



Gentiana sp.

Genetische und phänotypische Untersuchungen
im Jurapark Aargau

Semesterarbeit 2

von
Nora Vogel

Bachelorstudiengang 2015
Studienrichtung Umweltingenieurwesen
Abgabedatum: 28.03.2018

Fachkorrektorin: Marilena Palmisano,
ZHAW, Institut für Umwelt und natürliche Ressourcen
Campus Reidbach, CH-8820 Wädenswil

Abstract

Gentiana germanica is a vulnerable (VU) species on the Red List of threatened species in Switzerland. Based on a request from Jurapark Aargau, a *G. germanica* population near Staffelegg, CH, was analyzed for its genetic diversity and its suitability for seed propagation. Additionally, the molecular approach was evaluated for its adequacy to test the genetic diversity of isolated populations.

A total of 30 leaf samples were collected. The samples were split into four groups (GM, GL, GO and GR) based on their location on the field. The genetic diversity of the groups was tested with Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) primers. Using ten primers, 68 bands were generated, 92.65 % of which were variable among different samples. The GM group showed with 76.47 % the highest percentage of polymorphic loci, corresponding to 52 bands. The results showed a high genetic diversity within the investigated samples, although this could be more effectively estimated by comparing them with other *G. germanica* populations. No definite answer could be determined regarding seed propagation due to the lack of comparable values. A more appropriate result might be generated by means of a long-term field study.

Zusammenfassung

Gentiana germanica wird gemäss der nationalen Roten Liste als bedroht (Gefährdungsstufe VU) eingestuft. In dieser Arbeit wurde für den Jurapark Aargau eine *G. germanica* Population Nähe der Staffelegg, CH, genetisch auf ihre Diversität hin untersucht. Eine weitere Fragestellung war inwiefern sich die Population für die Samenvermehrung eignen könnte. Zudem wurde geprüft, wie sich die gewählte molekularbiologische Methode eignet um isolierte Populationen in ihrer Vielfalt zu erfassen.

Total wurden 30 Blätterproben von *G. germanica* gesammelt. Die Proben wurden gemäss ihrem Standort im Feld in vier Gruppen unterteilt: GM, GL, GO und GR. Mittels zehn *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) Markern wurde die genetische Diversität der Gruppen ermittelt. Insgesamt konnten 68 DNA-Fragmente mit den Primern generiert werden. Ein Anteil von 92,65 % polymorphen Loci (PL) wurde über alle Gruppen eruiert. Die Gruppe GM wies mit 52 DNA Fragmente und einem Anteil von 76.47 % PL die höchste genetische Diversität auf.

Die Resultate zeigen, dass die Population eine grosse genetische Variabilität aufweist. Für eine bessere Beurteilung der Variabilität, wäre eine Vergleichsstudie mit anderen *G. germanica* Populationen dienlich.

Zur Samenvermehrung lässt sich keine abschliessende Aussage machen, da keine Vergleichswerte zur Verfügung stehen. Einen Langzeitversuch mit weiteren Populationen und einem Monitoring der Populationsdynamik könnte zur Beantwortung dieser Fragestellung anvisiert werden.

Inhalt

1	Einleitung	4
2	Material und Methode.....	6
2.1	Probenahme Design.....	6
2.2	Genetische Untersuchungen	9
2.2.1	PCR Amplifikation der Internal Transcribed Spacer (ITS) Region von <i>Gentiana sp.</i>	9
2.2.2	Auswahl der ISSR Primer für die Analyse der <i>Gentiana sp.</i> Proben	9
2.2.3	ISSR Analyse für <i>Gentiana sp.</i>	10
2.2.4	Sequenzierung der <i>Gentiana sp.</i> Proben.....	10
2.3	Datenanalyse	10
3	Resultate	11
4	Diskussion.....	17
5	Ausblick.....	20
6	Literaturverzeichnis	21

1 Einleitung

Seit dem Jahre 2012 ist der Jurapark Aargau (JPA) ein regionaler Naturpark von nationaler Bedeutung. Er umfasst 241 m² und 27 Gemeinden des Kantons Aargau sowie eine Solothurner Gemeinde. Aufgrund seiner Lage ist der Naturpark ein wichtiger Wildtierkorridor und beinhaltet eine Vielfalt von Lebensräumen und Arten. Der JPA bietet unter anderem auch einen perfekten Lebensraum für Enziane.

