermittelten Indices der Einzelpflanzen.....	85
Tabelle 17: die durchfluss-zytometrisch ermittelten Indices der Populationspflanzen.....	87

Verwendete Abkürzungen und Symbole

Acqu.	Akkzessionsnummer
agg.	Aggregat
bzw.	beziehungsweise
CV %	Variationskoeffizient *100
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Em.	Einzelmessung
GABA	γ -Amino-Buttersäure
Hg	Quecksilber
Mw.	Mittelwert
N _{FCM}	Anzahl der mittels Durchfluss-Zytometrie gemessenen Individuen
N	Normalität
Pop. Nr.	Nummer der Population
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
Pop.	Population
s. lat.	sensu lato (im weiteren Sinn)
s. str.	sensu stricto (im engeren Sinn)
Stabw.	Standardabweichung
TCM	traditionelle chinesische Medizin
u.a.	und andere
Voff	Valeriana officinalis
x	Chromosomenrundzahl

I Einleitung

I.1 Allgemeines

Valeriana officinalis, der Arznei-Baldrian, wird im Volksmund auch Katzenkraut, Stinkwurz, Hexenkraut oder Augenzwurzel genannt. Der botanische Gattungsname stammt vom lateinischen „valens“, was „kräftig“ oder auch „gesund“ bedeutet (Stowasser, J. M. et al. 1997). Der deutsche Name Baldrian ist vermutlich angelehnt an den Namen des nordischen Lichtgottes Balder.

Das *Valeriana officinalis* agg. ist im gemäßigten bis arktischen Eurasien heimisch, im nordöstlichen Nordamerika eingebürgert. Die pharmazeutisch verwendete Baldrianwurzel stammt überwiegend aus Kulturen in Holland, Belgien und Osteuropa, wird aber in zunehmendem Maße auch in Deutschland, vor allem in Thüringen, angebaut (Wichtl, M. 2009).

Die Pflanze verträgt gelegentliche Überschwemmungen und kommt daher in feuchten Wiesen, Ufergebüsch, aber auch an sonnigen, felsigen Abhängen oder in Wäldern vor. Sie wächst auf mäßig nährstoffreichen Lehm- und Trockenböden, auch Kalkschuttböden, in Ebenen bis mittleren Gebirgslagen. Pflanzen trockener Standorte und Bergformen sind dabei meist aromatischer als Pflanzen feuchter Standorte (Zepernick, B. et al. 1983).

Es handelt sich beim *Valeriana officinalis* agg. um eine morphologisch heterogene Art. Je nach Kleinart ist das *Valeriana officinalis* agg. eine 20-150 cm hohe, aufrechte und ausdauernde Staude. Sie trägt fiederschnittige oder gefiederte Laubblätter. Es können Ausläufer vorhanden sein. Der Stängel ist kahl bis dicht behaart. Die Pflanze weist endständige Blütenstände in Form eines Thyrsus auf. Unterhalb dieser Hauptinfloreszenz können sich weitere Bereicherungstrieb aus den Blattachsen entwickeln (Weberling, F. 1961). Der Blütenstand trägt zwittrige Blüten von 4 bis 5 mm Durchmesser. Diese sind asymmetrisch und rosa bis weiß, die drei Antheren deutlich herausragend. Die Blütezeit reicht von Mai bis Juli. Zur Fruchtzeit wächst der Kelch zu einem behaarten Strahlenkranz aus. Die Reproduktion erfolgt sexuell über die Bildung von einsamigen Früchten oder vegetativ über die Bildung von Ausläufern.

Die Chromosomengrundzahl beträgt bei Baldrian $x = 7$. Sie steht für die Anzahl der Chromosomen eines einfachen, monoploiden Chromosomensatzes. Ein Organismus enthält jeweils zumindest zwei Ausgaben solcher einander homologen Chromosomen je Zellkern oder Genom. Bei Pflanzen ist dieser einfache Chromosomensatz jedoch häufig nicht nur zwei-, sondern mehrfach vorhanden. Dieser Umstand wird als Polyploidie bezeichnet. Durch die somatische Chromosomenzahl „ $2n$ “ wird die Anzahl der Chromosomen bzw. der einfachen Chromosomensätze der sporophytischen Generation eines Organismus dargestellt. *Valeriana officinalis* kann somatisch diploid, tetraploid oder oktoploid sein, wobei der Kern entsprechend jeweils $2n = 2x = 14$, $2n = 2x = 28$ oder $2n = 2x = 56$ Chromosomen aufweist.

Die Einteilung in die verschiedenen Klein- oder Unterarten wird unter anderem aufgrund der jeweiligen Ploidie getroffen. (Fischer et al. 2008)

I.2 Systematik des *Valeriana officinalis* agg.

Das *Valeriana officinalis* agg. nimmt folgende Stellung im phylogenetischen System ein:

Großreich:	<i>Eukaryota</i> (Kernhaltige)
Reich:	<i>Embryophyta</i> (Embryopflanzen)
Überabteilung:	<i>Tracheophyta</i> (Gefäßpflanzen)
Abteilung:	<i>Spermatophyta</i> (Samenpflanzen)
Unterabteilung:	<i>Angiospermophytina</i> (Angiospermae; Bedecktsamer)
Klasse:	<i>Rosopsida</i> (Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige)
Unterklasse:	<i>Asteridae</i> (Asterpflanzen)
Überordnung:	<i>Dipsacanae</i> (Dipsacales s. lat.; Kardenblütige)
Ordnung:	<i>Dipsacales</i> s. str. (Kardenartige im engeren Sinn)
Familie:	<i>Valerianaceae</i> (Baldriangewächse)
Art:	<i>Valeriana officinalis</i> agg. (Arzneibaldrian)

Der Versuch einer Gliederung des morphologisch vielfältigen Taxons *Valeriana officinalis* sensu lato in Mitteleuropa wurde mehrmals unternommen, mit unterschiedlichen Ergebnissen. Prof. Walter Titz versuchte, eine möglichst

objektive Gliederung durch konsequente Anwendung statistisch-biometrischer Verfahren zu erstellen (Titz, W., Titz, E. 1982). Er konnte seine Arbeit jedoch nicht beenden, sodass seine Ansätze, die nur zur vorläufigen Orientierung dienen sollten, nicht weiter entwickelt wurden.

In der Exkursionsflora von Österreich (Fischer et al. 2008) ist eine Einteilung von *Valeriana officinalis* agg. in die Unterarten *Valeriana officinalis* subsp. *excelsa*, *Valeriana officinalis* subsp. *sambucifolia*, *Valeriana officinalis* subsp. *officinalis*, *Valeriana officinalis* subsp. *vorarlbergensis*, *Valeriana officinalis* subsp. *tenuifolia* und *Valeriana officinalis* subsp. *versifolia* vorgenommen worden. Dieses Konzept stützt sich im Wesentlichen auf die Ergebnisse von Titz, weshalb diese hier nun näher erläutert werden sollen:

In Titz 1984 und Titz & Titz 1980, 1982 wird das *Valeriana officinalis* agg. für Mittel- und Südeuropa in vier morphologische „Grundtypen“ gegliedert. Als Kriterien für die weitere systematische Einteilung („Typen“ und „Übergangstypen“) werden Morphologie und Ploidie herangezogen, welche auf den folgenden Seiten für die wichtigsten Taxa noch genauer beschrieben werden. Darauf aufbauend lässt sich die Geografie und Ökologie der Sippen ermitteln. Die Grundtypen werden als „*exaltata*“, „*collina*“, „*procurrens*“ und „*sambucifolia*“ bezeichnet. Weiters ist „*versifolia*“ als stabilisierter Zwischentyp zwischen „*collina*“ und „*procurrens*“ zu erwähnen. Als Übergangstypen sind außerdem die tetraploiden „*vorarlbergensis*“ (zwischen „*collina*“ und „*exaltata*“) und „*valligena*“ (zwischen „*collina*“ bzw. „*vorarlbergensis*“ einerseits und „*versifolia*“ andererseits) vertreten (Titz E., Titz W. 1981). Eine schematische Darstellung der fünf wichtigsten Typen ist in Abbildung 1 zu sehen. In Abbildung 2 wird die Verteilung der Typen auf die drei Ploidiestufen verdeutlicht.

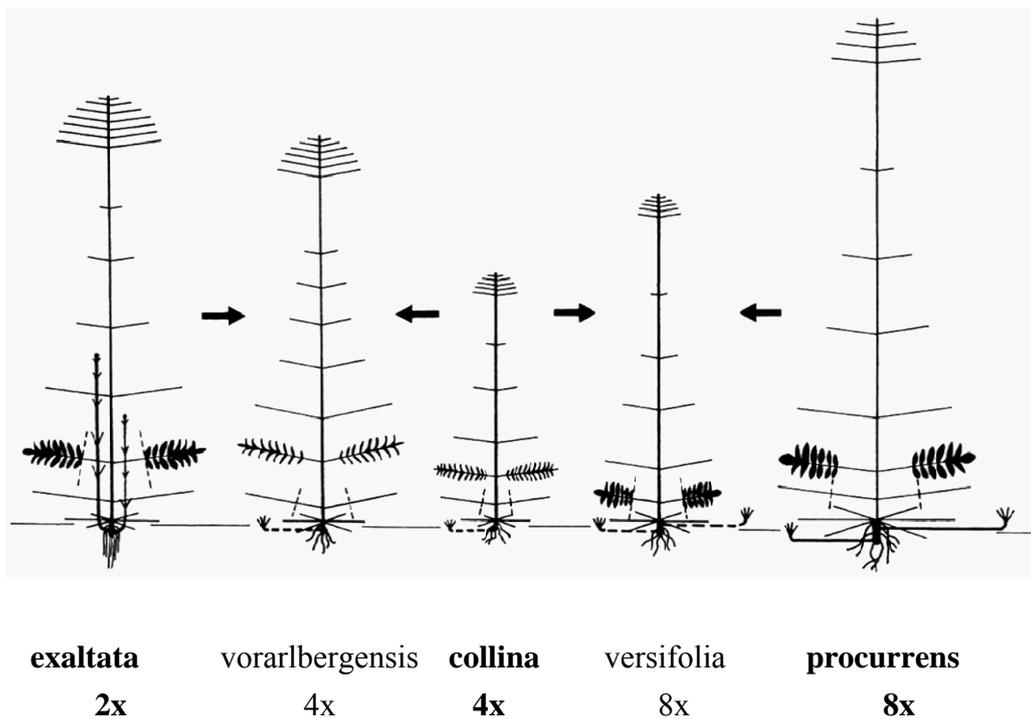


Abbildung 1: morphologische Unterschiede zwischen den wichtigsten Typen
(nach Titz, W. & Titz, E. 1982)

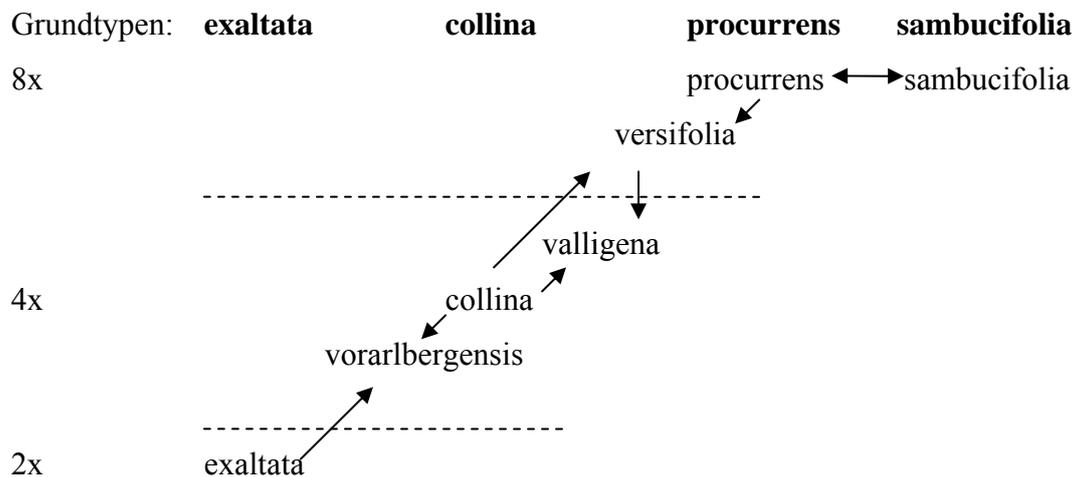


Abbildung 2: Verteilung der Typen auf die drei Ploidiestufen (nach Titz, W. & Titz, E. 1982)

Der Begriff „Typ“ ist jedoch nicht als taxonomisch verbindlich anzusehen, da eine solche Bewertung erst nach genauerer Verarbeitung des bisher zusammengetragenen Datenmaterials und regelkonformer Benennung möglich sein wird.

Im Folgenden werden die wichtigsten Typen von *Valeriana officinalis* agg. beschrieben, wobei jeweils auch ein Herbarbeleg aus dem Naturhistorischen Museum Wien angeführt ist. Die Belege wurden von Walter und Eva Titz den jeweiligen Typen zugeordnet (Titz, E. 1984).

Der Grundtyp „*exaltata*“ zeichnet sich durch hohen Wuchs (50-185 cm), zahlreiche und große Blütenstände und lange Blattstiele aus (Abbildung 3). Die Blätter bestehen aus breiten, vielzähligen und zugespitzten Fiedern, wobei Blüten und Früchte eher klein sind. Der Stängel ist meist kahl oder papillös, seltener auch ganz kurz und spärlich behaart, wohingegen die Blattunterseiten nur sehr selten kahl sind. Die Früchte können kahl oder behaart sein. Ausläufer sind sehr selten zu finden. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Osteuropa westlich bis nach Deutschland. Bevorzugt wächst „*exaltata*“ an tiefer gelegenen, feuchten Standorten. Dieser Grundtyp ist bei Titz der einzige diploide in Mitteleuropa. Die somatische Chromosomenzahl beträgt daher $2n = 2x = 14$. In der Literatur wird dieser Typ unter anderem auch als *Valeriana officinalis* subsp. *officinalis* (Fischer et al 2008), *Valeriana angustifolia* Tausch, *Valeriana latifolia* Vahl oder *Valeriana palustris* Kreyer bezeichnet. In diesem Werk werden auch genaue quantitative Angaben zu den Merkmalen aller Sippen gemacht, die hier nicht im Detail angeführt werden sollen.



**Abbildung 3: Herbarbeleg des Grundtyps „*exaltata*“
(Acqu. W 1987 – 6967)**

Der Grundtyp „*collina*“ weist Kleinwüchsigkeit, kleine Blütenstände, kurze Blattstiele und zahlreiche, ziemlich schmale ganzrandige bis schwach- und wenigzählige Fiedern auf. Blüten und Früchte sind eher klein (siehe Abbildung 4). Der Stängel sowie Blattunterseiten und Früchte sind meist behaart. „*Collina*“ kann unterirdische Ausläufer bilden. Dieser Typ stammt aus dem submediterranen Raum und die nördliche Arealgrenze verläuft mitten durch Deutschland. Es handelt sich um einen trockenheitsliebenden Typ. Die Chromosomenzahl dieses tetraploiden Grundtyps beträgt $2n = 4x = 28$. „*Collina*“ wird in der Literatur (Fischer et al 2008) auch als *Valeriana officinalis* subsp. *tenuifolia* bezeichnet.



Abbildung 4: Herbarbeleg des Grundtyps „*collina*“

(Flora von Kärnten)

Am westlichen Rand des Areals von „*exaltata*“ findet sich der tetraploide Typ „*franconica*“ als ein auf einen geographisch begrenzten Raum bezogener Sonderfall des Typs „*collina*“. „*Franconica*“ weist morphologisch eine große Ähnlichkeit mit „*exaltata*“ auf. Dieser Umstand findet sich auch beim im Alpenrheingebiet und Tiroler Inntal vorkommenden tetraploiden Typ

„*vorarlbergensis*“: Dieser ist ebenfalls morphologisch von „*exaltata*“ beeinflusst und diesem Typ ökologisch nahestehend.

Der Grundtyp „*procurrens*“ zeigt als Merkmale Hochwüchsigkeit, große Blütenstände, lange Blattstiele, meist große Blätter mit wenigen, breiten, häufig viel- und tiefzahnigen Fiedern (Abbildung 5). Diese sind mehr oder weniger breit oval-lanzettlich bis oval, zugespitzt, die Endfiedern meist breiter als die Seitenfiedern. Blüten und Früchte sind – wie bei allen oktaploiden Typen – groß. Die Pflanzen dieses Typs weisen nahezu immer Ausläufer auf. Fast alle Vertreter sind am Stängel dicht und lang behaart, wodurch sie sich gut von „*sambucifolia*“ unterscheiden lassen. Weiters sind viele Stängelblattpaare vorhanden. Die Blattunterseiten weisen immer eine ziemlich dichte Behaarung auf, die Früchte hingegen nur in Ausnahmefällen. Bei der Bestimmung ist es wichtig, nicht nur die Blattform, Stängel- und Blattunterseitenbehaarung im untersten, sondern im mittleren bis höheren Stängelbereich zu berücksichtigen, da sie hier optimal ausgebildet sind. Der Typ „*procurrens*“ wächst bevorzugt auf feuchtem Boden im Tiefland. Die Verbreitung erstreckt sich von Portugal bis in den Nordseeraum und östlich bis ins westlichste Österreich. Es finden sich auch Übergangsformen zu „*sambucifolia*“ und zu „*versifolia*“. Die Chromosomenzahl beträgt $2n = 8x = 56$. Der Typ „*procurrens*“ ist in der Literatur (Fischer et al 2008) auch unter dem Namen *Valeriana officinalis* subsp. *excelsa* bekannt.



Abbildung 5: Herbarbeleg des Grundtyps „*procurrens*“ (Blütenstände noch nicht vollständig entwickelt)

(Acqu. W 1987 – 02573)

Der Grundtyp „*sambucifolia*“ weist einen geringen Wuchs, kleine, oft schütterere Blütenstände und kurze Blattstiele auf (Abbildung 6). Die Blätter setzen sich aus wenigen, eher breiten oval-lanzettlichen bis ovalen, zugespitzten Fiedern zusammen. Die Blüten und vor allem die Früchte sind groß. Der Typ „*sambucifolia*“ bildet fast immer Ausläufer aus. Die Grundblätter weisen wenige, oft nur drei Fiedern auf. Während die Unterseiten der Grundblätter fast stets behaart sind, sind Stängel und Stängelblattunterseiten kahl oder nur spärlich und kurz behaart. Die Früchte sind fast stets kahl. „*Sambucifolia*“ wächst an feuchten und schattigen Standorten. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich von der Ukraine, Rumänien und Süd-Polen über die Tschechoslowakei bis Ost-Österreich, im Westen bis Ost-Bayern, Sachsen und Elbe abwärts bis zur Nordsee. Die Chromosomenzahl beträgt $2n = 8x = 56$. Dieser Grundtyp wird in der Literatur (Fischer et al 2008) unter anderem als *Valeriana officinalis* subsp. *sambucifolia* bezeichnet.



Abbildung 6: Herbarbeleg des Typs „*sambucifolia*“
(Acqu. W 1954 – 4841)

Der Übergangstyp „*versifolia*“, dessen Hauptverbreitungsgebiet die Westalpen und die westlichsten Ostalpen sind, weist zahlreiche Merkmale von „*procurrens*“ auf. Morphologisch handelt es sich um einen Zwischentyp (zwischen „*collina*“ und „*procurrens*“). Wie bei „*collina*“ handelt es sich um einen trockenheitsliebenden Typ. Er zeichnet sich – ähnlich dem Typ „*collina*“ – durch einen kleinen Wuchs (40-130 cm) und kleine Blütenstände aus (Abbildung 7). Eine Unterscheidung ist trotzdem möglich, da „*versifolia*“ lange Blattstiele und eher wenig Fiedern von schmal lanzettlich bis breit oval-lanzettlicher Gestalt aufweist, wobei der Fiederrand ganzrandig oder schwach bis tief gezähnt ist. Unter Umständen sind Ausläufer vorhanden. Die Pflanzen sind immer mehr oder weniger dicht an Stängel und Blattunterseite sowie an den Früchten behaart. Die Chromosomenzahl ist $2n = 8x = 56$. In der bisherigen Literatur (Fischer et al 2008) ist dieser Typ auch als *Valeriana officinalis* subsp. *versifolia* bekannt.



Abbildung 7: Herbarbeleg des Zwischentyps „*versifolia*“

(Acqu. W 1988 – 9458)

Ein Schlüssel zur Bestimmung von *Valeriana officinalis* s. l. in Deutschland (Titz, E. 1984; S. 39-42) soll ermöglichen, die Zuordnung einer Pflanze zum Typ „*exaltata*“, „*procurrens*“, „*collina*“, „*sambucifolia*“, „*versifolia*“ oder „*pratensis*“ zu treffen. Erfolgreicher ist eine solche Bestimmung, wenn man eine Population von mehreren Exemplaren heranzieht, da hier die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass das geforderte Merkmal gut erkennbar ist. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass eine bestimmte Anzahl von Pflanzen nicht eindeutig zugeordnet werden kann. In einem solchen Fall handelt es sich um Übergangsformen zwischen den Typen, auf deren Beschreibung das Aussehen der Pflanze am ehesten zutrifft.

Insgesamt bedarf die Einteilung in die Typen – wie bereits erwähnt – weiterer und genauerer Untersuchungen, um sie gegebenenfalls zu verifizieren, da es sich bis jetzt nur um einen vorläufigen Versuch einer Klassifizierung handelt.

I.3 Fortpflanzung und Artbildung

Die Fortpflanzung oder Reproduktion der Blütenpflanzen kann sexuell oder asexuell erfolgen. Der Vorteil der sexuellen Fortpflanzung, die über die Bildung von Samen erfolgt, ist die Möglichkeit der Neukombination des Erbgutes der Elternteile. Dadurch entsteht eine größere Vielfalt, die sich für die Pflanze häufig positiv auswirkt.

Die asexuelle Reproduktion über die Bildung von Ausläufern bietet hingegen den Vorteil, dass kein Partner nötig ist, dass erfolgreiche Typen genetisch stabil bleiben oder die zytologisch komplizierte Meiose umgangen werden kann.

Bei der sexuellen Reproduktion wird durch die Meiose oder Reduktionsteilung und die anschließende Fusion der gebildeten haploiden Gameten sichergestellt, dass der Nachkomme – wie seine Eltern – einen diploiden Chromosomensatz aufweist. Hierbei können zahlreiche Mutationen auftreten, zum Beispiel eine unvollständige oder unterbliebene Reduktion des diploiden Genoms. Solche Genommutationen betreffen vielfach den gesamten Chromosomensatz und können damit zu Polyploidie führen. Diese soll hier nun näher beschrieben werden, da sie einen wichtigen Mechanismus bei der Anpassung und Artbildung

von Pflanzen im Allgemeinen und potentiell auch bei *Valeriana officinalis* darstellt.