Ziel des Naturparks ist die Erhaltung und Aufwertung der Natur- und Kulturschätze in der Region sowie eine nachhaltige Regionalentwicklung. (Jurapark Aargau, 2017)

Die Art *Gentiana germanica* (Deutscher Enzian) gehört zur Familie der Gentianaceae (Enziangewächse). In Lauber et al. (2012) wird *G. germanica* wie folgt beschrieben: Grundständige Blätter, rosettig, lanzettlich, Krone 5teilig, rotviolett, schlank-trichterförmige Röhre, im Grunde bärtig.

Sie wächst in der Schweiz auf kolliner bis subalpiner Stufe, in Wiesen und Weiden mit kalkreichem Boden. Die Pflanze ist diploid und ist in der Schweiz die verbreitetste Enzianart (Siehe Abbildung 1, Baltisberger, Nyffeler, & Widmer, 2013). Die Art gilt als selbstbefruchtend, für den Transport des Pollens zur Narbe sind jedoch Bestäuber notwendig. Als Bestäuber sind kleine Bienen und Dipteren tätig.

G. germanica ist eine ein- bis zweijährige Art (Jurapark Aargau, 2017). Im ersten Jahr bildet sie im Frühling eine Rosette und im zweiten Jahr blüht sie im Herbst (Fischer & Matthies, 1997). Die Individuenzahl fluktuiert von Jahr zu Jahr stark (Fischer & Matthies, 1997). Die Art ist geschützt und steht auf der Roten Liste, da ihr Vorkommen nur noch selten ist (Bornand et al., 2016).

Gemäss Luijten et al. (1998) minimiert sich die Samenproduktion bei von der Umwelt abgetrennten Pflanzen bis unter 30 % der ursprünglichen Samenproduktion. Deshalb ist es wichtig, dass ihre Erhaltung und Verbreitung im natürlichen Lebensraum gewährleistet werden kann.

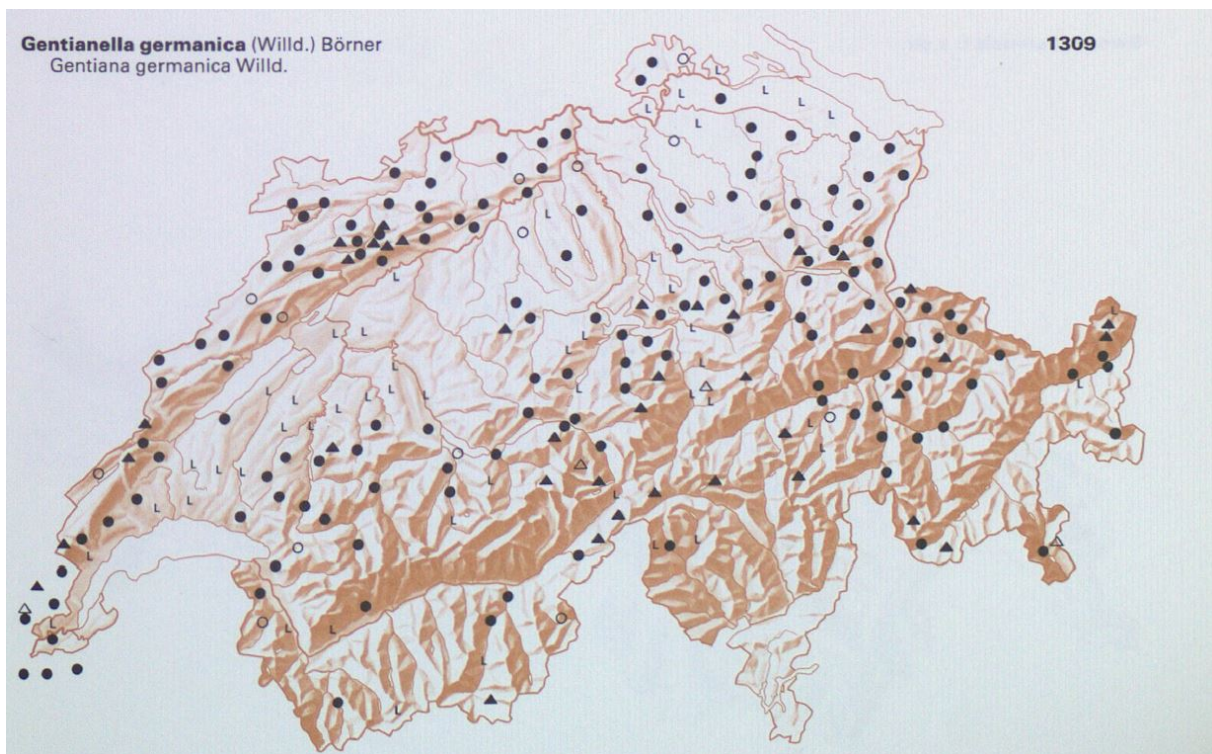


Abb. 1: Verbreitung der *G. germanica* in der Schweiz, Quelle: (Welten & Sutter, 1982)

Zur genetischen Untersuchung wird eine Polymerasen Kettenreaktion (PCR) mit *inter simple sequence repeat* (ISSR) durchgeführt. Die ISSR Marker zählen zusammen mit *random*

amplification of polymorphic DNA (RAPD) und *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP) zu den dominanten Markern. Im Gegensatz zu co-dominanten Markern, unterscheiden sie nicht zwischen Homo- und Heterozygoten. So, können sie bei Arten mit unbekannter DNA Sequenz angewendet werden (Ng & Tan, 2015). ISSR-PCR wurde bereits in diversen genetischen Untersuchungen von Enzianarten erfolgreich verwendet (Ge et al., 2005; González-López et al., 2014; He et al., 2011; Zhang et al., 2007; Zheng et al., 2011). Im Vergleich zu den anderen dominanten Markern ist ISSR kostengünstiger und in der Anwendung zeitsparender (Ng & Tan, 2015). Ausserdem können nahverwandte Arten effektiv unterschieden werden (Sucher et al., 2012). *Gentiana germanica* wurde noch kaum mittels ISSR getestet, so, dient die Publikation González-López et al. (2014) in welchem die nahverwandte Art *G. lutea* untersucht wurde, als Referenz.

Der JPA möchte die Enziane der untersuchten Fläche für die Samenvermehrung verwenden. Es war bis jetzt unklar wie vielfältig die *Gentiana germanica* Population auf der untersuchten Fläche ist. Die Frage ist, ob die Individuen genetisch und phänotypisch unterscheidbar sind und ob die Population über einen genügend grossen Genpool verfügt, um eine diverse *Gentiana* Population aufzuziehen. Ausserdem soll getestet werden, ob sich die molekularbiologisch gewählte Methode eignet, um isolierte Populationen in ihrer Vielfalt zu erfassen. Diesen Fragestellungen wird in der folgenden Arbeit nachgegangen.

2 Material und Methode

Die genetische Diversität der *G. germanica* Population soll mittels DNA Analyse bestimmt werden. Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien und Methoden dokumentiert.

2.1 Probenahme Design

Die Untersuchungsfläche liegt in der Gemeinde Thalheim unweit vom Staffeleggpas (Siehe Abbildung 2). Die exakten Koordinaten sind: 47°26'20.9"N 8°04'15.6"E. Das Untersuchungsgebiet wurde vom Jurapark Aargau, aufgrund der grossen Individuen Anzahl an *Gentiana* sp., ausgewählt. Beim Gebiet handelt es sich um eine Wiesenfläche umgeben von einem lichten Föhrenwald. Sie wird einmal jährlich ab Mitte August mit dem Balkenmäher gemäht. Die *Gentiana* Population konzentriert sich auf die Mitte der Wiesenfläche. Laut 'Agis' (2018) ist die potentielle natürliche Vegetation ein Orchideenbuchenwald (Siehe Abbildung 3).

Insgesamt wurden 30 Proben gesammelt. Um eine breite Variabilität zu erreichen, wurden sieben Proben im Zentrum der Fläche bestimmt und mit 3A bis 3G bezeichnet, die restlichen 23 Proben wurden zufällig im Randbereich des Untersuchungsgebietes gepflückt. Wenn die Samples weniger als 60 cm voneinander entfernt lagen, wurden diese mit einem Buchstaben ergänzt, Beispiel 2A, 2B. Die Samples wurden durchnummeriert und auf einem Plan eingetragen (Siehe Abbildung 4). Es wurde jeweils ein Blatt der Pflanze von Hand gepflückt und in ein Mikroröhrchen PP 0.5 ml gelegt. Das Mikroröhrchen wurde beschriftet und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Jedes Exemplar *G. germanica* wurde zur phänotypischen Unterscheidung fotografiert.