Als Polyploidie bezeichnet man das Vorhandensein von mehr als zwei kompletten Ausgaben des monoploiden Chromosomensatzes. Es handelt sich um eine häufige Erscheinung bei Pflanzen und auch bei Fischen und Amphibien. Grundsätzlich wird zwischen Autopolyploidie und Allopolyploidie unterschieden. Bei beiden sind mehrfache Ausgaben des Chromosomensatzes vorhanden, wobei bei der Autopolyploidie, je nach Definition, die Chromosomensätze eines Individuums oder von Individuen einer Art vervielfältigt wurden. Bei der Allopolyploidie hingegen stammen die Chromosomensätze von unterschiedlichen Arten und können sich genetisch entsprechend voneinander unterscheiden. In der Theorie wird zwischen diesen beiden Szenarien unterschieden. In der Praxis jedoch bewegen sich die Polyploidisierungsvorgänge je nach Species innerhalb des Spektrums zwischen diesen beiden Extremen. Auch eine Mischform, die Autoallopolyploidie, kann beobachtet werden. Auf die Autopolyploidie soll aufgrund der Relevanz für die Art *Valeriana officinalis* näher eingegangen werden. Die Mechanismen werden im Folgenden beispielhaft anhand der Entstehung eines autotetraploiden Organismus beschrieben:

Ein autopolyploider Organismus kann aus einer Fusion zweier diploider, also unreduzierter Gameten, welche immer wieder durch meiotische Zellteilungsfehler auftreten, hervorgehen. Da diese normalerweise jedoch nur mit geringer Häufigkeit auftreten, ist das Zusammentreffen von zwei dieser Ereignisse, und damit dieser Entstehungsweg, recht unwahrscheinlich bzw. selten. Auch ein anderer Weg kann zu einem tetraploiden Organismus führen: aus einem unreduzierten und einem reduzierten Gameten kann ein triploider Organismus entstehen. Ist dieser in der Lage, lebensfähige triploide Gameten zu erzeugen, kann durch die weitere Fusion (Rückkreuzung) mit einem reduzierten haploiden Gameten ein tetraploider Organismus entstehen. Die triploide Form fungiert auf diesem Weg zur Tetraploidie als „zytologische Brücke“ und ging als „triploid bridge“ in die Literatur ein. Eine weitere Möglichkeit stellt der Ausfall der mitotischen Kernteilung nach erfolgter Replikation des Genoms dar. Dadurch ist die Ploidie des somatischen Gewebes sowie der daraus gebildeten

Reproduktionsorgane und deren Gameten doppelt so groß wie die ursprüngliche Ploidiestufe. In allen drei Fällen (Abbildung 8) kann ein tetraploider, stabiler Nachkomme entstehen.

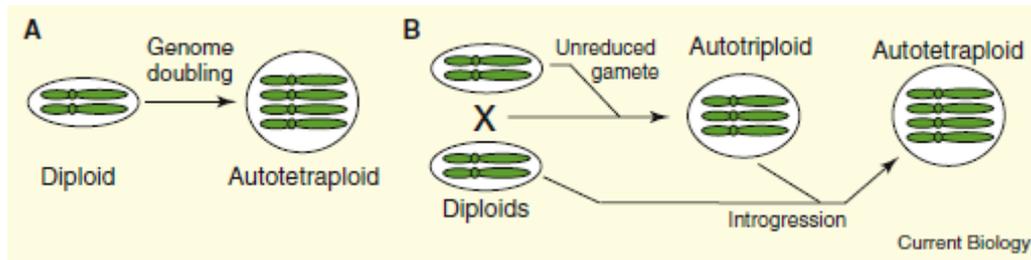


Abbildung 8: Entstehung der Autopolyploidie (aus Hegarty, J. M. et al. 2008)

Dieser ist allerdings nicht mehr ohne weiteres in der Lage, mit einem diploiden Organismus fertile Nachkommen zu erzeugen: der resultierende triploide Organismus ist im Allgemeinen steril oder in seiner Fertilität eingeschränkt, da seine Gametenbildung aufgrund der ungeraden Anzahl von Chromosomensätzen oft gestört ist. Die Fortpflanzung kann daher nur noch mit anderen tetraploiden oder mit unreduzierten Gameten eines diploiden Organismus möglich sein.

Daher ist der tetraploide Organismus nicht mehr oder nur eingeschränkt mit den diploiden fortpflanzungsfähig und kann sich zu einer eigenen, neuen Art entwickeln, falls er Nachkommen bilden kann und andere Voraussetzungen für seine evolutionäre Entwicklung gegeben sind.

Autopolyploidie ist also das Ergebnis einer Mutation der Chromosomenzahl, die Allopolyploidie entsteht hingegen durch Hybridisierung von Arten sowie vielfach Mutation der Chromosomenzahl. Neben tetraploiden können aus weiteren Polyploidisierungsprozessen auch andere Ploidieniveaus hervorgehen. Die Gesamtanzahl der Chromosomensätze ist terminologisch durch das griechische Präfix charakterisiert, z.B. tri- (3), tetra- (4), penta- (5) oder okta- (8).

Bei Pflanzen ist stabile Polyploidie alltäglich, was mit der erhöhten Widerstandsfähigkeit des größeren Genoms gegenüber äußeren (z. B. Umweltfaktoren) und inneren Einflüssen (z. B. Mutationen) begründet wird. Durch das zahlreiche Auftreten von stabiler Polyploidie bei Fischen und Fröschen zeigt sich, dass Polyploidie auch in Tieren möglich ist, wenn auch nur in

bestimmten Ordnungen. Beispielsweise sind polyploide höhere Wirbeltiere nicht lebensfähig (Comai, L. 2005; Strasburger, E. 2002). Es wird davon ausgegangen, dass im Laufe der Evolution nicht nur Polyploidisierungen, sondern auch eine Reduktion der Ploidie durch Entwicklung reduzierter Eizellen zu lebensfähigen Individuen stattgefunden hat. Es können innerhalb einer Art auch mehrere solcher Zyklen stattgefunden haben (Wendel, J. F. 2000). Diese sogenannte parthenogenetische Entwicklung eines Gameten kommt jedoch nur vergleichsweise selten vor. Damit nicht zu verwechseln ist das Phänomen der „Diploidisierung“. Hierbei nähern sich die Chromosomensätze Polyploider durch Selektion molekular aneinander an, um Ungleichwichte in der Genexpression oder Inkompatibilität in der meiotischen Chromosomenpaarung als Folge der Polyploidisierung zu eliminieren. Langfristig kann dies auch zu gestaltlichen Änderungen zwischen ursprünglich homologen Chromosomenpaaren führen, so dass man neben der genetischen Diploidisierung des Genoms schließlich auch von einer zytologischen sprechen kann.

Der Grund für das Auftreten von Polyploidie ist die Tatsache, dass sie sich auf unterschiedliche Art und Weise vorteilhaft für einen Organismus auswirken kann: Diese Vorteile sind unterschiedlich, je nachdem, wie sich die neu gewonnenen Gene entwickeln. Sie können ihre ursprüngliche oder eine ähnliche Funktion beibehalten, eine andere Funktion übernehmen, oder stillgelegt werden. Im ersten Fall kann durch das Vorhandensein mehrerer homologer Chromosomen eine eventuell nachteilige Genmutation leichter kompensiert werden. Es können auch die Syntheseraten bestimmter Proteine erhöht sein, da mehrere Vorlagen für die Translation vorhanden sind. Die potenziell höhere Anzahl genetischer Varianten (Allele) kann weiteres zu einer erweiterten Reaktionsfähigkeit des Organismus gegenüber Umweltfaktoren führen.

Übernimmt das Gen hingegen eine andere als die ursprüngliche Funktion, kann der Organismus in der Lage sein, neue, zusätzliche Proteine zu synthetisieren. Durch die Bildung von neuen Signalwegen ist die biochemische Flexibilität erhöht und kann eventuell zu einem Vorteil gegenüber den diploiden Vorfahren führen. Untersuchungen zeigen unterschiedliche Genexpressionsmuster in unterschiedlichen Ploidiestufen einer Art (Soltis, D. E. et al. 2004). Weiters weisen polyploide Organismen unter anderem andere Zellkerngrößen,

Zellteilungs- und Photosyntheseraten auf (Warner, D. A. et al. 1989). Der veränderte Stoffwechsel kann zu einem neuen Spektrum von Sekundärmetaboliten führen. Dieser Umstand kann sich in veränderten Reaktionen auf pathogene Organismen oder Herbivoren und in veränderten Interaktionen mit Bestäubern positiv auswirken.

Ob ein neu gebildeter polyploider Organismus letztendlich dauerhaft lebensfähig ist, hängt nicht nur von seiner Fortpflanzungsfähigkeit ab, sondern auch davon, ob er sich an neue Standorte anpassen oder sich in Gegenwart der diploiden Vorfahren durchsetzen kann. Häufig besiedeln polyploide Organismen andere Höhenlagen und Breitengrade als ihre Ausgangsformen. Hierbei erweist sich die größere Anpassungsfähigkeit der Polyploiden aufgrund der höheren Heterogenität als nützlich (Hegarty, M. J. et al. 2008; Soltis, D. E. et al. 2003; Wendel, J. F. 2000; Ramsey, J. et al. 1998).

Weiters sollte die Aneuploidie erwähnt werden. Diese ist definiert als der Umstand, dass ein Chromosomensatz entweder größer oder kleiner ist als das genaue Vielfache der Chromosomengrundzahl. Bei polyploiden Organismen ist das Auftreten von Aneuploidie 30mal häufiger als bei diploiden. Darüber hinaus tritt Aneuploidie öfter bei ungeraden Ploidiestufen auf als bei geraden, da bei deren Zellteilungen Unregelmäßigkeiten häufiger auftreten. Am häufigsten ist dabei die Zunahme oder der Verlust von einem Chromosom; je mehr die Chromosomenzahl vom „euploiden“ Chromosomensatz abweicht, umso seltener ist die Abweichung (Ramsey, J. et al. 2002).

Bei *Valeriana officinalis* agg. spielt die Polyploidie für die Einteilung und auch für die evolutionäre Geschichte der Bildung der Unterarten eine große Rolle. Aufgrund der Tatsache, dass bei *Valeriana officinalis* agg. nur eine einzige diploide „Art“ (*Valeriana „exaltata“*) in Mitteleuropa existiert, besteht die Vermutung, dass die höheren Ploidiestufen durch Autopolyploidie entstanden sind.

I.4 Pharmazeutische Bedeutung des *Valeriana officinalis* agg.



Abbildung 9: getrocknete Baldrianwurzel

Seit Jahrhunderten wird die Baldrianwurzel (Abbildung 9) als krampfstillendes Mittel und „in allen krampfartigen und konvulsivischen Krankheiten, gegen die fallende Sucht und bei hysterischen Anfällen“ verwendet (Benedum, J. et al. 2006). Früher war sie auch als Wurmmittel in Gebrauch.

Der erste, der Baldrian mit einer sedativen Wirkung in Verbindung brachte, war vermutlich der griechische Physiker und Mediziner Galen (131-201 v. Chr.). Die Anwendung als Sedativum war allerdings erst am Ende des 16. Jahrhunderts verbreitet. 1543 beschreibt beispielsweise Leonhard Fuchs in seinem „New Kreüterbuch“ vor allem die augenheilende Wirkung von Arzneibaldrian.

Im Ersten Weltkrieg wurde Baldrian zur Behandlung von Soldaten, die unter Kriegsneurose litten, verwendet (Dweck, A. C. 1997).

Heutzutage wird die Droge als Tee angeboten und ist Bestandteil in zahlreichen Teemischungen wie Magen-Darm-, Beruhigungs-, Nerven- oder Schlaftees. Weiters ist sie als eine der meistverwendeten Drogen in zahlreichen Phytopharmaka enthalten. Flüssige Präparate enthalten Baldriantinktur, Press-Saft oder seltener Baldrianfluidextrakt. Kapsel- und Dragee-Präparate enthalten meist einen Trockenextrakt. Weiters werden Baldrian-Bäder angeboten, in denen Baldrianextrakte oder das ätherische Öl enthalten sind. Trotz des durchdringenden Geruchs wird Baldrian in der Parfümindustrie eingesetzt, um moschusähnliche, holzige Gerüche zu erzielen. Baldrianextrakte werden auch als Aromastoffe in Nahrungsmitteln wie Gebäck und Eis eingesetzt, vor allem, wenn man eine Apfelgeschmacks-Komponente erreichen will (Wichtl, M. 2009).

Nicht nur in der westlichen Medizin wird Baldrian verwendet. In Indien wird die Wurzel von *Valeriana wallichii* als Zutat zu Zubereitungen gegen Schlangenbisse erwähnt. In der TCM finden sich sowohl die Wurzel des Arzneibaldrians als auch die des Indischen Baldrians zur Behandlung von Epilepsie, chronischen Rückenschmerzen, Taubheitsgefühl durch Rheuma, Hysterie, Krämpfen, Herzrasen, Brüche und Wunden, Menstruationsbeschwerden, Erkältungen oder Schluckauf (Dweck, A. C. 1997).

Die Indikation für die Anwendung von Baldrian lautet „bei Unruhezuständen und nervös bedingten Einschlafstörungen“, in Kombination mit anderen Stoffen „zur Besserung des Befindens bei nervöser Belastung bzw. zur Unterstützung der Herz-Kreislauffunktion bei nervlicher Belastung“. In Form von Bädern soll es mild sedativ und muskelentspannend wirken (Wichtl, M. 2009).

Klinische Studien bestätigen, dass sich nach Einnahme von Baldrianpräparaten die Einschlafzeit, Schlafqualität und die Befindlichkeit ohne Hangover am Folgetag verbesserten. Die Schlaf - anstoßende Wirkung setzt dabei im Allgemeinen nicht sofort, sondern erst nach einigen Tagen ein. Man ist sich mittlerweile darüber einig, dass die Wirksamkeit von Baldrian nicht auf einzelnen Komponenten, sondern vielmehr auf dem synergistischen Effekt, d.h. einem Zusammenspiel aller Inhaltsstoffe, beruht (Bent, S. et al. 2006; Andreatini, R. et al. 2002; Diaper, A. et al. 2004).

Folgende Erkenntnisse sind jedoch anzuführen: wässrige Droгенаuszüge hemmen den Transport von GABA in die Synaptosomen. Rezeptorbindungsstudien mit Valerensäuren am GABA-, am Melatonin- und geringfügig an Benzodiazepin- und Barbituratrezeptoren zeigen eine entsprechende Affinität (Trauner, G. et al. 2008; Khom, S. et al. 2007).

Die Baldrianwurzel enthält eine große Anzahl unterschiedlicher Naturstoffe: Mono- und Sesquiterpene, Iridoide, Lignane, Flavonoide, Alkaloide u.a. Ein Teil davon entsteht erst beim Trocknen durch enzymatischen Abbau aus nicht näher untersuchten Vorstufen, wie z.B. die Isovaleriansäure, die für den charakteristischen Geruch der getrockneten Droge verantwortlich gemacht wird.

Die Droge enthält 0,3 bis 2,1 % ätherisches Öl (nach Ph. Eur. mindestens 0,4 % in der Ganzdroge bzw. 0,3 % in der Schnittdroge), das je nach Herkunft recht verschieden zusammengesetzt ist, den höchsten Gehalt weist die im Herbst geerntete Wurzel auf. Das ätherische Öl besteht aus Mono- und Sesquiterpenen, bisher sind ca. 150 Komponenten identifiziert. Hauptbestandteile sind meist Bornylacetat, Myrtenyl-isovalerianat und -acetat; wichtige Sesquiterpene sind Valerianol und Valeranon.

Schwer flüchtige Sesquiterpensäuren müssen nach der Ph. Eur. zu mindestens 0,17 % in der Ganzdroge und zu 0,10 % in der Schnittdroge, berechnet als Valerensäure, nachweisbar sein. Es handelt sich um Valerensäuren (z.T. im ätherischen Öl enthalten), aber auch um Acetoxyvalerensäure und die 3,4-Epoxyvalerensäure. Die Valerensäuren galten lange als artspezifisch, sie wurden aber inzwischen auch in anderen *Valeriana*-Arten (*Valeriana angustifolia*, *Valeriana montana*) nachgewiesen (Kemper, K. J. 1999).

Darüber hinaus sind 0,1-2 % Valepotriate (**Valeriana-Epoxy-Triester**) enthalten. Es handelt sich dabei um bicyclische Monoterpene, die sehr instabil sind und durch Einwirken von Wärme, Säuren oder Basen leicht abgebaut werden, wobei Baldriinal, Homobaldriinal u.a. Produkte sowie Valerian- und Isovaleriansäure entstehen (Bos, R. et al. 1996).

Weiters sind sehr geringe Mengen an freien Aminosäuren wie Arginin, Alanin, Glutamin und GABA enthalten sowie Stärke und verschiedene Zucker, Phenolcarbonsäuren und freie Fettsäuren (Wichtl, M. 2009; Houghton, P. J. 1999).

I.5 Ziel der Diplomarbeit

Da bis heute aufgrund fehlender bzw. ungenügender Daten keine genaue taxonomische Einteilung des *Valeriana officinalis* agg. getroffen werden konnte (Titz, 1981), soll diese Diplomarbeit einen Beitrag zu einem besseren Verständnis dieser Artgruppen leisten. Im Zuge eines Projekts sollen etwa 100 Baldrian-Populationen zu je 20 Exemplaren gesammelt und herbarisiert werden. Anhand von Untersuchungen an lebenden Pflanzen und den Herbarbelegen werden Daten über die Individuen gesammelt, die letztendlich die Nähe ihrer Verwandtschaft festlegen sollen. Die Autorin nahm an einigen Sammelfahrten nach Tirol und

Vorarlberg teil, bei denen Baldrian-Populationen in eine Freilandkultur an der Universität Wien überführt wurden. Zu Beginn des Verfassens dieser Diplomarbeit im September 2009 betrug die Anzahl der gesammelten Pflanzen etwa 1100.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die gesammelten Pflanzen mittels Durchfluss-Zytometrie vermessen, um deren Ploidiestufe zu ermitteln. Darüber hinaus wurde an ausgewählten Exemplaren eine Chromosomenzählung durchgeführt, um die Messungen der Durchfluss-Zytometrie zu verifizieren.

Durch die Ermittlung der Ploidiestufen kann bei den gesammelten Pflanzen eine erste Einteilung getroffen werden. Sie legt den Grundstein für genauere Untersuchungen, wie z.B. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), über welche die genetische Diversität und Differenzierung von und zwischen den Ploidiestufen sowie Populationen dargestellt werden sollen. Diese molekularen Daten können Aufschluss über die Verwandtschaft der *Valeriana*-Sippen geben und in deren taxonomische Gliederung einfließen. Weiters können die Ergebnisse mit den morphometrischen Daten der Herbarbelege korreliert werden.

Die von Titz getroffene Einteilung (Titz, 1981) beruht auf der morphologischen Analyse von Herbarbelegen und Chromosomenzählungen von Einzelpflanzen oder sehr kleinen Populationen, deren Sammelorte inhomogen verteilt sind. Anhand der neuen Daten können nicht nur Populationen miteinander verglichen werden sondern auch die Variation der Pflanzen innerhalb einer Population ermittelt und gegebenenfalls gemittelt werden. So kann die bisher angewandte Einteilung des *Valeriana officinalis* agg. für Mitteleuropa (Titz, W. 1981) mit neuen quantitativen Daten verschiedener Herkunft überprüft und eventuell verbessert werden.

Die Arbeit an der Einteilung des pharmazeutisch bedeutsamen *Valeriana officinalis* agg. ist auch für die pharmazeutische Forschung von Interesse; nach Beenden der geplanten Messungen an den Pflanzen werden die Wurzeln von anderen Arbeitsgruppen des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien phytochemisch auf eventuelle Unterschiede in Gehalt und

Zusammensetzung diverser wirksamer Inhaltsstoffe untersucht. Dadurch könnten beispielsweise mögliche Vorteile der Kultivierung einer Unterart gegenüber einer anderen ermittelt werden.

II Material und Methoden

II.1 Pflanzenmaterial

Bei dem zu vermessenden Material handelte es sich um Exemplare des *Valeriana officinalis agg.*, die im Zeitraum von 2008 bis 2009 von ao. Univ. Prof. Dr. Johannes Saukel, Dr. Christoph Dobeš, Dipl. Biol. Valerie Klatter-Asselmeyer, Alice Fischer und der Autorin in Süddeutschland, Tirol (Nord- und Südtirol), der Steiermark und Vorarlberg gesammelt wurden (Abbildung 10). Die Sammelorte wurden dabei so gewählt, dass sie möglichst gleichmäßig verteilt sind.

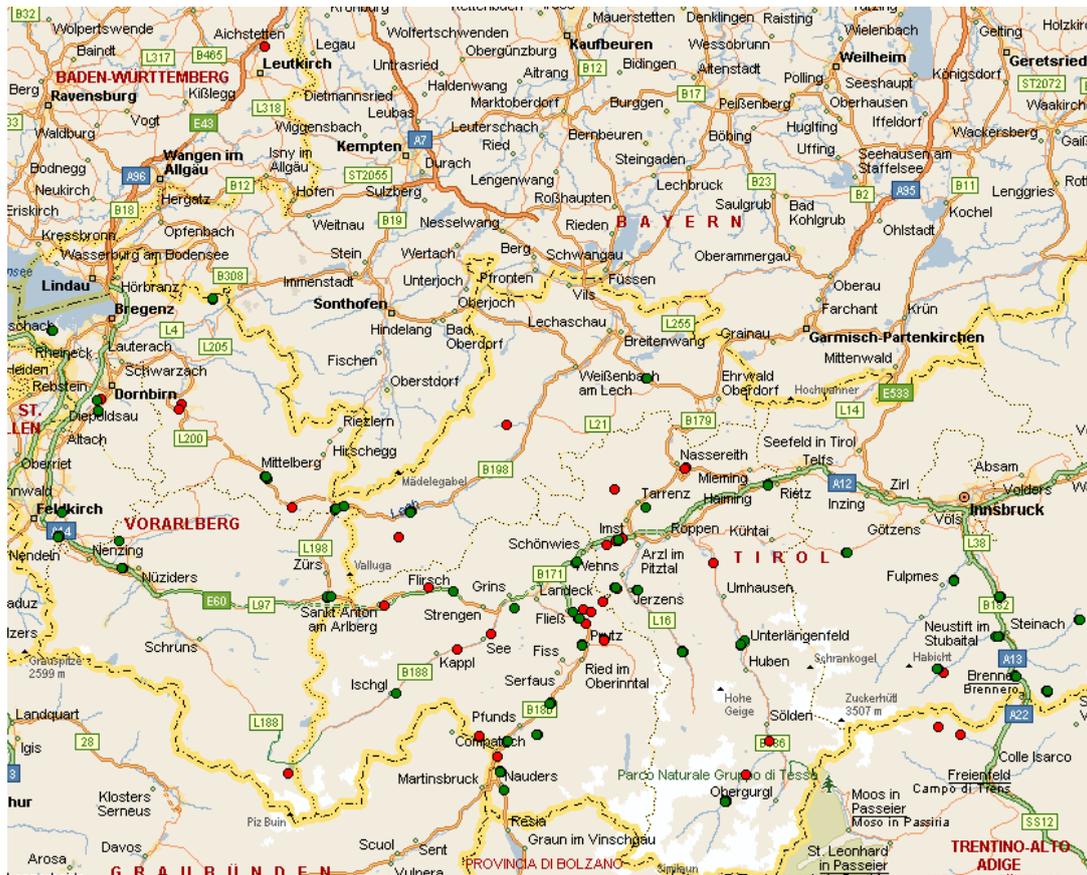


Abbildung 10: Karte, markiert mit den in Tirol und Vorarlberg gesammelten Populationen (rot) und Einzelpflanzen (grün)

Bis zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit wurden 50 Populationen und 107 Einzelpflanzen gesammelt. Weitere Pflanzen werden voraussichtlich im Sommer 2010 gesammelt werden.

Eine Population umfasst dabei 20 Pflanzen, die in einem Abstand von mindestens zwei Metern wuchsen. Dabei wurden mindestens 10 blühende Exemplare ausgewählt, um einen vollständigen Herbarbeleg zu erhalten. Bei den weiteren handelte es sich um Exemplare mit Grundblattrosette, da diese widerstandsfähiger gegen den Transport sind. Dies trifft auf alle 50 Populationen zu, mit Ausnahme von Population 1, 2 und 42, welche aus jeweils zehn Pflanzen bestehen.

Die Feldarbeit beinhaltete das Entwerfen eines skizzenhaften Lageplans des Ortes, an dem gesammelt wurde. Weiters wurde eine Vegetationskartierung nach Braun-Blanquet (1951) der Umgebung der Pflanze innerhalb von 50 x 50 cm vorgenommen; dabei werden alle in dem Quadrat befindlichen Pflanzenarten mit ihrer jeweiligen Wuchsdichte registriert. Anschließend wurden die Baldriane ausgegraben, wobei die oberirdischen Teile der generativen Pflanzen abgeschnitten und noch im Feld herbarisiert wurden. Wenn möglich, wurden Blattproben für die DNA-Extraktion genommen. Diese Blattproben müssen von gesunden und möglichst jungen Blättern stammen. Sie wurden umgehend in Silicagel eingelegt, um sie schnell und schonend zu trocknen. Die Wurzelstöcke wurden in kleinen, innen befeuchteten Plastiksäckchen aufbewahrt, in denen sie nach spätestens 3–4 Tagen nach Wien transportiert wurden. Abschließend wurden die Koordinaten jeder ausgegrabenen Pflanze mit einem GPS-Gerät (garmin etrex) lokalisiert und gespeichert.