Zusätzlich wurden auf derselben Fläche drei Exemplare von *Gentiana ciliata* gesammelt.

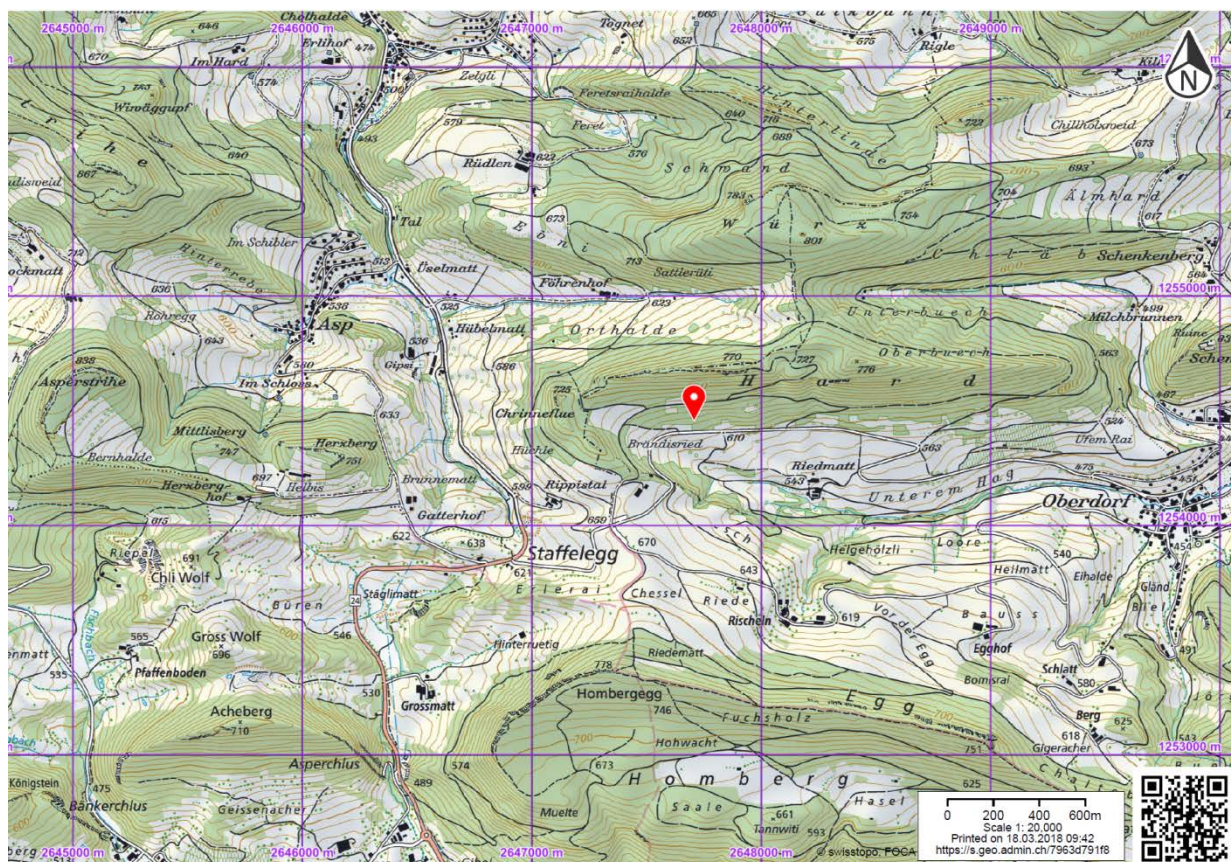


Abb. 2: Kartenausschnitt des Kantons Aargaus, Roter Pfeil = Standort der Probenahme, Quelle: maps.geo.admin.ch