In Wien wurden die Pflanzen von den Gärtnern des Departments für Pharmakognosie in 14 cm Plastiktöpfe in eine Mischung aus 50 % Erde, 35 % Rindenmulch und 15 % Sand gepflanzt. Zum Anwachsen wurden die Pflanzen in einer Klimakammer untergebracht, in der sie bei 20 °C und 70-80 % Luftfeuchte 12 Stunden täglich mit Tageslicht bestrahlt wurden.



Abbildung 11: Klimakammer an der Universität Wien

Sobald sich die Pflanzen erholt hatten, wurden sie in den Arzneipflanzengarten des Departments verlegt (Abbildung 12), wo sie für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.



Abbildung 12: Freilandkultur der gesammelten Baldrianpflanzen

Alle Pflanzen sind vom Zeitpunkt des Sammelns an mit einer eindeutigen Nummer gekennzeichnet. Die Plastikkärtchen in den Töpfen wurden neben den Nummern auch mit Markierungen versehen, die deutlich machen, ob und wie oft die Pflanze einer Messung mit dem Durchfluss-Zytometer, einer Chromosomenzählung oder einer anderen Messung unterzogen wurde.

In im Anhang (Tabelle 15) werden alle bis zum Zeitpunkt des Verfassens gesammelten Populationen des *Valeriana officinalis* agg. mit den Sammelorten,

den geografischen Koordinaten, Sammlern und dem Sammeldatum angeführt. Als Koordinaten werden die Werte der jeweils ersten Pflanze jeder Population angegeben.

II.2 Durchfluss-Zytometrie

Als Methode für die Ermittlung der Ploidiestufen wurde die Durchfluss-Zytometrie (Doležel, J. et al. 2007) gewählt, da nicht nur Probenaufbereitung und Messung schnell durchführbar sind, sondern auch, weil aufgrund der hohen Messgeschwindigkeit eine große Anzahl von Zellen oder Zellorganellen vermessen werden kann, was zu einer höheren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führt. Mithilfe der Durchfluss-Zytometrie können unterschiedliche Parameter verschiedener Zellen einer Population bestimmt werden, wie zum Beispiel Zellgröße, Zelloberfläche oder der DNA-Gehalt eines Zellkerns. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die relative Fluoreszenz der Zellkerne über einen quantitativ an die Adenin/Thymin-Basen bindenden Farbstoff bestimmt. Dies geschieht, indem tausende Zellkerne mit einer Frequenz von ca. 10-20 pro Sekunde durch einen Licht- bzw. Laserstrahl geleitet werden, wobei die Streuung und die emittierte Fluoreszenz des Farbstoffes gemessen wird.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war das Ermitteln der Fluoreszenzintensität der Zellkerne der gesammelten Baldrian-Pflanzen anhand der Durchfluss-Zytometrie und das Ableiten der Ploidiestufen von den ermittelten Werten. Unter der Annahme, dass die Chromosomen des Genoms annähernd gleich groß sind, kann davon ausgegangen werden, dass die DNA-Gehalte der Zellkerne unterschiedlicher Ploidiestufen auch eine entsprechend unterschiedliche Größe aufweisen, d.h. dass beispielsweise ein tetraploider Zellkern den doppelten DNA-Gehalt eines diploiden Zellkernes aufweist. Aufgrund der Größenunterschiede zwischen den Ploidieniveaus, die sich in den Messungen widerspiegeln, kann auf die Ploidiestufe geschlossen werden. Sind Messungen und Auflösung des Gerätes genau genug, kann sogar ein eventuelles Auftreten von Aneuploidie ermittelt werden. Da über die Durchfluss-Zytometrie ermittelte Ploidien und Chromosomenzahlen jedoch auf der Annahme konstanter DNA-Gehalte der Chromosomen bzw Genome im vermessenen Material basieren, werden diese - im

Gegensatz zu jenen über lichtmikroskopische Zählung ermittelten - als DNA-Ploidie oder DNA-Chromosomenzahl bezeichnet (Suda, J. et al. 2006).

Die flüssige Probe wird mit einem Fluorophor – in diesem Fall handelte es sich um den fluoreszierenden DNA-Interkalator 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) – markiert. DAPI bindet spezifisch an die Adenin-Thymin-Basenpaare der DNA. Die Messungen erfolgen daher unter der Annahme, dass die relativen Anteile der vier Basen im Genom des Untersuchungsmaterials konstant sind. Das Ploidieniveau der Proben ermittelt sich schließlich aus dem Vergleich mit den Fluoreszenzintensitäten für Individuen bekannten Ploidieniveaus. Aus methodischen und praktischen Gründen erfolgt dieser Vergleich jedoch indirekt über einen etablierten Größenstandard (siehe unten). Da mit der gewählten Technik nur ein Teil der DNA markiert wird, kann man begrifflich nur von relativer Fluoreszenz oder Fluoreszenzintensität sprechen. Der tatsächliche DNA-Gehalt der Zellkerne bleibt hingegen unbekannt.

Die markierte Probe (sample) wird als Suspension so durch eine Kapillare geleitet, dass sich zu jedem Zeitpunkt jeweils nur ein Zellkern im Messfeld befindet (Abbildung 13). Dies wird durch einen Hüllstrom (sheath) aus bidestilliertem Wasser gewährleistet, welcher den Probestrom in seinem Zentrum aufnimmt. Wichtig ist, dass das Wasser des Hüllstroms partikelfrei ist; daher wurde es bei den Messungen spätestens alle zwei Tage erneuert.

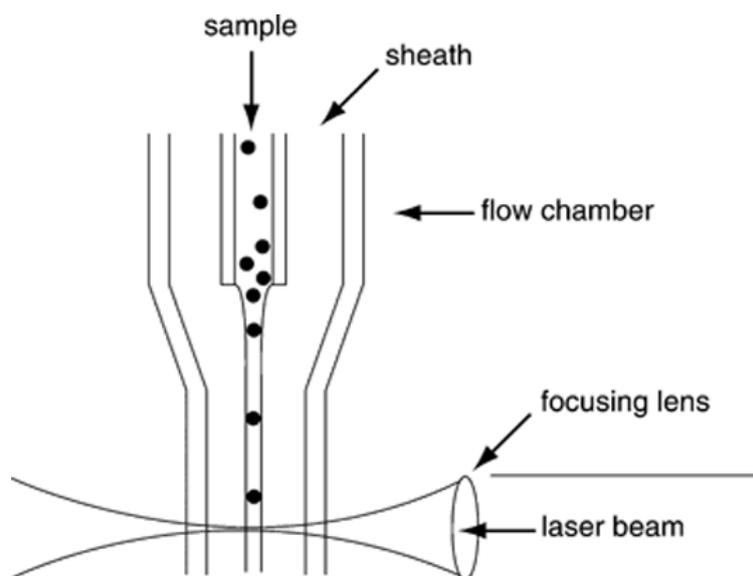


Abbildung 13: Prinzip der Durchfluss-Zytometrie

(www.currentprotocols.com/protocol/cy0101; 04.03.2010 um 15:03)

Das Messfeld der Kapillare wird von einem Laserstrahl bzw. im Fall des verwendeten Gerätes von einer Quecksilber-Dampflampe angestrahlt. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung der markierten Zellkerne wird in einem optischen System gebündelt und von einem Photoelement detektiert. Dieses System besteht aus einer Vielzahl von Filtern und Spiegeln, welche die vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Wellenlänge passieren lassen und in den Detektor leiten. Im Detektor wird die eintreffende Strahlung in Spannung umgewandelt. Da Zellkerne mit kleineren DNA-Gehalten eine geringere Menge an Fluorophoren binden können, ist die emittierte Strahlungsmenge geringer, wodurch auch die Spannung des Impulses geringer ist. Somit ist der DNA-Gehalt proportional zum Spannungsimpuls. Durch die Gerätesoftware wird nun in einem Diagramm diese Spannung als registrierte Fluoreszenzintensität auf der Abszisse gegen die Anzahl dieser Impulse (d.h. der gemessenen Kerne) auf der Ordinate aufgetragen. Dadurch entsteht ein Histogramm mit der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Probe. Je mehr Zellkerne bestimmter Fluoreszenzintensität registriert werden, umso größer wird der entstehende Peak. Je höher die Fluoreszenz, umso weiter ist das Signal auf der Koordinate nach rechts verschoben.

Da die Werte der Fluoreszenz am verwendeten Durchfluss-Zytometer im Lauf des Tages – vermutlich durch die zunehmende Erwärmung der Hg-Dampflampe – abnahmen und die absoluten Werte somit nicht zuverlässig waren, wurde bei jeder Messung ein interner Standard verwendet. Dieser muss folgende Voraussetzungen erfüllen: er muss für die Durchfluss-Zytometrie und die verwendeten Pufferlösungen geeignet sein, da der interne Standard dieselben Arbeitsschritte unter denselben Bedingungen durchläuft wie die zu vermessende Probe. Weiters muss der DNA-Gehalt des Standards ähnlich groß wie jene der zu messenden Proben sein, damit die Peaks nahe beieinander liegen und vergleichbar sind. Dabei sollten sie sich jedoch nicht überschneiden. Diese Kriterien wurden von *Pisum sativum* „Kleine Rheinländerin“ erfüllt. Darüber hinaus wird diese Pflanze neben anderen als interner Standard häufig empfohlen (Greilhuber, J. et al. 2007). Der absolute DNA-Gehalt von *Pisum sativum* ist konstant (Greilhuber, J. 2005) und beträgt 9,09 pg pro diploiden Zellkern (Doležel, J. et al 2007). Weiters ist die Pflanze leicht zu kultivieren, was ein weiterer Vorteil ist.

Folgende Puffer wurden für die Ploidiebestimmung mittels Durchfluss-Zytometrie verwendet (Otto, F. 1990):

OTTO I Puffer:

0,1 M Zitronensäure-Monohydrat 4,2 g

0,5 % (V/V) Tween 20 1 ml

mit Aqua bidestillata auf 200 ml auffüllen und durch einen 20 µm Filter filtrieren;
bei 4 °C aufbewahren.

OTTO II Puffer:

0,4 M Na₂HPO₄*12 H₂O 28,65 g

mit Aqua bidestillata auf 200 ml auffüllen und durch einen 20 µm Filter filtrieren;
bei Raumtemperatur aufbewahren.

DAPI-Stammlösung (0,1 mg/ml):

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) 10 mg

in 100 ml Aqua bidestillata auflösen und durch einen 20 µm Filter filtrieren.
Aufbewahrung bei 8 °C.

Für die Durchfluss-Zytometrie wurde ein Ploidy Analyser der Firma Partec verwendet (Abbildung 14), der speziell für die Abschätzung von Ploidiestufen entwickelt wurde.



Abbildung 14: Partec Ploidy Analyser

Am Gerät wurden folgende Parameter für die Messungen eingestellt:

Histogram Resolution	512
Sample Prerun Time	2,00 sec
Clean Time	5,00 sec
Display	1 Parameter
Peak Analysis	On
Auto File Storage	On
Data Storage	HIST (histogram)
Transfer Type	FCS
all other settings	Off
Software Version	CA3 1.315 9/1998
Gain	357-405
Rate	max. 20/sec
Lower Level	40

Die Werte von Gain, also der Verstärkung des Signals, wurden etwa jeden halben Tag verändert, um die im Laufe des Tages auftretende Abschwächung des Signals zu kompensieren. Hierfür wurde der Gain so verstellt, dass der Peak des internen Standards bei einer Fluoreszenz von etwa 200 (dimensionsloser Wert) erschien. Da die Flussrate durch die Kapillare (RATE) für zuverlässige Ergebnisse bei unter 20 Messungen pro Sekunde liegen sollte, wurde je nachdem die Flussgeschwindigkeit (SPEED) erhöht oder gesenkt.

Die Blatt-Proben wurden jeden halben Tag gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung in OTTO I gekühlt aufbewahrt.

Für die Messung wurden jeweils ein Blattstück von *Valeriana* und ein Blattstück von *Pisum* von etwa 0,25 cm² in einem Petrischälchen in 0,5 ml OTTO I mit einer neuen Rasierklinge kleingehackt. So werden die Zellen zerschnitten und die Zellkerne liegen in der Suspension frei vor. Hier ist es wichtig, die Zellen nur zu zerschneiden und nicht durch Scheren Druck auszuüben, unter dem die Zellkerne zerstört würden. Anschließend wurde die Probe mit einer Pipette durch einen Partec CellTrics® Filter mit einem Porendurchmesser von 30 µm in ein Röhrchen (Fa. Sarstedt; 3,5 ml, Durchmesser 12 mm) pipettiert. Der Durchmesser der Filterporen erlaubt gerade eine Passage der Zellkerne, alle größeren Bestandteile

werden abgetrennt. Zu diesem Filtrat wurde 1 ml einer Lösung, die zu 24 Teilen aus OTTO II Puffer und zu 1 Teil aus DAPI-Stammlösung bestand, hinzugefügt. Diese Lösung wurde jeden Tag frisch zubereitet und über den Tag in einer Braunglasflasche aufbewahrt, da DAPI photolabil ist. Nach kurzem Umschütteln und einer Wartezeit von etwa einer Minute, in der sich die DAPI-Moleküle in die DNA einlagern konnten, wurde gemessen. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurden bei jeder Messung mindestens 1.500 Kerne registriert, meistens jedoch 2.000 bis 3.000. Bei jeder Messung wurden der Gain und das von der Gerätesoftware ermittelte Verhältnis zwischen dem Proben-Peak und dem Standard-Peak notiert, um bereits einen ersten Überblick über die Verteilung der Ploidiestufen zu erhalten.

Insgesamt konnten 685 Pflanzen vermessen werden. 28 der vermessenen Pflanzen wurden drei Mal vermessen, sowie 3 andere Pflanzen 10 Mal, um den Messfehler zu bestimmen.

II.3 Chromosomenzählung

Für die Chromosomenzählung wurden die Wurzelspitzen der im Garten kultivierten Pflanzen verwendet. Bei den Pflanzen handelte es sich um die 27 Exemplare, die mit der Durchfluss-Zytometrie 3 Mal vermessen wurden. Für die Wurzelernte wurde die Pflanze aus dem Topf gehoben und die Wurzelspitzen, die am Ballen zu sehen und mindestens 1,5 mm dick waren, abgeschnitten, wobei das Stück zumindest 1 cm lang sein sollte. Pro Pflanze mussten mindestens fünf geeignete Wurzelspitzen zu sehen sein. Es wurden möglichst viele, d. h. bis zu zehn Spitzen geerntet. Um ein Austrocknen der Stücke zu verhindern, wurden sie bis zur Weiterverarbeitung in destilliertem Wasser eingelegt. Anschließend wurden die Wurzeln für zwei Stunden bei Raumtemperatur, dann zwei weitere Stunden bei 8 °C in 0,002 M 8-Hydroxychinolin-Lösung eingelegt. Bei 8-Hydroxy-Chinolin handelt es sich um ein Mitosegift, das die Ausbildung des Spindelapparates verhindert. Dadurch wurden die Zellzyklen in der Prometaphase angehalten, sodass die Chromosomen in ihrem kondensierten Zustand blieben, die Zellen sich jedoch nicht teilten. So enthielten mehr Zellkerne zählbare Chromosomen.

Nachdem die Wurzeln einmal mit destilliertem Wasser gewaschen wurden, wurden sie in einer Mischung aus Eisessig und Ethanol im Verhältnis 1:3 in Rollrandgläschen mit Schnappdeckel gegeben. In dieser Lösung wurden die Wurzeln abgetötet und gleichzeitig konserviert. Die Gläschen wurden zusätzlich noch mit Parafilm verschlossen. So wurden die Gläschen 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden sie tiefgekühlt, um sie bis zur Präparation zu konservieren.

Für die Präparation wurden die Wurzelspitzen erst für 10 min in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur für 30 min in 5 N Salzsäure eingelegt. Die Salzsäure bewirkt ein Erweichen der Zellwände und somit der Wurzel, was die Präparation erleichtert. Dann wurden die Wurzeln abermals mit destilliertem Wasser gewaschen und darin bis zur Präparation eingelegt, um ein Austrocknen zu verhindern. In dieser Form sollten die Wurzelspitzen nicht länger als einen Tag aufbewahrt werden, da sie im Wasser zusätzlich erweichen.

Nun wurde jeweils eine Wurzelspitze aus einem Gläschen genommen und auf einen Objektträger mit einem Tropfen Essigsäure (45 %) gelegt. Mit einer Insektennadel der Größe 000 wurde nun das Meristem der Wurzelspitze herausgearbeitet.

Das Meristem ist das teilungsfähige Gewebe der Wurzelspitze, welches sich unter der Kalyptra, der Wurzelhaube, und der Rhizodermis, der Wurzelhaut, befindet (Abbildung 15 links). Es enthält aufgrund der hohen Teilungsaktivität zahlreiche Stadien in der Pro- bis Metaphase, in der die Chromosomen für die folgende Zellteilung kondensieren. In diesem Zustand sind die Chromosomen gut sichtbar und auch zählbar.

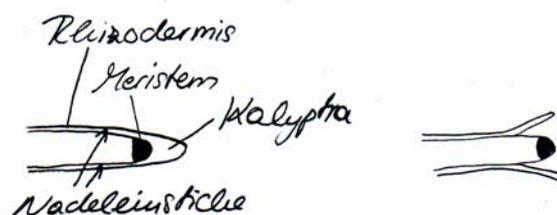


Abbildung 15: Wurzelpräparation

Das Meristem wurde herausgearbeitet, indem mit der Präpariernadel vor der Spitze jeweils am linken und am rechten Rand der Wurzel eingestochen wurde,

um anschließend die Rhizodermis bzw. die Wurzelrinde entlang der Wurzel abzutrennen (Abbildung 15 rechts).

Mit einem Skalpell wurde das Meristem abgeschnitten und auf einem weiteren Objektträger in zwei Tropfen Essigsäure (45 %) übertragen. Es wurde ein Deckglas darübergelegt und vorsichtig erst mit der Spitze, dann mit dem stumpfen Ende einer Präpariernadel auf das Deckglas geklopft, damit alle Zellen in einer Ebene vorliegen. Dabei ist es wichtig, Scherkräfte zu vermeiden und völlig senkrecht zu klopfen.

Um die überschüssige Essigsäure aufzusaugen, wurde der Objektträger zwischen die Seiten eines Filterpapierblocks gelegt und mit dem Handrücken darübergerollt. So kann ein eventuelles Verrücken des Deckglases vermieden werden.

Anschließend wurde der Objektträger für etwa 5 min in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, wodurch die Zellen am Objektträger festfrieren und fixiert werden. So ist es möglich, das Deckglas mit einer Rasierklinge abzusprengen, um die Zellen der Färbung zugänglich zu machen.

Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet waren, wurden die Chromosomen mit Giemsa-Stammlösung (Roth) gefärbt. Giemsa besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur-A-Eosinat, Azur-B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid in Methanol mit Glycerin als Stabilisator. Bei saurem pH – dieser ist durch die Essigsäure gegeben – färbt Giemsa die negativ geladene DNA blau.

Die zum Färben verwendete Lösung besteht aus der Giemsa-Stammlösung und aus destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10. Sie neigt in dieser Verdünnung zum Auskristallisieren und sollte daher erst unmittelbar vor der Färbung hergestellt werden. Diese Lösung wurde mit einer Pasteurpipette auf die Stellen des Objektträgers getropft, auf denen Zellbestandteile zu sehen waren, und 4 min lang einwirken gelassen. Anschließend wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und mit Druckluft getrocknet.

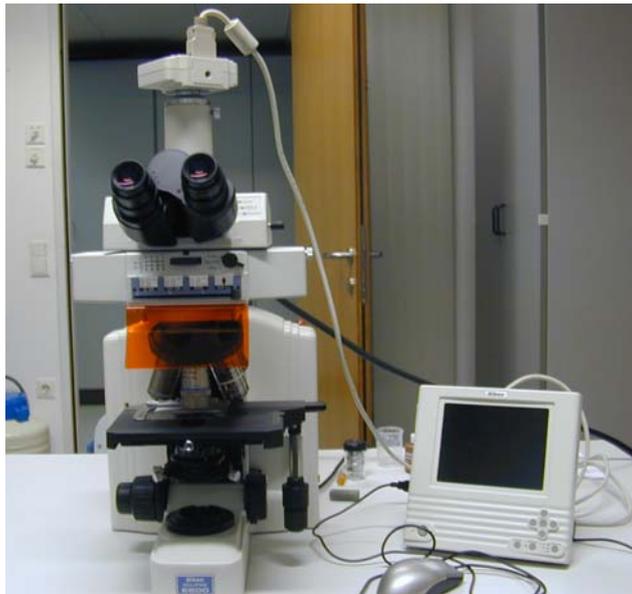


Abbildung 16: Nikon ECLIPSE E600

Die Chromosomenzählung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE E600 (Abbildung 16). Dessen Kreuztisch-Koordinaten wurden auch für die Wiederauffinden der Zellkerne verwendet. Das Okular besitzt eine zehnfache Vergrößerung. In der vierzigfachen Vergrößerung wurde nach Zellkernen gesucht, in denen die Chromosomen gut sichtbar und voneinander getrennt vorlagen. Für jede Pflanze wurden mindestens fünf eindeutig zählbare Stadien gesucht. Aus jedem Präparat, das für eine Fotografie verwendet wurde, wurde ein Dauerpräparat angefertigt. Dafür wurde ein Tropfen Euparal (Roth) auf den Objektträger getropft und mit einem Deckglas bedeckt. Die geeigneten Kerne wurden in der hundertfachen Vergrößerung in Immersionsöl mit einer Nikon Digitalkamera DS-5M fotografiert. Zusätzlich wurde für jedes fotografierte Stadium eine schematische Zeichnung der Lage der Chromosomen angefertigt und die Chromosomen gezählt.

II.4 Statistik

Die Ergebnisse der Durchfluss-Zytometrie wurden mittels deskriptiver Statistik bearbeitet. Mit der Software FloMax® wurden Mittelwert, Anzahl der registrierten Partikel (counts) und der Variationskoeffizient der Peaks von *Valeriana* und *Pisum* bestimmt. Aus den Mittelwerten wurden die

Verhältniszahlen (Indices) der Peaks von *Valeriana* und *Pisum* errechnet, wobei jeweils der Mean-X-Wert von *Valeriana* durch den Mean-x-Wert von *Pisum* dividiert wurde (Probe/Standard; Doležel, J. et al. 2007). So sind die einzelnen Messungen vergleichbar. Innerhalb der Populationen wurden für die Indices der Einzelindividuen, die mit DNA-Ploidiestufen korreliert werden konnten, das arithmetische Mittel, die Standardabweichung sowie der Variationskoeffizient errechnet. Für die Berechnung des Variationskoeffizienten (CV) wurde die Standardabweichung durch den jeweiligen Mittelwert dividiert. Der CV% wurde durch Multiplikation des CV mit 100 ermittelt. Innerhalb jeder Population wurden die 95%-Konfidenzintervalle errechnet.

Für die Wiederholungsmessungen wurden ebenfalls das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient errechnet. Um die Streuungen der dreifach wiederholten Messungen zu ermitteln, wurden zusätzlich die 95%-Konfidenzintervalle errechnet. Weiters wurde für die zehnfach wiederholten Messungen über die 5%/95%-Perzentile die absolute Variation der Messwerte dargestellt. Diese statistischen Werte dienen der Beurteilung des Messfehlers. Dadurch war es möglich abzuschätzen, mit welcher Genauigkeit die DNA-Ploidie bzw. DNA-Chromosomenzahl mit der gewählten Methode ermittelt werden kann (z.B. ob diese für die Ermittlung von akzessorischen oder fehlenden Chromosomen genau genug ist).