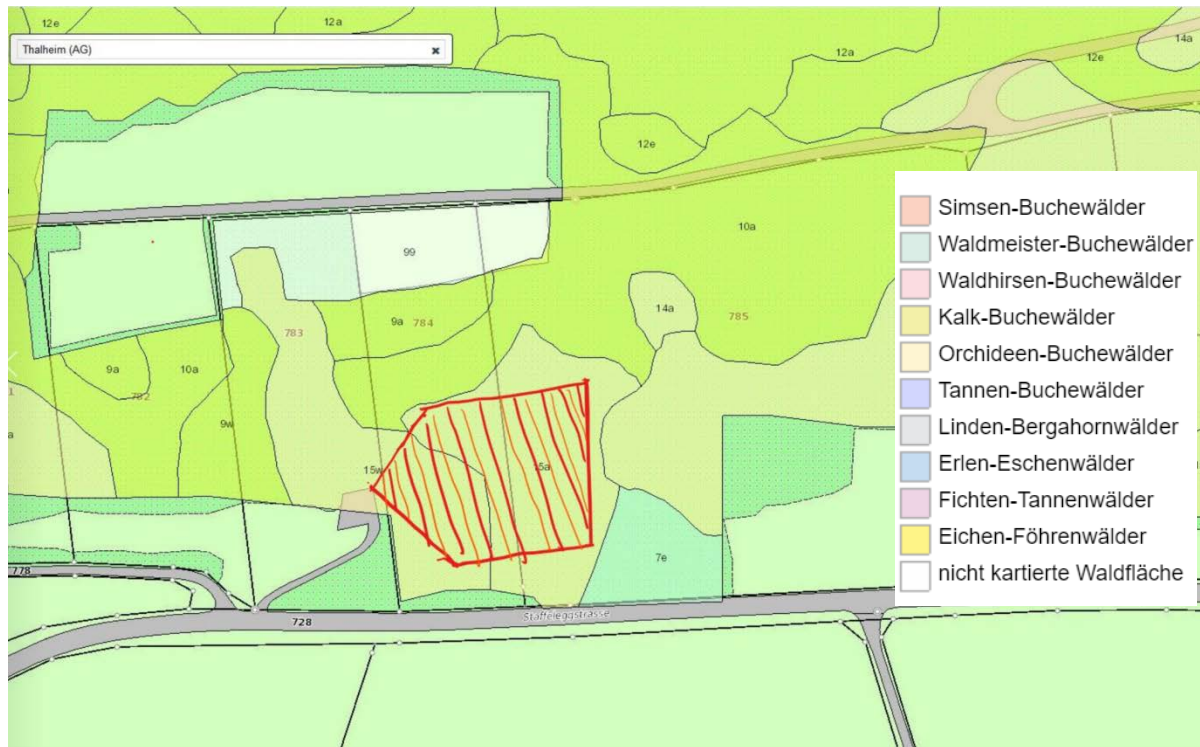


Abb. 3: Waldstandortkarte, rot-schraffiert: Untersuchte Fläche in der Waldzone Orchideen-Buchenwald
Quelle: <https://www.ag.ch/app/agisviewer4/v1/agisviewer.html>, modifiziert