III Ergebnisse

III.1 Durchfluss-Zytometrie und Statistik

III.1.1 Einzelmessungen

Alle Exemplare, bei denen eine Messung möglich war, wurden am Durchfluss-Zytometer einmal vermessen. Im Folgenden werden drei Messungen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität angeführt (Abbildung 17, Abbildung 18 und Abbildung 19), die mit der Software FloMax® analysiert wurden. Als „RN1“ wird stets der Peak von *Valeriana*, als „RN2“ der Peak des Standards *Pisum* bezeichnet. Bei *Pisum* und manchmal auch bei *Valeriana* ist bei der doppelten relativen Fluoreszenz der Peaks jeweils ein weiterer kleinerer Peak zu sehen, bei dem es sich um die Zellkerne handelt, die sich in der G₂-Phase des Zellzyklus befinden. In dieser Phase steht die Zelle unmittelbar vor der Zellteilung und der DNA-Gehalt ist daher doppelt vorhanden.

Die Unterscheidung der Ploidiestufen könnte unter der Annahme erfolgen, dass z.B. ein tetraploider Baldrian, der doppelt so viele Chromosomen aufweist wie der diploide, die doppelte relative Fluoreszenz aufweist. So müssten die Peaks diploider, tetraploider und der oktaploider Baldriane beispielsweise jeweils bei der relativen Fluoreszenz von etwa 60, 120 und 240 zu liegen kommen. Dies ist jedoch nur eine theoretische Annahme, die eine strikt lineare Messcharakteristik des Zytometers und identische DNA-Gehalte der an den verschiedenen Polyploiden beteiligten Chromosomensätze voraussetzt. Da eine solche Annahme kritisch bzw. unzulässig ist, müssen die Chromosomenzahlen von Individuen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität lichtmikroskopisch bestimmt sowie schließlich Fluoreszenz und Chromosomenzahl miteinander korreliert werden.

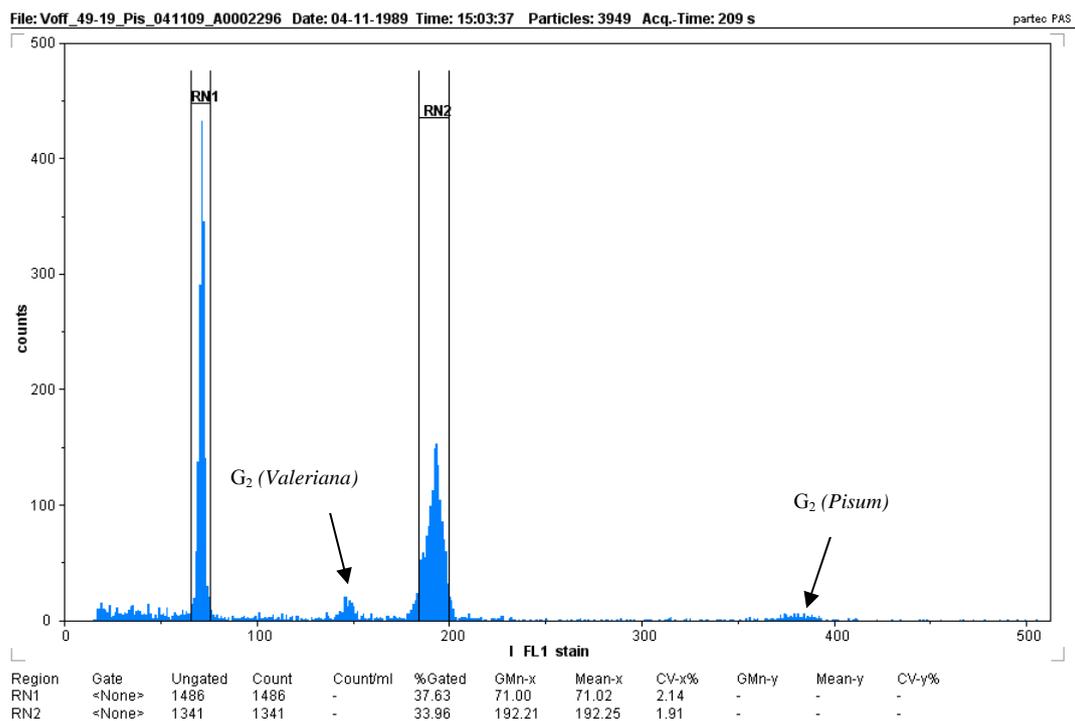


Abbildung 17: durchfluss-zytometrische Messung eines diploiden Baldrians

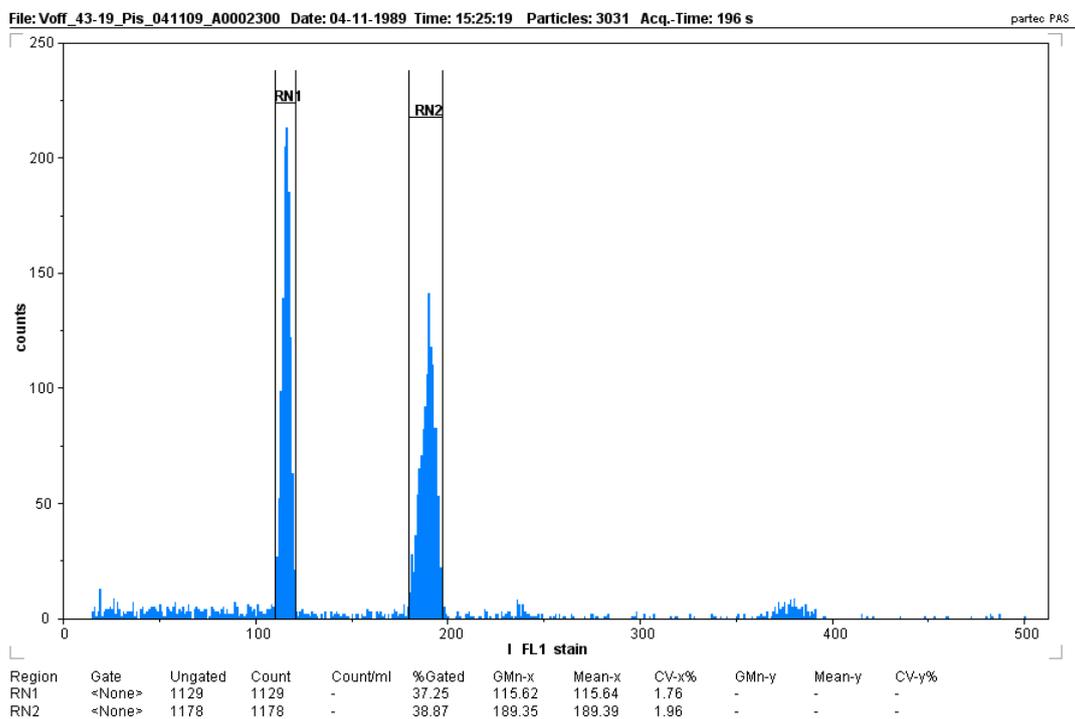


Abbildung 18: durchfluss-zytometrische Messung eines tetraploiden Baldrians

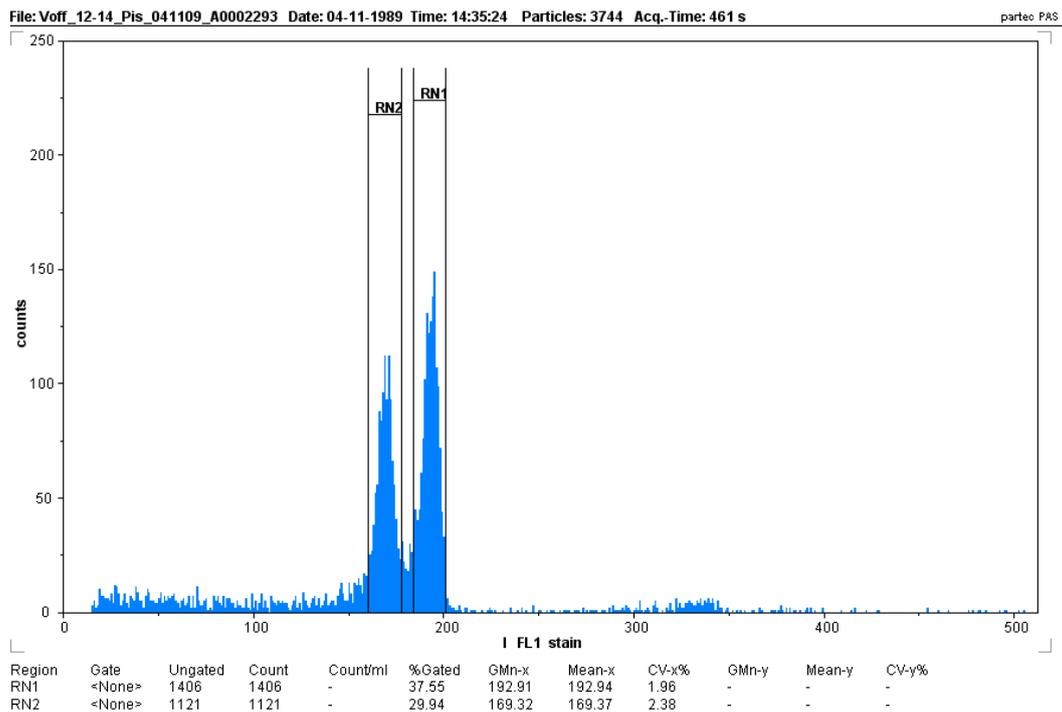


Abbildung 19: durchfluss-zytometrische Messung eines oktaploiden Baldrians

Für die weitere Analyse der Daten wurden die Mean-X-Werte von *Valeriana* und *Pisum* verwendet und aus diesen die jeweiligen Indices errechnet.

Die ermittelten Indices der Einzelpflanzen sind in Tabelle 16 und die ermittelten Indices der einzelnen Pflanzen aus Populationsaufsammlungen in Tabelle 17 dem Anhang beigefügt.

In Abbildung 20 werden die Häufigkeiten der Indices der Individuen aus den Populationsaufsammlungen dargestellt. Sie zeigt grafisch die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenz-Indices.

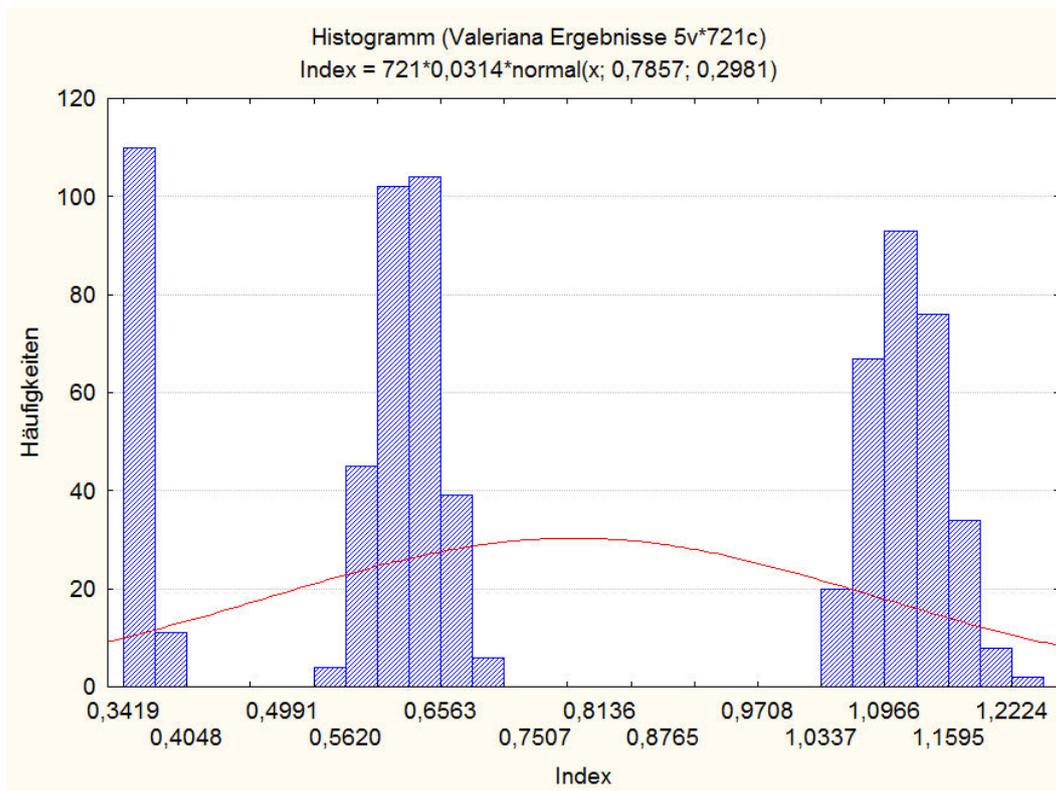


Abbildung 20: Häufigkeiten der Indices: die Häufungen bei den Indices um 0,35, 0,77 und 1,15 lassen bereits drei deutlich voneinander getrennte zytologische Gruppen erkennen

Da bei den durchfluss-zytometrischen Messungen der Gain verstellt wurde, war es nötig, zu überprüfen, ob sich die Änderung dieses Parameters auf die Messergebnisse auswirkt. Daher wurde mit der Software Statistica® eine Maßkorrelation nach Pearson durchgeführt, bei der die Mean-X-Werte der Proben dem jeweiligen Gain gegenübergestellt wurden. Das Ergebnis für den Korrelationskoeffizient betrug $R = 0,0703$. Weiters können Regressionsdiagramme zwischen Mean-X und Gain erstellt werden, wie in Abbildung 21 beispielhaft angeführt.

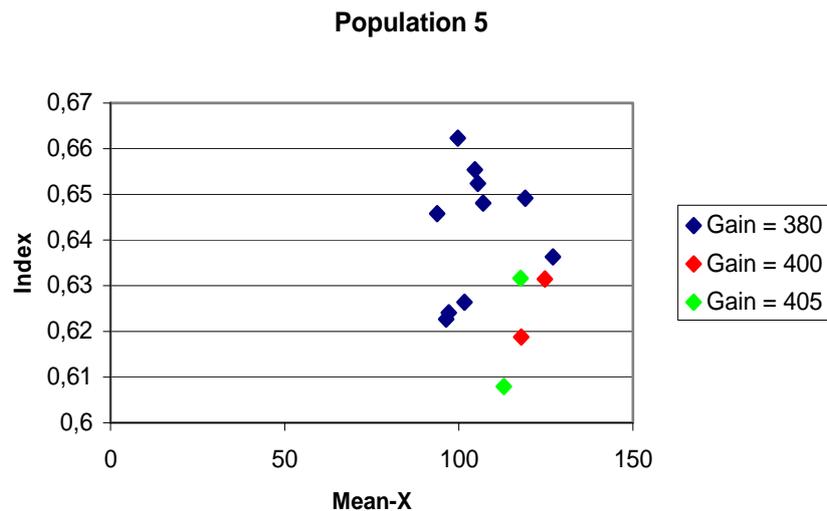


Abbildung 21: im Regressionsdiagramm zwischen Index und Mean-X ist kein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern ersichtlich

Diese Ergebnisse bestätigen, dass das Verstellen des Gain sich nicht auf die Messergebnisse auswirkte. Daher können alle Indices direkt miteinander verglichen werden.

Für die Indices der Individuen einer Population und Größenklasse wurden die Mittelwerte errechnet, welche mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft wurden. Dieser ergab, dass alle Indices der Populationen normalverteilt sind. Weiters wurden Standardabweichung und Variationskoeffizient errechnet. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 1, Tabelle 2 und Tabelle 3 angeführt. In Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24 werden die Häufigkeitsverteilungen der jeweiligen DNA-Ploidiestufe verdeutlicht.

Tabelle 1: statistische Verarbeitung der durchfluss-zytometrischen Ergebnisse der DNA-diploiden Populationspflanzen

Pop.	N _{FCM}	Mw. der Indices	Stabw.	CV %	DNA-Ploidiestufe
3	15	0,3544	0,0034	0,9495	2x
6 (gemischt)	2	0,3549	0,0037	1,0411	2x
8	6	0,3634	0,0038	1,0320	2x
14 (gemischt)	10	0,3760	0,0055	1,4637	2x
29	14	0,3550	0,0078	2,2080	2x
34 (gemischt)	3	0,3585	0,0176	4,8966	2x

42 (gemischt)	4	0,3617	0,0018	0,4969	2x
46	19	0,3522	0,0049	1,3992	2x
49	20	0,3581	0,0073	2,0356	2x
50	18	0,3583	0,0031	0,8746	2x

Mittelwert der Mw. = 0,35925

Range der Mw. = 0,3522 – 0,3760

Standardfehler der Mw. = 0,00681

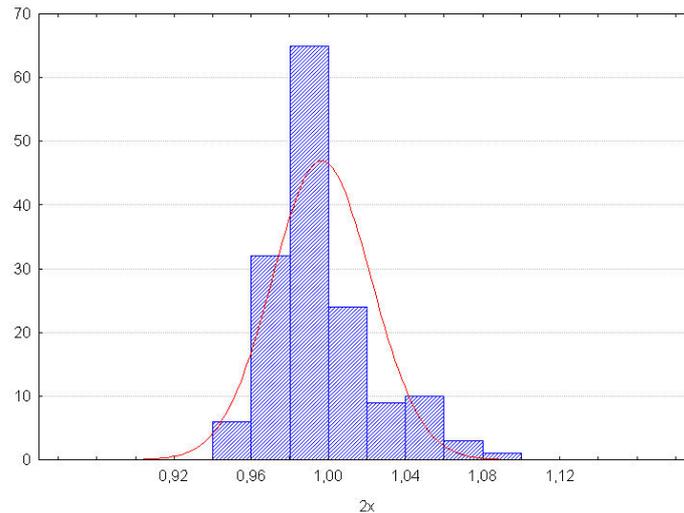


Abbildung 22: Die Häufigkeitsverteilung der DNA-diploiden Baldrian-Pflanzen

Tabelle 2: statistische Verarbeitung der durchfluss-zytometrischen Ergebnisse der DNA-tetraploiden Populationspflanzen

Pop.	N _{FCM}	Mw. der Indices	Stabw.	CV %	DNA-Ploidiestufe
4	16	0,6177	0,0198	3,2037	4x
5	15	0,6364	0,0153	2,4089	4x
6 (gemischt)	15	0,6297	0,0268	4,2509	4x
7	11	0,6457	0,0136	2,1027	4x
9	9	0,6420	0,0207	3,2176	4x
10	14	0,6496	0,0162	2,4996	4x
11	15	0,6543	0,0244	3,7366	4x
13	16	0,6659	0,0233	3,4972	4x
16	13	0,6050	0,0270	4,4549	4x
17	15	0,6279	0,0371	5,9099	4x
21	19	0,6229	0,0143	2,2937	4x

Pop.	N _{FCM}	Mw. der Indices	Stabw.	CV %	DNA-Ploidiestufe
22 (gemischt)	2	0,6022	0,0497	8,2506	4x
23	16	0,6328	0,0253	4,0048	4x
24	13	0,6248	0,0234	3,7518	4x
25	17	0,6237	0,0133	2,1388	4x
31	13	0,5953	0,0230	3,8647	4x
41	16	0,5886	0,0233	3,9519	4x
42 (gemischt)	3	0,6242	0,0229	3,6696	4x
43	16	0,5974	0,0135	2,2571	4x
44	17	0,6125	0,0226	3,6977	4x
45	9	0,5968	0,0151	2,5252	4x

Mittelwert der Mw. = 0,6236

Range der Mw. = 0,5886 – 0,6659

Standardfehler der Mw. = 0,02113

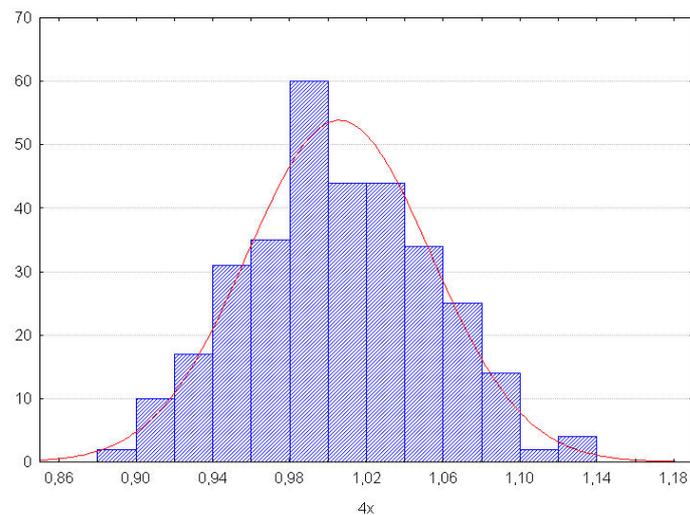


Abbildung 23: Die Häufigkeitsverteilung der DNA-tetraploiden Baldrian-Pflanzen

Tabelle 3: statistische Verarbeitung der durchfluss-zytometrischen Ergebnisse der DNA-oktoploiden Populationspflanzen

Pop.	N _{FCM}	Mw. der Indices	Stabw.	CV %	DNA-Ploidiestufe
1	8	1,0886	0,0164	1,5043	8x
2	4	1,0655	0,0092	0,8615	8x
12	16	1,1607	0,0261	2,2461	8x

Pop.	N _{FCM}	Mw. der Indices	Stabw.	CV %	DNA-Ploidiestufe
14 (gemischt)	10	1,1506	0,0300	2,6100	8x
15	19	1,1418	0,0249	2,1776	8x
18	11	1,0813	0,0197	1,8227	8x
19	9	1,1045	0,0450	4,0781	8x
20	16	1,1178	0,0443	3,9661	8x
22 (gemischt)	15	1,1276	0,0434	3,8915	8x
26	17	1,1550	0,0299	2,5881	8x
27	13	1,1336	0,0308	2,7140	8x
28	10	1,1003	0,0332	3,0208	8x
30	11	1,1114	0,0339	3,0486	8x
32	12	1,1033	0,0253	2,2967	8x
33	7	1,1169	0,0317	2,8345	8x
34 (gemischt)	7	1,1217	0,0268	2,3881	8x
35	12	1,0887	0,0254	2,3285	8x
36	17	1,1460	0,0268	2,3401	8x
37	15	1,0965	0,0225	2,0489	8x
38	15	1,1251	0,0356	3,1659	8x
39	11	1,1142	0,0263	2,3633	8x
40	9	1,0909	0,0279	2,5582	8x
47	13	1,1142	0,0280	2,5172	8x
48	11	1,0849	0,0147	1,3537	8x

Mittelwert der Mw. = 1,1142125

Range der Mw. = 1,0655 – 1,1607

Standardfehler der Mw. = 0,02516

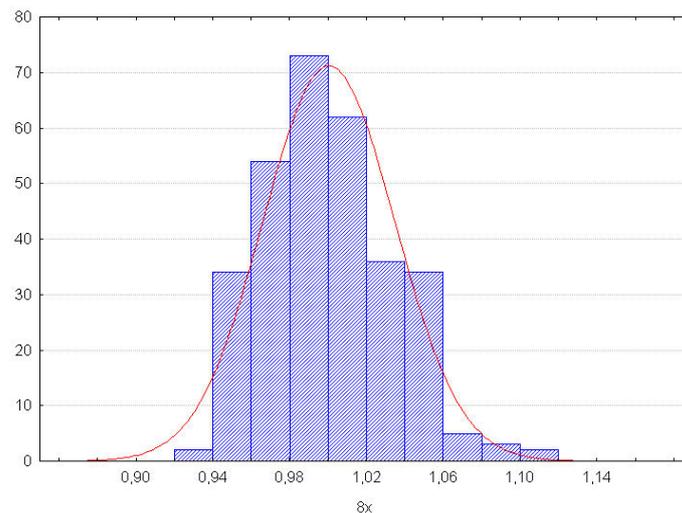


Abbildung 24: Die Häufigkeitsverteilung der DNA-oktoploiden Baldrian-Pflanzen

In Tabelle 4 werden die Ergebnisse der Durchfluss-Zytometrie statistisch zusammengefasst.