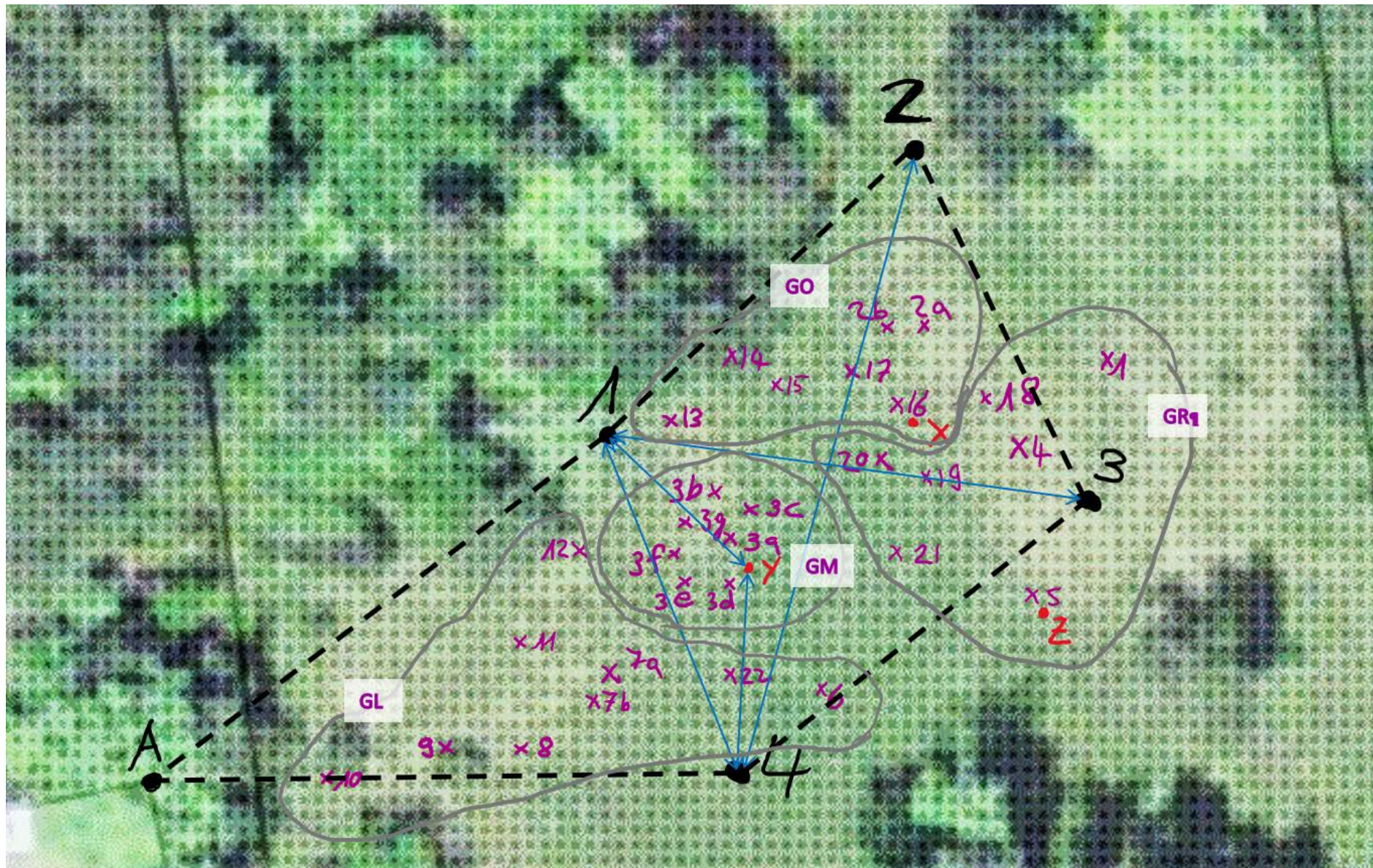


Abb. 4: Probedesign; GM, GL, GO & GR = Pflanzengruppen; A, 1, 2, 3, 4 (Schwarz) = Referenzpfosten; X, Y, Z = Weisse Pfosten im Feld, Legende Distanzen: A-1: 20 m; Y-1: 12.3 m; 2-3: 20 m; A-4: 23.25 m; Y-4: 10.1 m; 2-1: 20 m; 2-4: 29.1 m, 1-4: 16.3 m; 3-4: 20 m; 3-1: 24 m; Quelle: maps.google.com, modifiziert

2.2 Genetische Untersuchungen

Die Extraktion der DNA erfolgte gemäss der Anleitung im NucleoSpin® plant II Kit (Macherey-Nagel, 2014). Die einzige Abweichung bestand in der mechanischen DNA Extraktion, welche mit sterilen Stainless Steel Beads, 5mm (Qiagen, 69989), im Tissuelyser II (Qiagen, 1211230527) stattfand.

Die Lyse des Lysat erfolgte bei 65 °C während 1 h, anstatt der, in der Anleitung vorgegebenen 10 min. Das Eluieren der DNA erfolgte mit 50 µl Puffer PE. Das Lysat wurde während 5 min bei 65 °C inkubiert und danach während einer Minute bei 11'000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit demselben Puffer wiederholt.

Nach der Extraktion wurde die DNA-Konzentration mit dem UV-Vis Spektrometer Q5000 (Quawell, 106687) bestimmt.