Tabelle 4: zusammenfassende Statistik zu den durchfluss-zytometrisch vermessenen Baldrian-Pflanzen der Populationen; auffällig ist, dass der CV% bei den tetraploiden Pflanzen am größten ist

DNA-Ploidie	2x	4x	8x
Anzahl der Populationen	10	21	24
Anzahl der Indices	111	280	288
Mw. der Indices	0,3583	0,6249	1,1187
Range der Indices	0,3419 – 0,3899	0,5500 – 0,7080	1,0471 – 1,2538
5%/95% - Percentil der Indices	0,3472-0,3756	0,5749 – 0,6748	1,0643 – 1,1800
Stabw. der Indices	0,0085153	0,02994963	0,03784169
CV% der Indices	2,37679346	4,79283711	3,3825495
Anzahl der chromosomal überprüften Exemplare	6	11	10

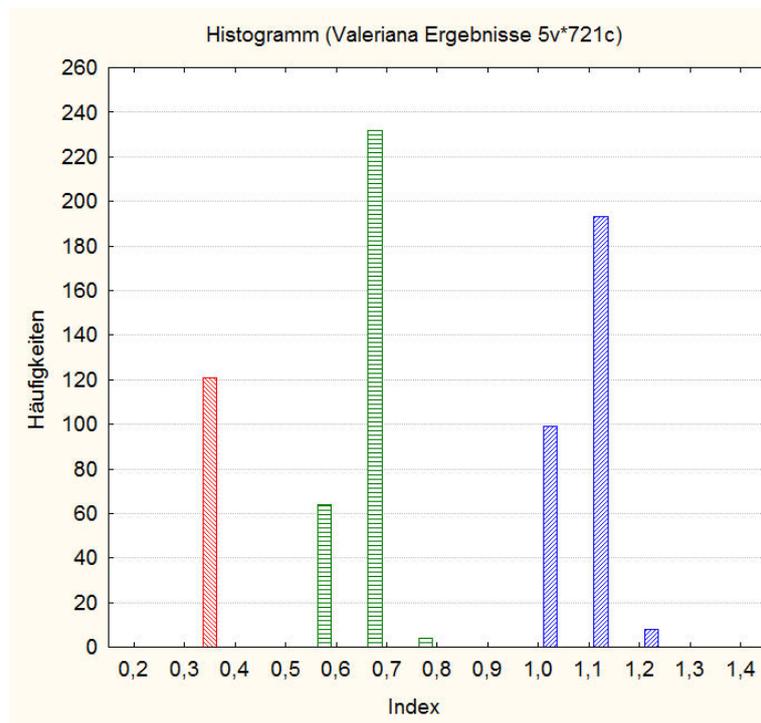


Abbildung 25: Die Verteilung der Häufigkeiten der DNA-diploiden (rot), der DNA-tetraploiden (grün) und der DNA-oktuploiden (blau) Indices zeigt, dass die Streuung der DNA-diploiden Baldriane sehr gering ist. Die Streuungen der DNA-tetraploiden und der DNA-oktuploiden Baldriane sind hingegen größer.

III.1.2 Wiederholungsmessungen

Um eine größere Genauigkeit der Messungen zu erreichen und den Messfehler des Gerätes zu ermitteln, wurden an einigen Pflanzen Wiederholungsmessungen durchgeführt, welche auch für die Chromosomenzählung gewählt wurden.

III.1.2.a Dreifache Messwiederholung

27 ausgewählte Pflanzen wurden zwei weitere Male am Durchfluss-Zytometer vermessen. Es wurde für die Wiederholungsmessungen an jedem Individuum das arithmetische Mittel, Standardabweichung und CV % ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 angeführt.

Tabelle 5: Ergebnisse der dreifachen Messwiederholungen der DNA-diploiden Pflanzen

Pflanze Nr.	Mw.	Stabw.	CV %
14/31	0,3690	0,0118	3,1983
34/4	0,3514	0,0026	0,7522
34/15	0,3519	0,0109	3,1048
42/11	0,3583	0,0034	0,9379
46/16	0,3533	0,0047	1,3334
50/9	0,3537	0,0067	1,8940

Mittelwert der Stabw. = 0,0067

Range der Stabw. = 0,0026 – 0,0118

Tabelle 6: Ergebnisse der dreifachen Messwiederholungen der DNA-tetraploiden Pflanzen

Pflanze Nr.	Mw.	Stabw.	CV %
13/14	0,6687	0,0160	2,3892
17/17	0,6974	0,0064	0,9162
17/19	0,5973	0,0034	0,5733
22/19	0,5678	0,0099	1,7466
22/20	0,6400	0,0046	0,7216
25/3	0,6184	0,0126	2,0297
25/11	0,6392	0,0013	0,2051
42/1	0,6082	0,0039	0,6333
43/14	0,5927	0,0027	0,4476
43/17	0,6335	0,0115	1,8135
43/20	0,5945	0,0120	2,0200

Mittelwert der Stabw. = 0,0077

Range der Stabw. = 0,0027 – 0,0160

Tabelle 7: Ergebnisse der dreifachen Messwiederholungen der DNA-oktoploiden Pflanzen

Pflanze Nr.	Mw.	Stabw.	CV %
12/18	1,1393	0,0068	0,6002
14/6	1,1596	0,0403	3,4752
18/2	1,0612	0,0125	1,1755
22/17	1,1004	0,0234	2,1240
22/18	1,1292	0,0047	0,4142
34/3	1,1346	0,0020	0,1806
34/12	1,1442	0,0235	2,0570
34/13	1,1098	0,0009	0,0846

Pflanze Nr.	Mw.	Stabw.	CV %
36/20	1,1461	0,0389	3,3920
38/2	1,1175	-	-

Mittelwert der Stabw. = 0,0170

Range der Stabw. = 0,0009 – 0,0389

In Abbildung 26 wurden die Häufigkeiten der einfach gemessenen Baldrian-Pflanzen und die Häufigkeiten der dreifachen Messwiederholungen aufgetragen, um die Streuung innerhalb der Wiederholung mit der Streuung innerhalb aller Messungen zu vergleichen.

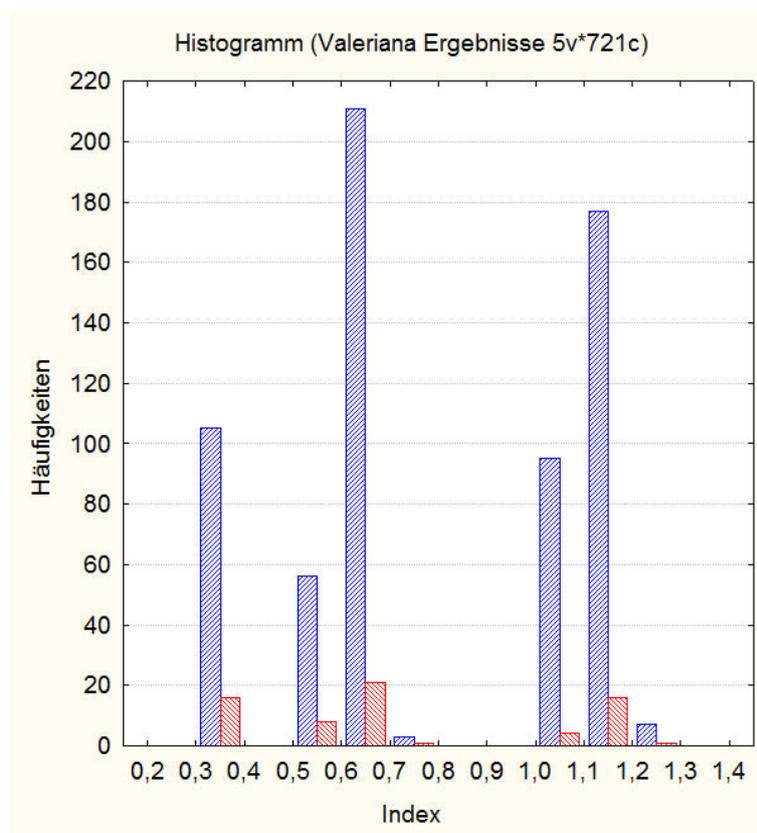


Abbildung 26: Die blauen Balken zeigen die Häufigkeiten der einfach gemessenen Baldrian-Pflanzen, die roten Balken zeigen die Häufigkeiten der Wiederholungsmessungen.

Anhand der durchgeführten Messwiederholungen kann die Streuung der Wiederholungsmessungen mit der Streuung innerhalb der jeweiligen Population verglichen werden. So wird ersichtlich, ob die beobachtete Schwankung durch das Gerät verursacht wurde oder ob es sich um eine reale Streuung der Werte handelt. In Tabelle 8, Tabelle 9 und Tabelle 10 werden die CV% und die 95%-

Konfidenzintervalle der Indices der Wiederholungen und der zugehörigen Population einander gegenübergestellt, um die Streuungen direkt zu vergleichen.

Tabelle 8: Gegenüberstellung der CV% und der 95%-Konfidenzintervalle (Konf.int.) der Indices der diploiden Wiederholungsmessungen und der jeweiligen Populationen

Pflanze	CV% _{oWh}	CV% _{oPop}	95%-Konf.int. _{Wh}	95%-Konf.int. _{Pop}
14/31	3,1983	1,4637	0,0293	0,0039
34/4	0,7522	4,8966	0,0237	0,0436
34/15	3,1048	4,8966	0,0981	0,0436
42/11	0,9379	0,4969	0,0083	0,0029
46/16	1,3334	1,3992	0,0117	0,0024
50/9	1,8940	0,8746	0,0166	0,0016

Tabelle 9: Gegenüberstellung der CV% und der 95%-Konfidenzintervalle (Konf.int.) der Indices der tetraploiden Wiederholungsmessungen und der jeweiligen Populationen

Pflanze	CV% _{oWh}	CV% _{oPop}	95%-Konf.int. _{Wh}	95%-Konf.int. _{Pop}
13/14	2,3892	3,4972	0,0397	0,0124
17/17	0,9162	5,9099	0,0159	0,0206
17/19	0,5733	5,9099	0,0085	0,0206
22/19	1,7466	3,8915	0,0246	0,4464
22/20	0,7216	3,8915	0,0115	0,4464
25/3	2,0297	2,1388	0,0312	0,0069
25/11	0,2051	2,1388	0,0036	0,0069
42/1	0,6333	3,6696	0,0096	0,0569
43/14	0,4476	2,2571	0,0066	0,0072
43/17	1,8135	2,2571	0,0285	0,0072
43/20	2,0200	2,2571	0,0298	0,0072

Tabelle 10: Gegenüberstellung der CV% und der 95%-Konfidenzintervalle (Konf.int.) der Indices der oktaploiden Wiederholungsmessungen und der jeweiligen Populationen

Pflanze	CV% _{oWh}	CV% _{oPop}	95%-Konf.int. _{Wh}	95%-Konf.int. _{Pop}
12/18	0,6002	2,2461	0,0170	0,0139
14/6	3,4752	2,6100	0,1000	0,0215
18/2	1,1755	1,8227	0,0310	0,0132
22/17	2,1240	3,8915	0,2099	0,0243
22/18	0,4142	3,8915	0,0420	0,0243
34/3	0,1806	2,3881	0,0184	0,0248

Pflanze	CV% _{Wh}	CV% _{Pop}	95%-Konf.int. _{Wh}	95%-Konf.int. _{Pop}
34/12	2,0570	2,3881	0,2114	0,0248
34/13	0,0846	2,3881	0,0084	0,0248
36/20	3,3920	2,3401	0,3491	0,0138
38/2	-	3,1659	0	0,0197

Die Gegenüberstellung zeigt, dass die Streuungen Indices der diploiden Populationen und die Streuungen Indices der DNA-diploiden Messwiederholungen ähnliche Größen aufweisen. Bei den DNA-tetra- und DNA-oktoploiden Populationen ist die Populationsstreuung jedoch deutlich größer als innerhalb der einzelnen Wiederholungsmessungen.

Um die Streuungen grafisch darzustellen, wurden die Indizes der Einzel- und der Wiederholungsmessungen gereiht nach Populations- und Einzelpflanzennummern in einem Diagramm (siehe Abbildung 27) aufgetragen, wobei die Indizes der Wiederholungsmessungen in verschiedenen Farben markiert wurden. In der Legende sind die Einfachmessungen (Em.) und die Nummern der dreifach vermessenen Pflanzen angegeben. Auch in der Grafik wird sichtbar, dass die Streuungen innerhalb der Populationen gegenüber den Streuungen der Wiederholungsmessungen größer sind, wobei sich die Variationskoeffizienten der Wiederholungsmessungen der unterschiedlichen Ploidiestufen nicht deutlich unterscheiden.

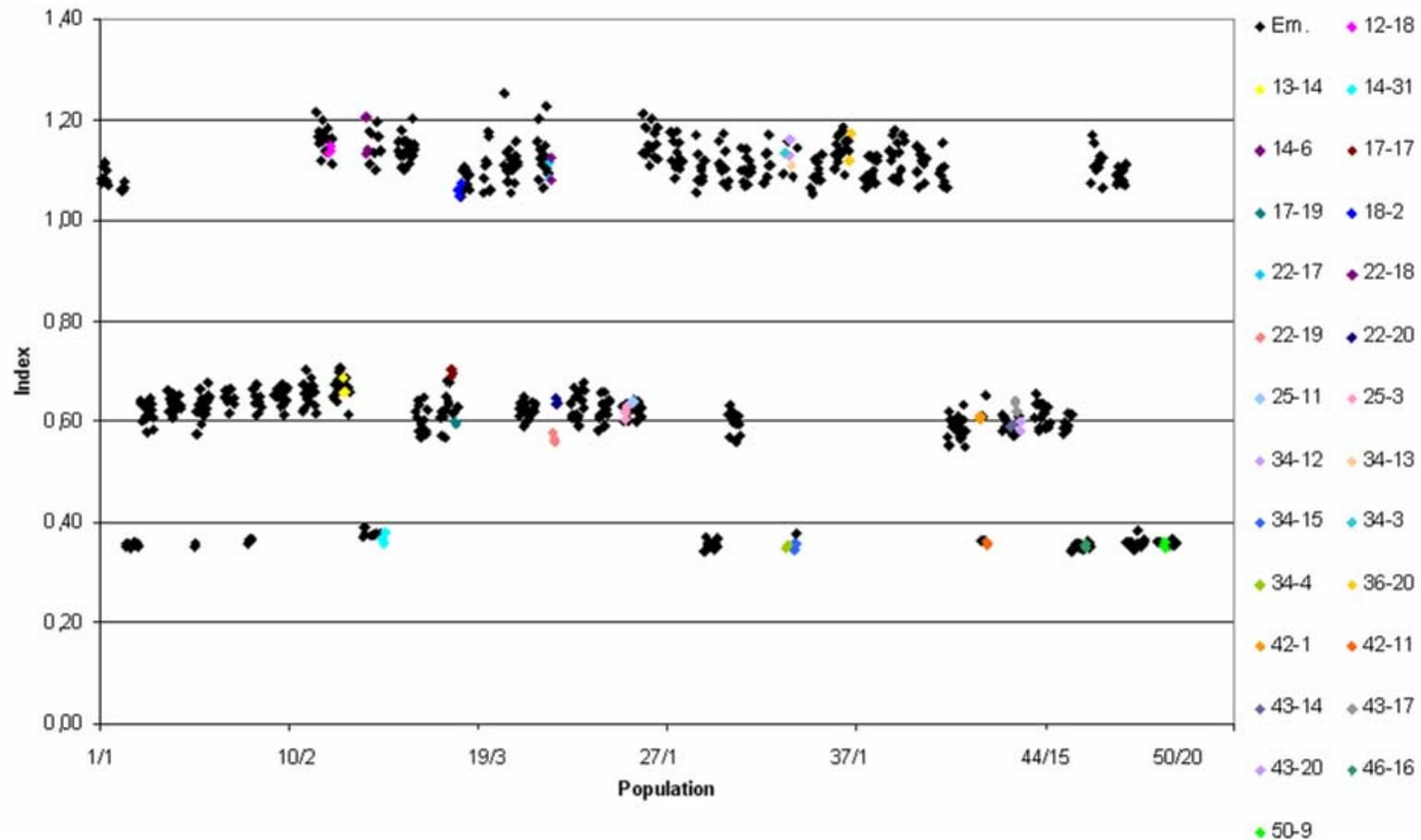


Abbildung 27: Verteilung der Indices, nach den aufsteigenden Zahlen der Populationen geordnet. Die Indices der Einfachmessungen (Em.) sind mit schwarzen Punkten gekennzeichnet, die Indices der Messwiederholungen mit der der Legende entsprechenden Farbe. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass bei den DNA-tetra- und den DNA-oktoploiden Exemplaren die Streuung der Wiederholungsmessungen geringer ist als die Streuung innerhalb der Populationen

III.1.2.b Zehnfache Wiederholungsmessungen

Weiters wurde jeweils eine Pflanze einer Ploidiestufe zehn Mal gemessen, um die Messgenauigkeit des Durchfluss-Zytometers zu charakterisieren. So konnte die Empfindlichkeit des Gerätes festgestellt werden. Das 5%/95% - Perzentile beziehen sich auf den euploiden Chromosomensatz und sind in Tabelle 11 angeführt:

Tabelle 11: Werte der zehnfachen Messwiederholungen; anhand der Mittelwerte und der Standardabweichungen (Stabw.) lassen sich die 5%/95%-Perzentile berechnen, welche die Messgenauigkeit des Durchfluss-Zytometers angeben.

Pflanze Nr.	Mittelwert der Indices	Stabw.	CV %	5%/95% - Perzentile der Indices
49/19 (2x)	0,3652	0,0036	0,9809	0,3593 – 0,3689
43/19 (4x)	0,6088	0,0043	0,6991	0,6026 – 0,6141
12/14 (8x)	1,1452	0,0084	0,7307	1,1371 – 1,1581

III.2 Chromosomenzählung

Anhand der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenz-Indices wurden für die lichtmikroskopische Ermittlung der Chromosomenzahl 27 Pflanzen ausgesucht, die möglichst unterschiedliche Indices aufwiesen. Diese Untersuchungen dienten der Korrelation der festgestellten Größenklassen der Indices mit der Zytologie der Individuen. Hypothetisch ist eine Assoziation mit unterschiedlichen Ploidien zu erwarten. Weiters sollte durch diese Vorgangsweise aufgrund der auffälligen Variation der Indices innerhalb der Klassen auf ein eventuelles Auftreten von Aneuploidie getestet werden.

Von den gewählten Exemplaren wurden Wurzelspitzen fixiert, um deren Chromosomenzahl genau zu bestimmen. Im Folgenden werden nun beispielhaft drei Chromosomenzählungen jeweils einer Ploidiestufe angeführt. Auf die taxonomischen Typen kann hierbei noch nicht näher eingegangen werden, da das zugehörige Herbarmaterial zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht bearbeitet wurde. Die Skizzen beinhalten die Zeichnung, die genaue Bezeichnung des Präparates, ein dokumentiertes Foto sowie die zugehörigen Objektträgertisch-

Koordinaten des Nikon Eclipse 600 des dargestellten Teilungsstadiums, das Datum der Fixierung und das Präparationsdatum der verwendeten Wurzel.

Chromosomenzählung eines diploiden *Valeriana-officinalis*-Exemplars mit der entsprechenden Skizze (Abbildung 28 und Abbildung 29):

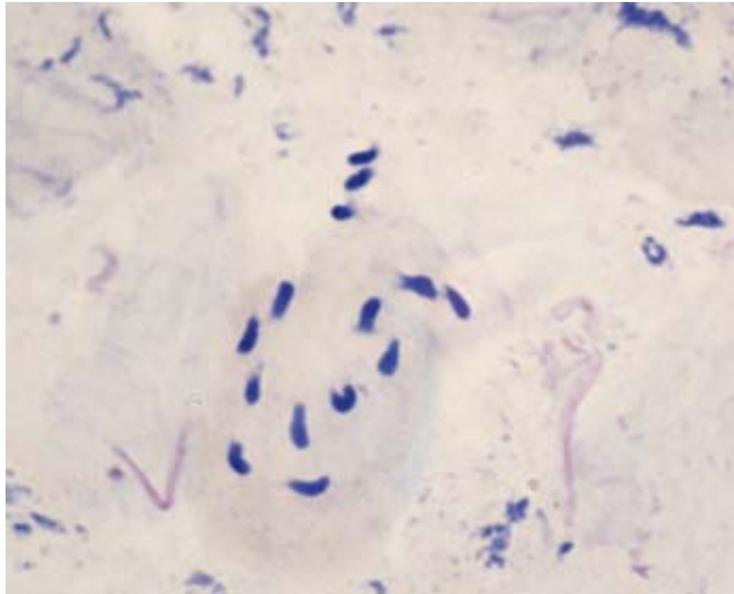


Abbildung 28: frühe Metaphase - Voff 34/4

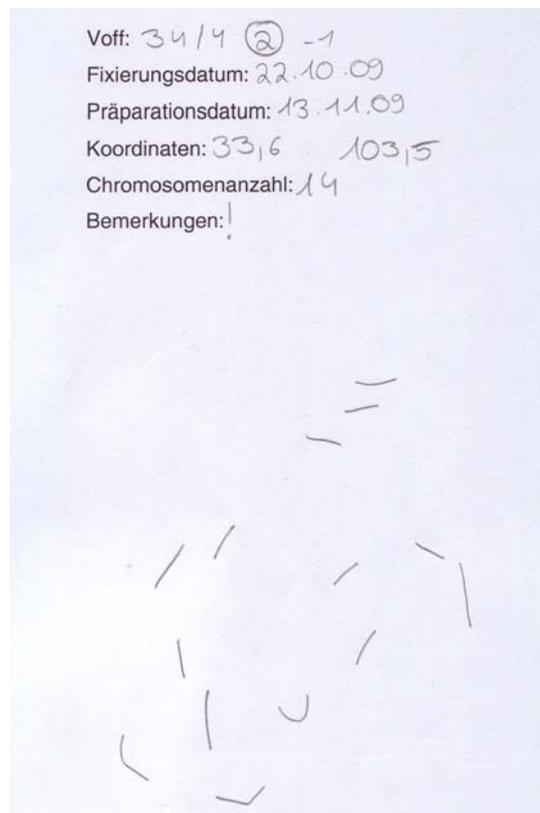


Abbildung 29: Skizze des Teilungsstadiums aus Abbildung 28

Chromosomenzählung eines tetraploiden *Valeriana-officinalis*-Exemplars mit der entsprechenden Skizze (Abbildung 30 und Abbildung 31):

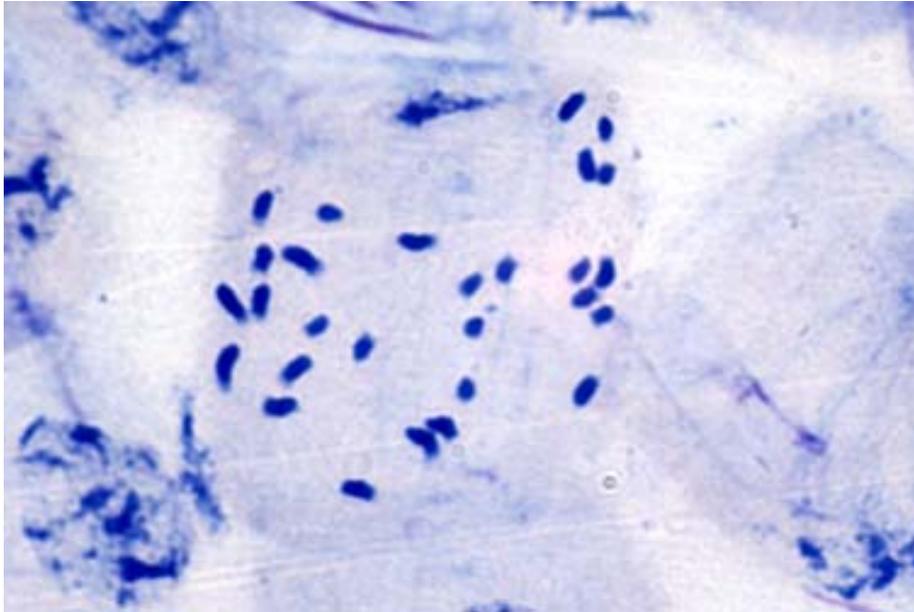


Abbildung 30: frühe Metaphase - Voff 17/19

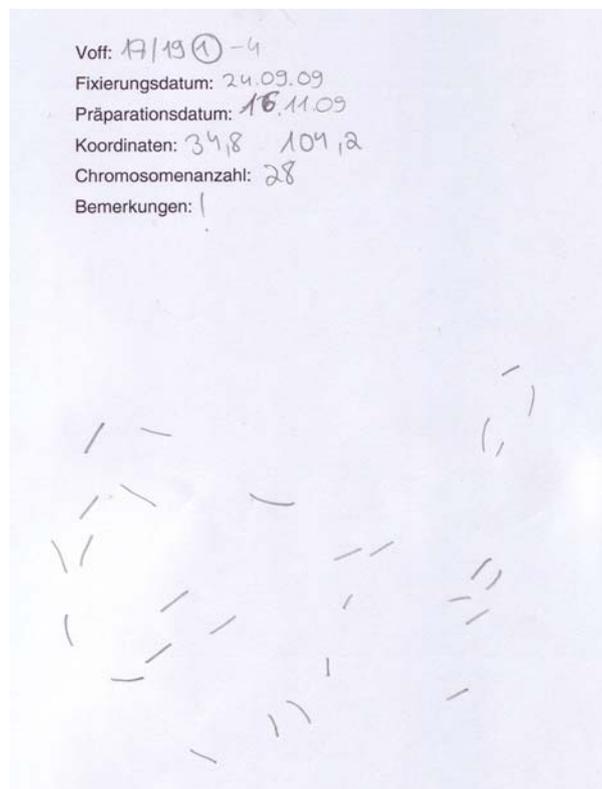


Abbildung 31: Skizze des Teilungsstadiums aus Abbildung 30

Chromosomenzählung eines oktoploiden *Valeriana-officinalis*-Exemplars mit der entsprechenden Skizze (Abbildung 32 und Abbildung 33):

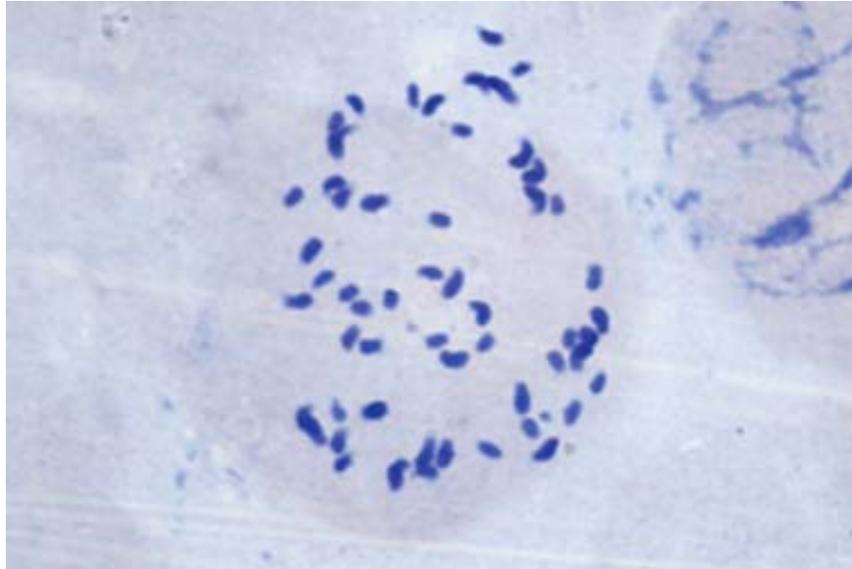


Abbildung 32: frühe Metaphase - Voff 14/6

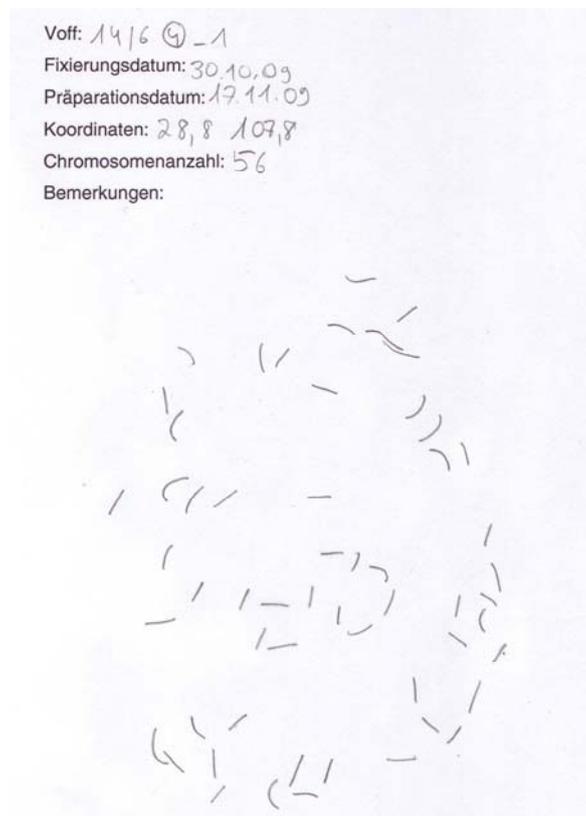


Abbildung 33: Skizze des Teilungsstadiums aus Abbildung 32

Ein eindeutiges Ergebnis war bei 18 von 27 Pflanzen möglich. Alle eindeutig zählbaren Kerne wiesen einen euploiden Chromosomensatz auf. Bei den nicht eindeutigen Präparaten ist die Spannbreite der bestimmten Chromosomenzahlen angegeben. Die Ergebnisse der Chromosomenzählungen sind in Tabelle 12, Tabelle 13 und Tabelle 14 angeführt.

Tabelle 12: Ergebnisse der Chromosomenzählungen der diploiden Baldriane (nach aufsteigenden Indices sortiert)

Pflanze	Mittelwert der Indices	Chromosomenzahl	Anzahl der analysierten Teilungsstadien
34/4	0,3514	14	8
34/15	0,3519	14	6
46/16	0,3533	14	11
50/9	0,3537	14	9
42/11	0,3583	14	11
14/31	0,3690	14	6

Tabelle 13: Ergebnisse der Chromosomenzählungen der tetraploiden Baldriane (nach aufsteigendem Index)

Pflanze	Mittelwert der Indices	Chromosomenzahl	Anzahl der analysierten Teilungsstadien
22/19	0,5678	28	5
43/14	0,5927	28	8
43/20	0,5945	28	5
17/19	0,5973	28	7
42/1	0,6082	27–28	5
25/11	0,6184	28	8
43/17	0,6335	27–28	5
25/3	0,6392	28	5
22/20	0,6400	28	8
13/14	0,6687	28	6
17/17	0,6974	28	6

Tabelle 14: Ergebnisse der Chromosomenzählungen der oktaploiden Baldriane (nach aufsteigendem Index)

Pflanze	Mittelwert der Indices	Chromosomenzahl	Anzahl der analysierten Teilungsstadien
18/2	1,0612	55–56	6
22/17	1,1004	55–56	4
34/13	1,1098	55–56	9
38/2	1,1175	55–56	7
22/18	1,1292	55–56	8
34/3	1,1346	56	8
12/18	1,1393	55–56	10
34/12	1,1442	56	5
36/20	1,1461	50–60	6
14/6	1,1596	56	6

Wie in Abbildung 34 sowie in den Tabellen 12-14 verdeutlicht, korrelierten die drei Größenklassen der Indices in aufsteigender Größe der Werte mit dem diploiden, tetraploiden und oktaploiden Niveau. Abbildung 34 zeigt weiters, dass die Pflanzen gemäß ihrer Indices für die Wiederholungsmessungen und somit auch für die Chromosomenzählungen so gewählt wurden, dass das gesamte Spektrum an Indices abgedeckt wurde. Somit werden alle Bereiche, in denen eine mögliche Schwankung der Chromosomenzahlen auftreten könnte, durch die Chromosomenzählungen verifiziert.

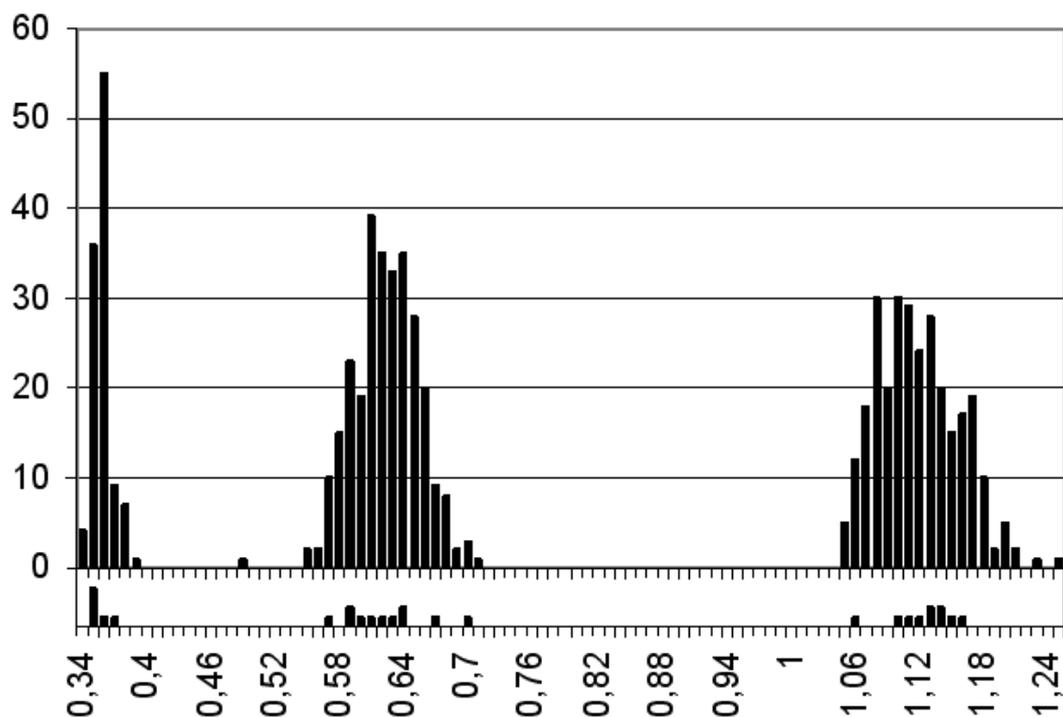


Abbildung 34: Anhand eines Häufigkeitsdiagramms der Indices wurden für die Messwiederholungen und die Chromosomenzählungen Pflanzen mit möglichst unterschiedlichen Indices ausgewählt. Die untere Skala zeigt die Fluoreszenz-Indices der chromosomal untersuchten Individuen und verdeutlicht die weite Streuung innerhalb der lichtmikroskopisch festgestellten Ploidien (die DNA-diploiden Baldriane wiesen Indices von etwa 0,35, die DNA-tetraploiden Indices von etwa 0,62 und die DNA-oktaploiden Indices von etwa 1,15 auf).

In jeder Ploidiestufe wiesen die untersuchten Exemplare mit dem niedrigsten Index und die Exemplare mit dem höchsten Index die gleiche Chromosomenzahl auf. Dies trifft auch auf die oktaploiden Pflanzen zu, denn die aufgetretenen Schwankungen von einem Chromosom sind zu gering, um die Schwankung der Indices von bis zu zehn Prozent zu erklären.

IV Diskussion

IV.1 Durchfluss-Zytometrie

Grundsätzlich ist die Durchfluss-Zytometrie zum Vermessen von Baldrian gut geeignet, da die Messungen bis auf einige DNA-oktoploide Populationen deutlich voneinander getrennte Proben- und Standard-Peaks ergaben. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Indices, die aus den erhaltenen Messwerten ermittelt wurden, direkt miteinander verglichen werden können, da ein Verstellen des Gain die Größe der Indices nicht signifikant beeinflusst.

Um die tatsächliche Streuung der Indices festzulegen, müssen zuvor systematische Fehler berücksichtigt werden wie der Messfehler des Durchfluss-Zytometers. Dieser liegt laut Werksangaben beim vorliegenden Verfahren bei 1-2 %. Mit den zehnfachen Messwiederholungen sollte die Größe des Messfehlers ersichtlich werden. Er kann grob mit dem vom \pm Doppelten des CV% abgedeckten Wertebereich festgesetzt werden, woraus für die DNA-diploiden ein Messfehler von $\pm 1,96$ %, für die DNA-tetraploiden sowie und für die DNA-oktoploiden ein Messfehler von $\pm 1,40$ % resultiert. Anhand der doppelten Standardabweichung der zehnfachen Messwiederholungen wurde errechnet, wie genau die durchfluss-zytometrischen Messungen in Bezug auf die Bestimmung der Chromosomenzahl sind. Da diese Rechnung unter der theoretischen Annahme erfolgt, dass alle Chromosomen dieselbe relative Fluoreszenz und damit denselben Index aufweisen, wird von DNA-Chromosomen gesprochen. Die Berechnung ergab für die DNA-diploiden Baldriane eine Schwankung von 13,73–14,27 DNA-Chromosomen. Die Messung ist daher zumindest theoretisch genau genug für das Feststellen von Aneuploidie. Unter dieser Annahme wären alle bisher gesammelten DNA-diploiden Baldriane euploid. Bei den DNA-tetraploiden Baldrianen ergab sich eine Schwankung von 26,61–28,39 DNA-Chromosomen, d.h. hier kann die DNA-Chromosomenzahl auf $28 \pm 0,5$ genau bestimmt werden. Die DNA-oktoploiden Baldriane wiesen eine Schwankung von 55,03–56,97 auf, sodass ihre DNA-Chromosomenzahl auf 56 ± 1 genau bestimmt werden kann.

Ein weiterer systematischer Fehler kann die unterschiedliche Zusammensetzung der Inhaltsstoffe von Pflanzen unterschiedlicher DNA-Ploidiestufen sein. Die Inhaltsstoffe, die in den Individuen in unterschiedlichen Gehalten vorkommen, können die Bindung des Interkalators an die DNA beeinflussen, wodurch sich bei der Messung eine geringere Fluoreszenz ergibt (Greilhuber, 2005). Mit bestimmten Nachweisreaktionen können eventuelle störende Substanzen ermittelt werden. Hier besteht die Möglichkeit, die Messungen mit anderen DNA-Interkalatoren durchzuführen, wie z.B. mit Propidiumbromid, oder einen alternativen Weg der Probenzubereitung anzuwenden. Diese Erklärung würde jedoch nur dann zutreffen, wenn der verwendete interne Pisum-Standard eine von der Probe abweichende Interferenz mit den *Valeriana*-Inhaltsstoffen aufweisen würde.

Die verbleibende Variation kann schließlich durch die biologische Variation des DNA-Gehalts verursacht werden. Diese könnte über (i) Aneuploidien, (ii) Kombination von elterlichen Genomen unterschiedlicher Größe, (iii) unabhängige Änderungen des DNA-Gehaltes der Genome eigenständiger polyploider Entwicklungslinien erklärt werden.

Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass die Streuung mit steigender Ploidiestufe zunimmt (Abbildung 20), d.h. die DNA-diploiden Pflanzen weisen die geringste Streuung auf. Die größte Streuung fand sich bei den DNA-tetraploiden Pflanzen, wie aus den Variationskoeffizienten der Indices der Ploidiestufen hervorgeht: die DNA-tetraploiden Indices weisen mit 4,79 den größten CV% auf, die DNA-oktoploiden Indices einen CV% von 3,38. Hier würde eventuell eine Analyse des Herbarmaterials darüber Aufschluss geben, ob es sich um morphologisch unterschiedliche Typen handelt. Ist dies der Fall, können die Unterschiede im DNA-Gehalt auf unterschiedliche Zytotypen hinweisen. Bei den DNA-oktoploiden Pflanzen war zwar die Streuung der Indices innerhalb der Populationen am größten, allerdings wiesen auch die dreifachen Messwiederholungen eine große Variationen auf – die CV% der Populationen 14 und 36 waren sogar größer als die CV% der Wiederholungsmessungen –, sodass

eine generell deutliche Differenz zwischen $CV\%_{pop}$ und $CV\%_{wh}$ nur bei den DNA-tetraploiden Messungen sichtbar war.

Darüber hinaus stieg auch die bei den Messungen beobachtete relative Fluoreszenz nicht genau um das entsprechende Vielfache der DNA-Ploidie, sondern um einen etwas geringeren Wert an. Der Grund für diese beiden Umstände könnte in der Evolution der polyploiden Genome zu suchen sein: In Polyploiden finden im Laufe der evolutionären Entwicklung immer wieder DNA-Verluste statt, wobei „ältere“ Polyploide einen stärkeren DNA-Verlust aufweisen können als solche, die erst vor kürzerer Zeit entstanden sind (Soltis, D. E et al. 2003). Finden diese Verluste für die unterschiedlichen Ploidieniveaus in ungleichem Ausmaß statt, kann sich dies in einer Nicht-Linearität der gemessenen Werte widerspiegeln und so die Abweichung erklären. Alternativ könnte die negative Differenz zwischen erwarteter und beobachteter Fluoreszenzintensität durch Selbstauslöschung der Fluoreszenz in den Kernen höherer DNA-Menge in den Polyploiden erklärt werden.

Obwohl sich die Durchfluss-Zytometrie als eine geeignete Methode zur Untersuchung von *Valeriana* erwies, fanden aufgrund der großen Schwankungsbreite der Fluoreszenz-Indizes einige Messungen nicht mehr im optimalen Bereich des Durchfluss-Zytometers statt. Außerhalb eines mittleren Bereichs sind die Messungen nicht mehr linear und es können insbesondere bei fluktuierender Signalverstärkung Schwankungen auftreten. Um auch die Verhältnisse der Peaks zwischen den einzelnen Ploidiestufen zu vergleichen, wurde der Gain so eingestellt, dass das Signal des Standards stets bei ungefähr derselben relativen Fluoreszenz auftritt. Bei eventuellen Wiederholungsmessungen könnte der Gain abhängig von der erwarteten Fluoreszenzintensität verändert und somit jede Messung im optimalen Bereich durchgeführt werden.

Darüber hinaus überlappten die Peaks in manchen oktoploiden Populationen mit den Peaks von *Pisum* teilweise, sodass eine eindeutige Trennung nicht mehr möglich war. Um dies zu umgehen, könnten diese Populationen zusätzlich mit anderen Standards vermessen werden.

Zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen können noch weitere Arbeiten durchgeführt werden: die durchfluss-zytometrischen Messungen müssen vervollständigt werden, sodass jede Pflanze mindestens drei Mal gemessen wurde. Dadurch kann eine größere Genauigkeit der Daten erreicht werden. Es müssen also nicht nur die bereits gemessenen Pflanzen ergänzenden Messungen unterzogen werden, sondern auch die Exemplare, bei welchen nicht genügend Blattmaterial zur Verfügung stand sowie die Pflanzen, die noch gesammelt werden müssen.

Eine Möglichkeit, um von den Jahreszeiten unabhängig zu messen, ist die durchfluss-zytometrische Messung von Herbarmaterial. Diese wurde bereits beschrieben (Suda, J. et al. 2005) und würde – sofern sie bei *Valeriana* funktioniert – einen großen Vorteil bedeuten.

Weiters können die Pflanzen auch – wie bereits erwähnt – mit anderen Farbstoffen gemessen werden, um eine geringere Streuung zu erzielen. Wichtig wird auch die Gruppierung der untersuchten Individuen gemäß deren Genetik, Morphologie und Ökologie sein. Dies sollte ermöglichen, die Zytologie getrennt nach natürlichen, evolutionären Einheiten vorzunehmen sowie mögliche verbliebene zytologische Variation in diesen Entwicklungslinien exakter zu beschreiben und deren Ursache zu eruieren.

IV.2 Chromosomenzählung

Anhand der Chromosomenzählung sollten die Ergebnisse der Durchfluss-Zytometrie mit der Zytologie korreliert werden. Dabei stand neben der Ermittlung der DNA-Ploidien auch die Frage im Vordergrund, ob die starke Variation bei den DNA-tetraploiden und den DNA-oktoploiden Pflanzen eventuell durch eine Variation der Chromosomengrundzahl verursacht wird.

Mit der Chromosomenzählung konnte gezeigt werden, dass die gezählten Pflanzen mit dem niedrigsten Index den gleichen Chromosomensatz aufwiesen

wie die Exemplare mit dem höchsten Index. Für die Ergebnisse der Durchfluss-Zytometrie kann daher davon ausgegangen werden, dass die Indices der Pflanzen, welche in einen der drei Cluster (Abbildung 34) fallen, auch die entsprechende Ploidiestufe haben und damit vermutlich euploid sind. Dies ist allerdings nur eine Extrapolation der Ergebnisse aus den Chromosomenzählungen und eine hypothetische Schlussfolgerung. Die Messgenauigkeit des durchflusszytometrischen Verfahrens erlaubt diesen Schluss hingegen nicht. Zumindest hypothetisch könnte daraus gefolgert werden, dass die Schwankungen der Indices nicht mit einer Änderung der Chromosomenzahl erklärbar sind, sondern beispielsweise durch unterschiedliche DNA-Gehalte, oder aber auch durch Unterschiede in der Zusammensetzung der Inhaltsstoffe, welche die durchflusszytometrische Messung beeinflussen könnten.

Um vor allem bei den oktoploiden Exemplaren die Ausbeute an zählbaren Stadien in den Wurzelspitzen zu erhöhen, sind folgende Faktoren zu beachten: Die Jahreszeit spielt für die Ernte eine wesentliche Rolle, da gegen Ende Oktober die meisten Wurzeln nur noch eine reduzierte Wachstumsaktivität aufweisen. Dieser Umstand wirkte sich besonders schwerwiegend auf die oktoploiden Exemplare aus, da bei höherer Ploidiestufe die Zellteilungsrate aufgrund der längeren Dauer des Mitosezyklus von sich aus bereits geringer ist. Dadurch war die Wahrscheinlichkeit, einen zählbaren Kern zu finden, stark reduziert. Um bei den oktoploiden Wurzeln die Anzahl der zählbaren Kerne zu erhöhen, sollte die Zeit bis zum Fixieren erhöht werden, sodass mehr Zyklen durchlaufen bzw. angehalten werden können. Weiters konnten sich offensichtlich nur wenige Pflanzen nach der Überführung nach Wien im Sommer bereits genügend regenerieren. Obwohl die am weitesten entwickelten Pflanzen ausgewählt wurden, waren wahrscheinlich bei einigen Exemplaren die Wurzeln noch nicht genügend stark ausgebildet, da die Ernte etwa zwei Monate nach dem Sammeln der Pflanzen stattfand.

Die Chromosomenzählung ist zwar eine verlässliche, aber sehr zeitaufwändige Methode. Während für diese Vorgangsweise ein Arbeitstag pro Pflanze eingerechnet werden muss, können mit der Durchfluss-Zytometrie etwa 45 Pflanzen in derselben Zeit vermessen werden. Daher ist diese indirekte Methode der Chromosomenzahlbestimmung sicherlich erstrebenswert. Um diese bei

Valeriana officinalis anzuwenden, sind allerdings mehr Chromosomenzählungen nötig als die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, da das *Valeriana officinalis* agg. zahlreiche Typen aufweist und die Bestimmung nur jeweils innerhalb eines Typs sinnvoll ist. Sind genügend Zählungen vorhanden, können die gezählten Chromosomen mit den Daten der Durchfluss-Zytometrie wieder korreliert werden.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Diplomarbeit nicht nur die Ploidiestufen der gesammelten Pflanzen bestimmt werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass zwar die Schwankung der Indices und somit die Schwankung des DNA-Gehaltes bei höheren Ploidieniveaus zunimmt, dieser jedoch nicht im Zusammenhang mit der Chromosomenzahl steht. Das bedeutet, dass unterschiedliche Typen derselben Ploidiestufe nicht durch ihre Chromosomengrundzahl, möglicherweise aber durch den mit der Durchfluss-Zytometrie ermittelten DNA-Gehalt unterscheiden können.

Wird zu den Ergebnissen der durchfluss-zytometrischen Messungen noch die geographische Verteilung der Ploidiestufen in Tirol und Vorarlberg (Abbildung 35, siehe Anhang) miteinbezogen, so wird deutlich, dass fast alle oktoploiden Populationen aus dem Lech- oder dem unteren Inntal im westlichen Nordtirol stammen. Da „*procurrens*“ eher ein „feuchtigkeitsliebender Tieflandtyp“ (Titz, W. & Titz, E. 1982) ist, handelt es sich bei diesen Populationen vermutlich um „*versifolia*“, der in den Ostalpen westlich der Brennerfurche und im Großteil der Westalpen den tetraploiden Grundtyp „*collina*“ vertritt.

Die tetraploiden Populationen konzentrieren sich hingegen auf das Stubai- und das gesamte Inntal, wobei es sich um „*collina*“ handeln kann oder aber um „*vorarlbergensis*“, welcher im inneralpinen Rhein- und Inntal vorkommt.

Dass in Nordtirol und Vorarlberg kaum diploide Populationen, die aufgrund ihrer Ploidiestufe bereits dem Typ „*exaltata*“ zugeordnet werden können, stammen, kann mit der von Titz beschriebenen Beobachtung erklärt werden, dass „*exaltata*“ in diesem Gebiet durch den ihm ökologisch nahestehenden tetraploiden Typ „*vorarlbergensis*“ verdrängt wurde. Die beiden in

Niederösterreich gesammelten Populationen 49 und 50 sind diploid und somit ebenfalls dem Typen „*exaltata*“ zuzuordnen. Die Sammelorte entsprechen auch der Beschreibung von „*exaltata*“ als „Tieflands- bzw. Talform“ (Titz, W. & Titz, E. 1982).

V Zusammenfassung

Die aktuelle Einteilung des *Valeriana officinalis* agg. in Unterarten (Fischer et al. 2008) bzw. Kleinarten (Titz, W. & Titz, E. 1982) stützt sich auf eine Charakterisierung von taxonomisch informellen „Typen“. Diese basiert auf morphologischen und karyologischen Daten, die sich auf Einzelpflanzen oder Populationen mit wenigen Vertretern stützen.

Um ein verbindlicheres taxonomisches Konzept erstellen zu können sowie um die evolutionären Mechanismen der Genese der Arzneibaldriane besser zu verstehen, wurde 2008 ein Projekt begonnen, im Zuge dessen etwa 100 Baldrian-Populationen in Tirol (Nord- und Südtirol), Vorarlberg, Bayern und der Schweiz gesammelt und mit Durchfluss-Zytometrie, Chromosomenzählungen, AFLP, standörtliche Vegetationsanalyse und morphometrischen Analysen charakterisiert werden sollen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Ploidiestufen der bis Ende 2009 gesammelten Pflanzen mittels Durchfluss-Zytometrie und Chromosomenzählungen an ausgewählten Referenz-Individuen ermittelt. *Valeriana officinalis* agg. erwies sich, wie bereits in früheren Studien, als diploide, tetraploide und oktoploide Sippe.

Die über die durchfluss-zytometrischen Messungen ermittelten Fluoreszenzindices zeigten für Polyploide eine erhöhte Streuung, wobei die Schwankung der tetraploiden Baldriane am größten war. Dies kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden wie z.B. durch den unterschiedlich starken DNA-Verlust im Lauf der Evolution, da Polyploidisierungen, die bereits längere Zeit zurückliegen, mit einem stärkeren DNA-Verlust verbunden sind.

Ein weiterer möglicher Grund für die Schwankungen der DNA-Gehalte kann der unterschiedliche Gehalt von Inhaltsstoffen sein, welche die Bindung des Fluorochroms an die DNA verhindern oder erschweren.

Für die Bestimmung des Ploidieniveaus waren die Messungen ausreichend genau, da sich die Ergebnisse auf drei deutlich voneinander getrennte Cluster konzentrieren, die den drei bei Baldrian vorkommenden Ploidiestufen entsprechen. Bei bestimmten Pflanzen, die so ausgewählt wurden, dass ihre ermittelten Fluoreszenzintensitäten möglichst breit gestreut sind, wurde durch

Chromosomenzählungen die genaue Chromosomenzahl bestimmt. Alle genau bestimmte Chromosomensätze erwiesen sich hierbei als euploid, woraus hypothetisch folgt, dass die in den Messungen beobachtete Streuung nicht durch eine Schwankung der Chromosomenzahl zustande kommt, sondern durch eine Schwankung im DNA-Gehalt des Genoms. Alternativ müssen jedoch auch Ursachen, die zu einem erhöhten Messfehler in den polyploiden Zytotypen führen, in Betracht gezogen werden.

Die gesammelten Pflanzen werden im Zuge des Projektes noch weiteren Untersuchungen unterzogen, um die Morphologie und die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Pflanzen und den Populationen genauer zu charakterisieren.

Mit den resultierenden Daten wird eine Überprüfung und eventuelle Überarbeitung der bestehenden Einteilung des *Valeriana-officinalis*-Aggregates in Mitteleuropa möglich sein.

VI Summary

Until today there is no clear definition of the subspecies of *Valeriana officinalis* agg. At the moment, the classification of *Valeriana officinalis* agg. is done by defining so-called “Types”. This classification is quite vague and it is based on a relatively small amount of data deriving from herbarium material and chromosome counts. Most of this work was done by Prof. Titz, who wasn’t able to finish his work on *Valeriana officinalis*.

Therefore, a project was started in 2008 to improve this situation. 100 populations of *Valeriana officinalis* are supposed to be collected until 2010 in Tyrol, Vorarlberg and Bavaria. They are going to be measured using flow-cytometry, AFLP and morphometric analysis.

Valeriana officinalis agg. is diploid, tetraploid and octoploid. In the line of this diploma thesis the plants that were collected until September 2009 were all measured by flow-cytometry. Those are about 50 populations consisting of 20 individuals and 100 single plants. The resulting data enables to define the ploidy level of the plant.

Furthermore, there were chromosome counts done on 27 plants which showed different DNA contents. They are supposed to assure the data resulting from the flow-cytometry measurements.

The data showed a greater variation of the DNA contents in populations with higher ploidy levels. However, the tetraploid populations showed the greatest amount of variation. This variation can derive from a measuring error. By doing the measurement of the 27 plants (that were also counted) repeatedly, the results showed that the variation of the measuring was greater than the measuring error.

The remaining variation can be caused by real differences in DNA content due to different amounts of DNA loss during evolution. Studies had shown that “elder” polyploids experience a greater amount of DNA loss than “younger” polyploids.

Another possible reason for the remaining variation can be differences in the content of certain compounds between ploidy levels. Those compounds could inhibit the bonding of the fluorochrome to the DNA.

Analysing the flow cytometry data it was possible to determine the ploidy level of each collected plant. The resulting data concentrated in three separated clusters, which stand for the three ploidy levels of *Valeriana*.

To verify the flow cytometry results there were several plants analysed by chromosome counting which were chosen by the variety of their flow cytometry results. Every counted plant turned out to be euploid, which means that the variation of the flow cytometry data is not due to a variation of the chromosome number, but possibly due to a variation in DNA-content of the genome.

The determination of the ploidy level was the first of many measurements being done with the collected plant material. Using AFLP will allow to take a closer look to the relations within one population. Those data correlated with the morphological analysis of the herbarium vouchers will allow to sharpen up the classification of the *Valeriana officinalis* agg. in Middle Europe.

VII Literaturverzeichnis

Andreatini, R., Sartori, V. A., Seabra, M. L. V. & Leite, J. R. 2002. Effect of Valpotriates (Valerian Extract) in Generalised Anxiety Disorder: a Randomized Placebo-controlle Pilot Study. *Phytotherapy Research* 16: S. 650-654.

Benedum, J., Loew, D. & Schilcher, H. 2006. *Arzneipflanzen in der traditionellen Medizin*. 4. Aufl., Kooperation Phytopharmaka, Bonn.

Bent, S., Padula, A., Moore, D., Patterson, M. & Mehling, W. 2006. Valerian For Sleep: A Systematic Review And Meta-Analysis. *The Americal Journal of Medicine*, 119: S. 1005-1012.

Bos, R., Woerdenbag, H. J., Hendriks, H., Zwaving, J. H., de Smet, P. A. G. M., Tittel, G., Wikström, H. V. & Scheffer, J. J. C. 1996. Analytical Aspects of Phytotherapeutic Valerian Preparations. *Phytochemical Analysis*, Vol. 7: S. 143-151.

Braun-Blanquet, J. 1951. *Pflanzensoziologie, Grundzüge der Vegetationskunde*. Wien, Springer.

Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Rev. Geetics* 6: S. 836-846.

Diaper, A. & Hindmarch, I. 2004. A Double-Blind, Placebo-controlled Investigation of the Effects of Two Doses of a Valerian Preparation on the Sleep, Cognitive and Psychomotor Function of Sleep-Disturbed Older Adults. *Phytotherapy Research* 18: S. 831-836.

Dolezel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. 2007. Flow cytometry with plants: an overview. In Dolezel, J., Greilhuber, J., and Suda, J. *Flow cytometry in plant cells*. 41-65. Weinheim, Wiley-VCH.

-
- Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* Vol. 2, No. 9: S. 2233-2244
- Dweck, A. C. 1997. An Introduction to Valerian, *Valeriana officinalis* and related species. Houghton, P. J. (Hrsg.). *Valerian – The Genus Valeriana*. Harwood Academic Publishers, Niederlande. S. 1-20.
- Fischer, M. A., Adler, W. & Oswald, K. 2008. Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol. 3. Aufl., Land Oberösterreich, Biologiezentrum der OÖ Landesmuseen, Linz, S. 1392.
- Fuchs, L. 1543. Vom Baldrian. *New Kreüterbuch*. Basel.
- Greilhuber, J., Tensch, Ex. M. & Loureiro, J. C. M. 2007. Nuclear DNA Content Measurement. Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. *Flow Cytometry In Plant Cells*. Wiley-VCH, Weinheim. S. 67-101.
- Greilhuber, J. 2005. Intraspecific Variation in Genome Size in Angiosperms: Identifying its Existence. *Annals of Botany* Vol 95: S. 91-98.
- Hegarty, M. J. & Hiscock, S. J. 2008. Genomic Clues to the Evolutionary Success of Polyploid Plants. Elsevier Ltd. *Current Biology* Vol. 18 No. 10: S. 435-444.
- Houghton, P. J. 1999. The Scientific Basis for the Reputed Activity of Valerian. *J. Pharm. Pharmacol.* 51: S. 505-512.
- Kemper, K. J. 1999. *Valerian (Valeriana officinalis)*. Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research.
- Khom, S., Baburin, I., Timin, E., Hohaus, A., Trauner, G., Kopp, B., Hering, S. 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_A receptors: Molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* 53: S. 178-187.

-
- Otto, F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. Darzynkiewicz, Z. & Crissmann H. A. Academic Press, New York. *Methods in Cell Biology*. Vol. 33: S. 105-110.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. 2002. Neopolyploidy in Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 33: S. 589-639.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998. Pathways, Mechanisms And Rates Of Polyploid Formation In Flowering Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 29: S. 467-501
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Pires, J. C., Kovarik, A., Tate, J. A. & Mavrodiev, E. 2004. Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon (Asteraceae)* : cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Biological Journal of the Linnean Society* Vol. 82: S. 485-501.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Tate, J. A. 2003. Advances in the study of polyploidy since *Plant speciation*. *New Phytologist* 161: S. 173-191.
- Stowasser, J. M., Petschenig, M. & Skutsch, F. 1994. Stowasser, Lateinisch-deutsches Schulwörterbuch. Hödler-Pichler-Tempsky, Wien.
- Strasburger, E., neubearb. von Sitte, P. 2002. *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 35. Aufl., Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl., Berlin.
- Suda, J., Krahulcová, A., Trávníček, P. et al. 2006. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. *Taxon* 55, 447-450.
- Suda, J. & Trávníček, P. 2006. Reliable DNA Ploidy Determination in Dehydrated Tissues of Vascular Plants by DAPI Flow Cytometry – New Prospects for Plant Research. *International Society for Analytical Cytology, Cytometry Part A 69A*: S.273-280.

Titz, E. 1984. Die Arzneibaldriane Deutschlands mit besonderer Berücksichtigung Bayerns. Ber. Bayer. Bot. Ges. 55: S. 25-48.

Titz, W. & Titz, E. 1982. Analyse der Formenmannigfaltigkeit der *Valeriana officinalis*-Gruppe im zentralen und südlichen Europa. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 93: S. 405-415

Titz E.& Titz W. 1981. Die diploiden und tetraploiden Arznei-Baldriane der Schweiz und angrenzender Regionen (*Valerianaceae*). Botanica Helvetica 91; S. 169-188, Institut für Botanik der Universität Wien

Titz, W. & Titz, E. 1980. Die Arzneibaldriane Vorarlbergs und Liechtensteins. Jahrb. des Vorarlberger Landesmuseumsvereins 1980/81: S. 203-213.

Titz, W. & Titz, E. 1979. „*Valeriana versifolia*“ und andere oktoploide Arznei-Baldriane in den Schweizer Alpen und angrenzenden Regionen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. Vol. 89 (3/4): S. 251-277

Trauner, G., Khom, S., Baburin, I., Benedek, B., Hering, S. & Kopp, B. 2008. Modulation of GABA_A Receptors by Valerian Extracts is related to the content of Valerenic Acid. Planta Med 2008, 74: S. 19-24

Warner, D. A. & Edwards, G. E. 1989. Effects of Polyploidy on Photosynthetic Rates, Photosynthetic Enzymes, Contents of DNA, Chlorophyll, and Sizes and Numbers of Photosynthetic Cells in the C₄ Dicot *Atriplex confertifolia*. Plant Physiol. Vol. 91, S. 1143-1151.

Weberling, F. 1961. Die Infloreszenzen der Valerianaceen und ihre systematische Bedeutung. Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur in Mainz in Kommission bei Franz Steiner Verlag GmbH, Wiesbaden. Nr. 5, S. 51.

Wendel, J. F. 2000. Genome Evolution In Polyploids. Plant Molecular Biology 42: S. 225-249 Kluwer Academics Publishers, Niederlande.

Wichtl, M. (Hrsg.) 2009. Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Zepernick, B., Langhammer, L. & Lüdcke, J. B. P. 1983. Lexikon der offizinellen Arzneipflanzen. New York: de Gruyter, Berlin.

VIII Anhang

Tabelle 15: Liste der Populationen mit den Beschreibungen der Sammelorte, Sammler und Sammeldatum

Pop. Nr.	Staat, Bundesland, Ort	Breiten-grad °N	Längen-grad °E	Beschreibung	Sammler, Sammel-datum
1	Deutschland, Bayern, Burgwalden	48,27224	10,75058	Südlich von Burgwalden im Anhauser Tal, Wegrand und Bachufer	VKA, 01. Mai 09
2	Österreich, Steiermark, Hohe Student	47,74177	15,40194	-	JS, 10. Sep 08
3	Österreich, Vorarlberg, Höchst	47,48701	9,6261	ca. 1,7 km N Höchst; Seestraße immer weiter fahren bis zu Sumpfwiesen rechts und links der Straße	VKA, 02. Jul 09
4	Österreich, Vorarlberg, Dornbirn	47,39561	9,71356	Dornbirn-Hatlerdorf, Im Grund, ca. 1 km WSW vom Bahnhof Dornbirn-Hatlerdorf; Entwässerungsgraben entlang der Straße	VKA, 03. Jul 09
5	Österreich, Tirol, Thanrain	47,28749	11,01075	zwischen Fichtenwaldrand und B 171/ Inntal-Radweg, ca. 50 km W des Gasthofes Hirschen /Tenne Stams)	VKA, 11. Jul 09
6	Österreich, Tirol, Starkenbach	47,18667	10,6421	rechtes Innufer, Feldweg zwischen Bahnlinie und Inn; S von Starkenbach; teils trockene Abschnitte mit Pinus, Orchis; Baldrian in den feuchteren Abschnitten	VKA, 11. Jul 09
7	Österreich, Vorarlberg, Thüringen	47,21037	9,75991	Feuchtwiese an der Straße von Thüringen nach Schnifis (linke Seite), sehr schön und artenreich	VKA, 12. Jul 09

Pop. Nr.	Staat, Bundesland, Ort	Breiten-grad °N	Längen-grad °E	Beschreibung	Sammler, Sammel-datum
8	Österreich, Vorarlberg, Göfis	47,24724	9,64861	Ortsbereich von Rankweil kommend, ca. 100 m vor der Abzweigung "Ortsmitte" auf der rechten Seite zwischen einem Weidengebüsch und Maisacker, Walgaustraße	VKA, 12. Jul 09
9	Österreich, Vorarlberg, Frastanz	47,21525	9,64447	Augasse, Feuchtwiese neben Wohngebiet, teils gemäht	VKA, 13. Jul 09
10	Österreich, Vorarlberg, Hohenems	47,38143	9,71698	Unterklienstraße Ecke Breitenbergstraße, ungenützte Ecke des Steinbruchs; seit ca. 2-3 Jahren nicht mehr befahren	VKA, 14. Jul 09
11	Österreich, Vorarlberg, Ludesch	47,17512	9,7655	Ludesch; Gewerbegebiet Richtung Bahnhof, Zementwerkstraße (gesperrt), unter der Bahn durch bis zur Gerichtseiche, durch Fichtenschonung ans Ill-Ufer, Weidengebüsch an der Uferböschung zwischen Radweg und Ill	VKA, CD, 27. Jul 09
12	Österreich, Tirol, Fließ	47,12078	10,63415	Schloss Bideneegg, steiler WNW Burghang, Fußweg "Zur Lourdes" unterhalb der Burg	VKA, CD, 28. Jul 09
13	Österreich, Tirol, Fließ	47,11238	10,64653	Inntal, beim Gasthof Neuer Zoll unterhalb Fließ über den Inn, auf der linken Inn-Seite; Feldweg zur Erdaushub-Deponie Fließ/ Inntalradweg	VKA, CD, SB, 28. Jul 09
14	Österreich, Tirol, Ladis	47,07675	10,65248	Burgberg Schloss Laudegg, Ponyweider vom Haus Zwingerhof, NW-Hang	VKA, CD, SB, 29. Jul 09
15	Österreich, Tirol, Tobadill	47,12511	10,52198	Durch Tobadill durch bis zur Forststraße, Hang bei der alten Mühle	VKA, CD, SB, 29. Jul 09

Pop. Nr.	Staat, Bundesland, Ort	Breiten-grad °N	Längen-grad °E	Beschreibung	Sammler, Sammel-datum
17	Österreich, Tirol, Imsterberg	47,21516	10,7221	Imsterberg, Straße nach Imst, vor der Innbrücke rechts und links der Straße am Inn-Ufer und im Weidengebüsch	VKA, CD, SB, 31. Jul 09
18	Österreich, Tirol, Stuben am Arlberg	47,13949	10,17025	Arlberg-Bundesstraße von St.Christoph Richtung Zürs/Lech, ca. 400 m nach der Abzweigung rechts am Hang	VKA, SB, 30. Jul 09
19	Österreich, Tirol, Stuben am Arlberg	47,13893	10,16272	Arlberg-Bundesstraße oberhalb Stuben, in der letzten Serpentine	VKA, SB, 30. Jul 09
20	Österreich, Tirol, Langegerte	47,1531	10,71555	Weg von Langengerte nach Larchach, Feldweg sofort nach Abzweigung "Bichl" von Wens kommend, den Feldweg rechts rauf, ca. 600 m	VKA, CD, SB, 31. Jul 09
21	Österreich, Tirol, Pfunds	47,03484	11,48348	Greit bei Pfunds	CD, SB, 01. Aug 09
22	Österreich, Tirol, Nauders,	46,95932	10,56531	südliches Ortsende Nauders, Böschung rechte Straßenseite ortsauwärts, gegenüber Hotel Erika	CD, SB, 01. Aug 09
23	Österreich, Tirol, Pfunds/ Kajetanbrücke	46,9510 2	10,51059	rechtes Innufer W der Brücke; bei der Abzweigung zum Fischereiverein an den Inn	VKA, 01. Aug 09
24	Österreich, Tirol, Nauders	46,9104	10,4955	Straße von Pfunds nach Nauders, kurz nach der Festung Finstermünz links, Müllablagerplatz der Gemeinde Nauders	VKA, 01. Aug 09
25	Österreich, Tirol, Truppbach	46,99937	10,58951	Innauen zwischen Truppbach und Maria Stein, linkes Innufer	VKA, 02. Aug 09
26	Österreich, Tirol, Jerzens	47,14976		oberhalb Jerzens	CD, SB, 02. Aug 09

Pop. Nr.	Staat, Bundesland, Ort	Breiten-grad °N	Längen-grad °E	Beschreibung	Sammler, Sammel-datum
28	Österreich, Tirol, Ischgl	47,01226	10,29607	Feldweg zur Bodenalpe durch das Fimbartal, zweite Serpentine	VKA, SB, 04. Aug 09
29	Österreich, Tirol, Tarrenz	47,25878	10,77456	Oberes Ende des "Stausees" bei der "Knappenwelt Gurglbach", Gurglbachufer und Altwasserufer gleich NO der Brücke in Richtung Heilquelle	VKA, SB, 05. Aug 09
30	Österreich, Tirol, Längenfeld	47,07703	10,95686	Auwald der Ötztaler Ache flussaufwärts dem Wasserkraftwerk Längenfeld, an der Straße von Unterlängenfeld nach Oberried, linkes Ufer	VKA, SB, 06. Aug 09
31	Österreich, Tirol, Längenfeld	47,08253	10,96332	W-Hang N von Unterlängenfeld, direkt an der Straße vor der Ortseinfahrt; sehr exponiert und trocken, Pflanzen direkt an steiler Felskante und im Larix-Kahlschlag darüber	VKA, SB, 06. Aug 09
32	Österreich, Tirol, St. Leonhard im Pitztal	47,06856	10,84496	Uferbereich und Wiese zwischen Eggenstall und St. Leonhard	VKA, SB, 07. Aug 09
33	Österreich, Tirol, Vent	46,8718	10,92831	Vor Vent unterhalb Feldkögele, auf dem Hang von der Straße zur Venter Ache auf 500 m nach dem letzten Tunnel vor Vent (von Heiligenkreuz kommend)	VKA, 08. Aug 09
34	Österreich, Tirol, Bichlbach	47,42883	10,77768	Zwischen Bichlbach und Heiterwang, ca. 1 km nach Bichlbach; gleich nach der Brücke über den Grundbach rechts Richtung Sessellift	VKA, SB, 13. Aug 09

Pop. Nr.	Staat, Bundesland, Ort	Breiten-grad °N	Längen-grad °E	Beschreibung	Sammler, Sammel-datum
36	Österreich, Vorarlberg, Lindengschwend	47,53163	9,93567	Lindenschwend bis ganz nach hinten fahren, Feldweg rechts hoch zu dem Bienenhaus, entlang am Bach	VKA, SB, 14. Aug 09
37	Österreich, Vorarlberg, Warth	47,25948	10,19309	Lechtalbundesstraße von Holzgau nach Warth, in der letzten Kehre direkt vor Warth	VKA, SB, 14. Aug 09
38	Österreich, Vorarlberg, Schoppernau	47,29571	10,04221	Bregenzerwaldbundesstraße von Warth nach Schoppernau, bei der Abzweigung nach Salzbachvorsäß, Oberschmalzbachalpe, Hochkünzelspitze (links rauf), beiderseits der Bundesstraße	VKA, SB, 15. Aug 09
39	Österreich, Tirol, Walchen	47,25313	10,3231	Lechauen-Radweg auf der linken Lechseite (in Fließrichtung), zwischen Walchen und Hägerau	VKA, SB, 15. Aug 09
40	Österreich, Tirol, Warth	47,2546	10,17507	Wannenkopf, Steffisalpfitt über Wannenkopf nach Warth, in den Lawinenverbauungen	VKA, SB, 16. Aug 09
41	Österreich, Tirol, Kasern im Schmirntal	47,10666	11,60874	Schragerbach-Ufer von Gasthaus Kasern bis Zusammenfluss mit Kasererbach	VKA, AF, 18. Aug 09
42	Österreich, Tirol, Steinach am Brenner	47,08596	11,44603	Wiesenweg von Steinach nach Gschnitz, Gschnitzufer	VKA, AF, 18. Aug 09
43	Österreich, Tirol, Gries am Brenner	47,0331	11,48532	Aus Gries raus Richtung Brenner, gegenüber Landhaus Jenewein	VKA, AF, 19. Aug 09

Pop. Nr.	Staat, Bundesland, Ort	Breiten-grad °N	Längen-grad °E	Beschreibung	Sammler, Sammel-datum
45	Österreich, Tirol, Gschnitz	47,04392	11,33522	Weg zur Innsbrucker Hütte (von Trins aus erster Weg, nicht ganz so steil)	VKA, AF, 21. Aug 09
46	Österreich, Tirol, Mieders	47,15993	11,3677	Von Schönberg Richtung Telfes Ruderalfläche links vor der Abfahrt Telfes, in der Nähe der Müllablagungsfläche	VKA, AF, 21. Aug 09
47	Österreich, Tirol, Obermarende-bach	47,19731	11,16179	Straße vom Sellraintal nach Obermarendebach, Straßenrand vor dem Silo; am Marendebach, ca. 370 m vor der Kirche Sellrain rechts hoch	VKA, 22. Aug 09
48	Österreich, Steiermark, Schneealpe	47,68346	15,60319	Weg vom oberen Parkplatz zum Schneecalpenhaus, sehr steile, lehmige Lawinenspur	JS, CD, VKA, 01. Sep 09
49	Österreich, Nieder-österreich, Zwentendorf	48,6106	16,42525	Radweg entlang der Zaya in Richtung Wenzerdorf, beiderseits auf dem Damm, Mähwiese	VKA, AF, 07. Sep 09
50	Österreich, Nieder-österreich, Ernstbrunn	48,56888	16,34909	Straßenrand im Wald zwischen Enzerdorf und Klement, Richtung Ernstbrunn	VKA, AF, 07. Sep 09

Abkürzungen: VKA Dipl. Biol. Valerie Klatter-Asselmeyer
 JS Ao. Univ. Prof. Dr. Johannes Saukel
 CD Dr. Christoph Dobeš
 AF Alice Fischer
 SB Sabine Bressler

Tabelle 16: die durchfluss-zytometrisch ermittelten Indices der Einzelpflanzen

Pflanze	Index	vermutete Ploidiestufe
1	0,35	2x
2	0,35	2x
3	1,25	8x

Pflanze	Index	vermutete Ploidiestufe
63	0,35	2x
64	0,66	4x
65	0,65	4x

Pflanze	Index	vermutete Ploidiestufe
7	0,35	2x
8	0,37	2x
9	0,35	2x
10	0,35	2x
11	0,35	2x
13	0,61	4x
14	0,62	4x
15	0,62	4x
16	0,61	4x
17	0,61	4x
18	0,60	4x
19	0,61	4x
20	0,61	4x
23	0,36	2x
27	0,60	4x
28	0,63	4x
30	0,59	4x
31	0,36	2x
32	0,34	2x
33	0,35	2x
34	0,35	2x
35	0,65	4x
36	0,61	4x
38	1,10	8x
40	1,12	8x
41	1,14	8x
43	1,17	8x
44	0,62	4x
46	0,66	4x
47	1,09	8x
50	1,16	8x
51	0,67	4x
52	1,11	8x
54	1,08	8x
55	1,19	8x

Pflanze	Index	vermutete Ploidiestufe
67	1,13	8x
69	0,58	4x
70	0,58	4x
71	0,67	4x
72	0,62	4x
76	1,14	8x
78	0,59	4x
79	0,60	4x
80	0,60	4x
81	0,61	4x
82	0,35	2x
83	0,36	2x
84	0,36	2x
85	0,37	2x
86	0,37	2x
87	0,60	4x
88	0,57	4x
89	0,61	4x
90	0,61	4x
91	0,64	4x
95	0,59	4x
101	0,59	4x
102	0,61	4x
103	0,60	4x
108	0,38	2x
109	0,39	2x
110	0,39	2x
111	0,37	2x
112	0,36	2x
113	0,38	2x
115	0,36	2x
116	0,37	2x
117	0,36	2x
118	0,36	2x
119	0,36	2x

Pflanze	Index	vermutete Ploidiestufe
58	1,11	8x
60	0,66	4x
61	1,17	8x
62	0,36	2x

Pflanze	Index	vermutete Ploidiestufe
121	0,36	2x
122	0,35	2x
123	0,35	2x
124	0,35	2x

Tabelle 17: die durchfluss-zytometrisch ermittelten Indices der Populationspflanzen

Pflanze	Index	Pflanze	Index	Pflanze	Index	Pflanze	Index
1/1	1,0836	14/13	1,1343	25/15	0,6021	38/18	1,1039
1/2	1,0729	14/14	0,3750	25/16	0,6378	38/19	1,1703
1/3	1,0820	14/15	1,1003	25/17	0,6311	38/20	1,1558
1/4	1,1072	14/16	0,3783	25/18	0,6273	39/3	1,0963
1/5	1,1154	14/17	1,1967	25/19	0,6094	39/4	1,1490
1/6	1,0984	14/18	1,1658	25/20	0,6252	39/5	1,0630
1/7	1,0767	14/19	1,1670	26/2	1,1341	39/10	1,1318
1/9	1,0723	14/20	0,3758	26/4	1,2119	39/12	1,1399
2/27	1,0599	14/21	1,1391	26/5	1,1870	39/13	1,1277
2/28	1,0586	14/22	0,3746	26/6	1,1837	39/14	1,1187
2/29	1,0649	14/31	0,3691	26/7	1,1313	39/15	1,1129
2/30	1,0787	15/1	1,1393	26/8	1,1498	39/16	1,0754
3/4	0,3571	15/2	1,1575	26/9	1,1364	39/18	1,1202
3/5	0,3521	15/3	1,1290	26/11	1,1104	39/19	1,1219
3/6	0,3570	15/4	1,1809	26/12	1,1420	40/4	1,0934
3/8	0,3522	15/5	1,1045	26/13	1,2012	40/9	1,1026
3/9	0,3539	15/6	1,1558	26/14	1,1476	40/12	1,0895
3/10	0,3497	15/7	1,1293	26/15	1,1453	40/13	1,0677
3/11	0,3523	15/9	1,0984	26/16	1,1243	40/14	1,1526
3/12	0,3503	15/10	1,1576	26/17	1,1738	40/15	1,0774
3/13	0,3535	15/11	1,1565	26/18	1,1492	40/16	1,1050
3/14	0,3625	15/12	1,1425	26/19	1,1860	40/17	1,0647
3/15	0,3533	15/13	1,1301	26/20	1,1217	40/18	1,0650
3/16	0,3563	15/14	1,1126	27/1	1,1775	41/5	0,5693
3/17	0,3584	15/15	1,1302	27/4	1,1191	41/6	0,5519
3/18	0,3524	15/16	1,1492	27/5	1,1564	41/10	0,6187
3/19	0,3571	15/17	1,2023	27/9	1,1730	41/11	0,6055

Pflanze	Index
4/1	0,6361
4/2	0,6432
4/3	0,6015
4/4	0,6402
4/5	0,6286
4/6	0,6056
4/7	0,6115
4/9	0,5788
4/10	0,6100
4/11	0,6115
4/13	0,6452
4/15	0,6198
4/16	0,6346
4/17	0,6229
4/18	0,6082
4/19	0,5854
5/1	0,6623
5/3	0,6188
5/4	0,6458
5/5	0,6363
5/6	0,6553
5/7	0,6079
5/9	0,6227
5/11	0,6315
5/13	0,6241
5/14	0,6492
5/15	0,6481
5/16	0,6524
5/17	0,6316
5/18	0,6264
5/19	0,6332
6/1	0,3575
6/2	0,6190
6/4	0,5768
6/6	0,6329
6/7	0,6190

Pflanze	Index
15/18	1,1282
15/19	1,1399
15/20	1,1497
16/4	0,6212
16/5	0,6420
16/6	0,6075
16/8	0,6334
16/11	0,5810
16/12	0,5960
16/13	0,5676
16/14	0,5799
16/16	0,6491
16/17	0,6045
16/18	0,5762
16/19	0,5830
16/20	0,6231
17/1	0,6088
17/2	0,6198
17/3	0,5719
17/9	0,6098
17/10	0,6229
17/11	0,5675
17/12	0,6801
17/13	0,6487
17/14	0,6392
17/15	0,6320
17/16	0,6784
17/17	0,6965
17/18	0,6161
17/19	0,5963
17/20	0,6303
18/2	1,0744
18/5	1,0471
18/7	1,1004
18/8	1,0987
18/10	1,0610

Pflanze	Index
27/10	1,1069
27/11	1,0825
27/13	1,1349
27/14	1,1750
27/15	1,1534
27/16	1,1208
27/17	1,1014
27/18	1,1155
27/19	1,1199
28/1	1,1703
28/3	1,0547
28/4	1,0808
28/5	1,1306
28/6	1,0759
28/11	1,1070
28/12	1,1008
28/15	1,0784
28/16	1,0858
28/20	1,1186
29/1	0,3419
29/2	0,3696
29/4	0,3541
29/5	0,3595
29/7	0,3556
29/9	0,3565
29/10	0,3578
29/11	0,3538
29/13	0,3483
29/15	0,3484
29/16	0,3449
29/18	0,3592
29/19	0,3678
29/20	0,3519
30/5	1,1118
30/6	1,1579
30/10	1,1074

Pflanze	Index
41/12	0,5970
41/13	0,5924
41/14	0,5899
41/15	0,5945
41/16	0,6115
41/17	0,5666
41/18	0,5700
41/19	0,5840
41/20	0,6329
41/21	0,6025
41/22	0,5807
41/23	0,5500
42/1	0,6109
42/2	0,3629
42/3	0,6110
42/5	0,3615
42/6	0,3632
42/9	0,6506
42/11	0,3593
43/1	0,6136
43/4	0,5818
43/5	0,6093
43/6	0,6081
43/7	0,5917
43/9	0,5898
43/11	0,5964
43/12	0,5859
43/13	0,5992
43/14	0,5956
43/15	0,5734
43/16	0,5779
43/17	0,6209
43/18	0,6016
43/19	0,6114
43/20	0,6013
44/1	0,6086

Pflanze	Index
6/9	0,6648
6/11	0,6446
6/12	0,5930
6/13	0,6129
6/14	0,6127
6/15	0,6182
6/16	0,6280
6/17	0,6408
6/18	0,6784
6/19	0,6533
6/20	0,6504
7/6	0,6489
7/9	0,6618
7/10	0,6380
7/11	0,6597
7/12	0,6181
7/15	0,6489
7/16	0,6618
7/17	0,6380
7/18	0,6597
7/19	0,6489
7/20	0,6618
8/1	0,3646
8/3	0,3566
8/5	0,3614
8/10	0,3661
8/14	0,3657
8/15	0,3660
9/5	0,6641
9/8	0,6529
9/11	0,6359
9/12	0,6128
9/14	0,6760
9/16	0,6179
9/18	0,6477
9/19	0,6403

Pflanze	Index
18/13	1,1044
18/15	1,0998
18/17	1,0693
18/18	1,0881
18/19	1,0605
18/20	1,0907
19/3	1,0540
19/4	1,0822
19/5	1,1104
19/7	1,1192
19/10	1,1110
19/11	1,1660
19/13	1,1767
19/17	1,0595
19/18	1,0614
20/1	1,1083
20/5	1,2538
20/6	1,1336
20/7	1,0996
20/9	1,0776
20/10	1,0977
20/12	1,1408
20/13	1,1208
20/14	1,0563
20/15	1,1123
20/16	1,1002
20/17	1,0732
20/18	1,1268
20/19	1,1566
20/20	1,1170
20/21	1,1102
21/2	0,6368
21/3	0,6314
21/4	0,6582
21/5	0,5900
21/6	0,6226

Pflanze	Index
30/11	1,1131
30/12	1,0996
30/13	1,0751
30/14	1,1740
30/15	1,1041
30/16	1,1382
30/19	1,0672
30/20	1,0768
31/1	0,6151
31/4	0,6319
31/5	0,5680
31/8	0,6072
31/9	0,6203
31/11	0,5969
31/13	0,6055
31/14	0,5631
31/15	0,5603
31/16	0,5939
31/17	0,6103
31/18	0,5938
31/20	0,5726
32/4	1,1449
32/5	1,0984
32/8	1,0768
32/9	1,1002
32/11	1,0685
32/12	1,1401
32/13	1,1248
32/14	1,0939
32/15	1,0692
32/16	1,1199
32/17	1,0966
32/18	1,1057
33/7	1,0746
33/8	1,1318
33/9	1,1344

Pflanze	Index
44/3	0,6354
44/4	0,6540
44/5	0,6346
44/6	0,5894
44/8	0,5831
44/9	0,6356
44/11	0,6078
44/12	0,6282
44/13	0,6352
44/14	0,6184
44/15	0,5875
44/16	0,5865
44/17	0,6284
44/18	0,5938
44/19	0,5887
44/20	0,5970
45/1	0,5750
45/2	0,5874
45/11	0,5977
45/12	0,5934
45/15	0,5819
45/16	0,6166
45/18	0,5909
45/19	0,6136
45/20	0,6145
46/1	0,3422
46/2	0,3489
46/3	0,3488
46/5	0,3531
46/6	0,3534
46/7	0,3571
46/8	0,3515
46/9	0,3564
46/10	0,3589
46/11	0,3494
46/12	0,3476

Pflanze	Index
9/20	0,6300
10/1	0,6516
10/2	0,6487
10/6	0,6633
10/7	0,6498
10/9	0,6590
10/11	0,6495
10/12	0,6287
10/14	0,6487
10/15	0,6741
10/16	0,6142
10/17	0,6327
10/18	0,6616
10/19	0,6429
10/20	0,6690
11/3	0,6748
11/4	0,6191
11/6	0,6266
11/7	0,6557
11/9	0,6465
11/10	0,7033
11/11	0,6600
11/12	0,6397
11/13	0,6673
11/14	0,6861
11/15	0,6542
11/17	0,6704
11/18	0,6323
11/19	0,6593
11/20	0,6185
12/2	1,2145
12/3	1,1660
12/6	1,1763
12/7	1,1546
12/9	1,1603
12/10	1,1188

Pflanze	Index
21/7	0,6276
21/8	0,6127
21/9	0,6408
21/10	0,6409
21/11	0,6265
21/12	0,6119
21/13	0,6372
21/14	0,6191
21/15	0,6281
21/16	0,6491
21/17	0,5921
21/18	0,6370
21/19	0,6234
21/20	0,6159
22/1	1,1578
22/2	1,2016
22/3	1,0797
22/5	1,1395
22/7	1,1208
22/8	1,1107
22/9	1,1226
22/11	1,0653
22/12	1,1279
22/13	1,1463
22/14	1,2272
22/15	1,1038
22/16	1,0941
22/17	1,0839
22/18	1,0814
22/19	0,5670
22/20	0,6373
23/2	0,6356
23/4	0,6083
23/6	0,6149
23/8	0,6665
23/9	0,6152

Pflanze	Index
33/11	1,0880
33/12	1,1694
33/14	1,1096
33/16	1,1102
34/2	1,0922
34/3	1,1332
34/4	0,3533
34/11	1,1573
34/12	1,1276
34/13	1,1104
34/14	1,0856
34/15	0,3441
34/19	0,3781
34/20	1,1457
35/2	1,0641
35/5	1,0548
35/6	1,0527
35/8	1,0881
35/10	1,0827
35/13	1,1220
35/14	1,0788
35/15	1,1142
35/16	1,0946
35/18	1,1021
35/19	1,0789
35/20	1,1313
36/1	1,1016
36/2	1,1313
36/4	1,1522
36/5	1,1676
36/6	1,1147
36/7	1,1400
36/8	1,1742
36/9	1,1320
36/11	1,1849
36/12	1,1773

Pflanze	Index
46/13	0,3462
46/14	0,3488
46/15	0,3559
46/16	0,3577
46/17	0,3599
46/18	0,3485
46/19	0,3576
46/20	0,3503
47/1	1,0754
47/2	1,1701
47/3	1,1551
47/4	1,1063
47/5	1,1002
47/11	1,1048
47/13	1,1130
47/14	1,1143
47/15	1,1053
47/16	1,1281
47/18	1,1206
47/19	1,1259
47/20	1,0658
48/1	1,0903
48/2	1,0722
48/3	1,1064
48/6	1,0757
48/8	1,0768
48/11	1,0742
48/12	1,0803
48/14	1,0995
48/15	1,0766
48/17	1,0699
48/19	1,1116
49/1	0,3616
49/2	0,3569
49/3	0,3599
49/4	0,3606

Pflanze	Index
12/11	1,1976
12/12	1,1579
12/13	1,1684
12/14	1,1366
12/15	1,1663
12/16	1,1590
12/17	1,1815
12/18	1,1371
12/19	1,1138
12/20	1,1620
13/3	0,6495
13/4	0,6462
13/6	0,6757
13/7	0,6398
13/8	0,6800
13/9	0,7003
13/10	0,6613
13/11	0,7080
13/12	0,6790
13/13	0,6702
13/14	0,6599
13/15	0,6860
13/16	0,6615
13/17	0,6666
13/19	0,6128
13/20	0,6582
14/2	0,3715
14/3	0,3760
14/4	0,3899
14/6	1,1414
14/7	1,1134
14/8	1,1752
14/10	1,1726
14/11	0,3753
14/12	0,3746

Pflanze	Index
23/10	0,6478
23/11	0,6148
23/12	0,6057
23/13	0,6116
23/14	0,5911
23/15	0,6607
23/16	0,6440
23/17	0,6434
23/18	0,6770
23/19	0,6268
23/20	0,6607
24/2	0,5814
24/3	0,6149
24/4	0,6072
24/7	0,6583
24/12	0,6368
24/13	0,6314
24/14	0,6582
24/15	0,5900
24/16	0,6226
24/17	0,6276
24/18	0,6127
24/19	0,6408
24/20	0,6409
25/1	0,6296
25/2	0,5994
25/3	0,6291
25/4	0,6358
25/7	0,6013
25/8	0,6249
25/9	0,6221
25/11	0,6378
25/12	0,6435
25/13	0,6221
25/14	0,6243

Pflanze	Index
36/13	1,1370
36/14	1,0904
36/16	1,1532
36/17	1,1557
36/18	1,1583
36/19	1,1371
36/20	1,1736
37/1	1,0851
37/4	1,0811
37/5	1,0634
37/8	1,0895
37/10	1,0690
37/11	1,1276
37/12	1,1271
37/13	1,0882
37/14	1,0882
37/15	1,0890
37/16	1,1219
37/17	1,0982
37/18	1,0732
37/19	1,1175
37/20	1,1291
38/1	1,1368
38/2	1,1175
38/3	1,0826
38/4	1,1685
38/6	1,1324
38/8	1,1784
38/11	1,0793
38/12	1,1524
38/13	1,0881
38/14	1,0756
38/15	1,1362
38/17	1,0987

Pflanze	Index
49/5	0,3540
49/6	0,3597
49/7	0,3564
49/8	0,3573
49/9	0,3560
49/10	0,3468
49/11	0,3516
49/12	0,3838
49/13	0,3574
49/14	0,3551
49/15	0,3540
49/16	0,3517
49/17	0,3554
49/18	0,3583
49/19	0,3641
49/20	0,3625
50/1	0,3611
50/4	0,3590
50/5	0,3573
50/6	0,3607
50/7	0,3533
50/8	0,3562
50/9	0,3609
50/10	0,3587
50/11	0,3581
50/12	0,3552
50/13	0,3593
50/14	0,3534
50/15	0,3629
50/16	0,3621
50/17	0,3555
50/18	0,3632
50/19	0,3548
50/20	0,3584

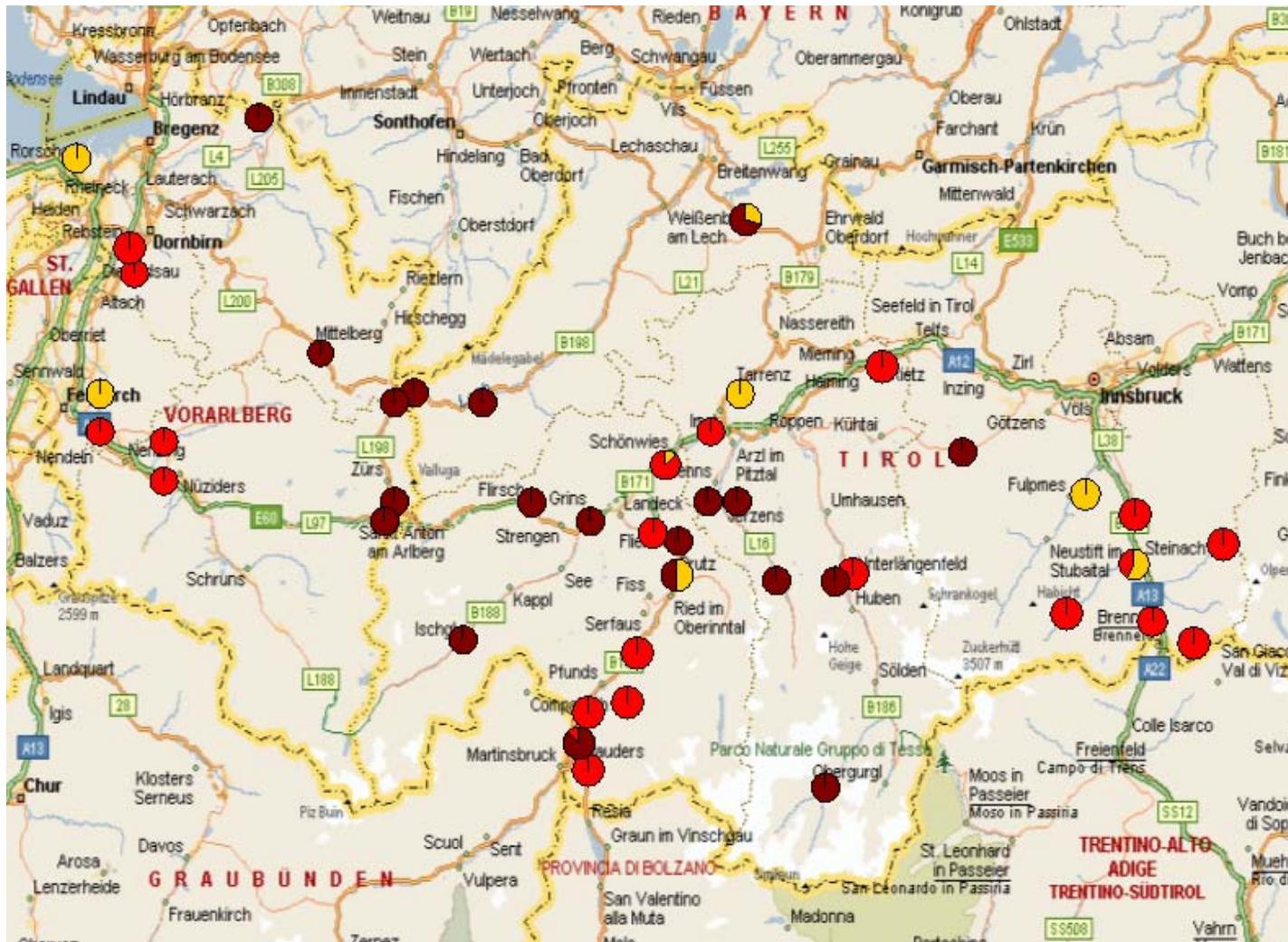


Abbildung 35: Karte mit den Ploidiestufen der Populationen (gelb = 2x, rot = 4x, dunkelrot = 8x) von Tirol und Vorarlberg

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sabine Bresser
Anschrift: Am Waldrand 14, 4863 Seewalchen am
Attersee
Geburtsdatum: 22. Juli 1987
Geburtsort: Vöcklabruck
Staatsbürgerschaft: österreichisch

Ausbildung:

1993 bis 1997 Volksschule in Seewalchen am Attersee
1997 bis 2005 Bundesgymnasium in Vöcklabruck
Juni 2005 Matura mit Auszeichnung bestanden
Oktober 2005 Beginn des Studiums der Pharmazie in
Wien
März 2011 Abschluss des Studiums der Pharmazie

Praktische Erfahrung:

August 2009 Praktikum in der Apotheke Schöndorf,
Vöcklabruck
Sommersemester 2010 Tutorium in der Lehrveranstaltung „Identitäts- und
Reinheitsprüfung biogener Arzneimittel“
August 2010 Praktikum in der Apotheke Schöndorf,
Vöcklabruck