2.2.1 PCR Amplifikation der Internal Transcribed Spacer (ITS) Region von *Gentiana sp.*

Die Polymerasen Kettenreaktion (PCR) wurde in 12.5 µl Reaktionsvolumen pipettiert. Der Reaktionsansatz enthielt 1 µl genomische DNA, 6.25 µl KAPA Robust Polymerase (Labgene, KK5705), je 0,625 µl 10 uM Primer Plant-ITS1_1f (GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG) und Plant-ITS2_1r (CCAAACAACCCGACTCGTAGACAGC, Aceto et al., 1999), sowie DNA-freies Wasser (Eurobio, 32739-0010). Es wurden 3 Proben für eine Vor-PCR ausgewählt.

Die drei Proben wurden mit je 10 µl DNA-freiem Wasser verdünnt. Für die Amplifikation der ITS Region wurde folgendes Programm benutzt: Initiale Denaturierungsphase bei 95 °C für 3 Minuten; gefolgt von 35 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden, Annealing bei 59 °C für 15 Sekunden, Elongation bei 72 °C für 60 Sekunden; und die finale Elongation bei 72 °C für 1 min.

Die PCR Produkte wurden auf ein 1.5% (w/v) GelRed -gefärbtes (Biotium, BIO41003) Agarose Gel (Conda Lab / Brunswick, 8016) in 1x TAE (Tris-acetate-EDTA) Puffer (Conda Lab / Brunswick, 8548) geladen. Vom Grössenmarker 1kb Plus Ladder (Invitrogen, 10787018) wurden 3 µl pipettiert und 7 µl PCR-Produkt.

Die PCR Produkte wurden während 30 min bei 80 V separiert. Die amplifizierten DNA Fragmente wurden mittels des Gelelektrophoresen Lesers Ebox VX5 (Vilber, 13200427) dokumentiert.

Das ITS Amplifikation Protokoll wurde für alle 33 DNA Proben einmal wiederholt. Dabei wurde für die Amplifikation der ITS Region folgendes geändert: Annealing bei 72°C für 30 Sekunden. Das Agarose Gel wurde mit 5 µl statt 7 µl DNA Template beladen. Die PCR Produkte wurden während 90 min bei 80 V separiert.

2.2.2 Auswahl der ISSR Primer für die Analyse der *Gentiana sp.* Proben

Aus dem UBC Primer Set #9 (Biotechnology Laborator, n.d.) wurden zehn Primer ausgewählt. Die Primer wurden aufgrund ihrer Benutzerhäufigkeit in den Papers (Ge et al., 2005; He et al., 2011; Zhang et al., 2007; Zheng et al., 2011) ausgewählt. Zudem wurde darauf geachtet, dass sich die Primer in ihren Sequenzen unterscheiden.

Die Polymerasen Kettenreaktion (PCR) wurde in 12.5 µl Reaktionsvolumen ausgeführt. Das Reaktionsvolumen enthielt 1 µl genomische DNA, 6.25 µl KAPA Robust Polymerase, 0.5 µl 50 µM des jeweiligen Primers, sowie DNA-freies Wasser (Eurobio, 32739-0010). Eine Vor-PCR wurde mit 3 ausgewählten Proben durchgeführt.

Für die Amplifikation der ISSR Region wurde folgendes Programm benutzt: Initiale Denaturierungsphase bei 95 °C für 3 Minuten; gefolgt von 35 Zyklen von 95 °C für 15 Sekunden, 55 °C für 15 Sekunden 72 °C für 60 Sekunden; und die finale Dehnung bei 72 °C für 1 min.

Die PCR Produkte wurden auf ein 1.5% (w/v) GelRed -gefärbtes (Biotium, BIO41003) Agarose Gel (Conda Lab / Brunswick, 8016) in 1x TAE (Tris-acetate-EDTA) Puffer (Conda Lab / Brunswick, 8548) geladen. Vom Grössenmarker 1kb Plus Ladder (Invitrogen, 10787018)

wurden 3 µl pipettiert und PCR-Produkt 5 µl. Die PCR Produkte wurden während 120 min bei 80 V separiert.

2.2.3 ISSR Analyse für *Gentiana sp.*

Mit den UBC Primern 807, 810, 811, 825, 827, 830, 836, 842, 857 und 866 wurde eine PCR, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, durchgeführt. Für die Amplifikation der ISSR Region wurde folgendes Programm benutzt: Initiale Denaturierungsphase bei 95 °C für 3 Minuten; gefolgt von 35 Zyklen von 95 °C für 15 Sekunden, 55 °C für 15 Sekunden 72 °C für 30 Sekunden; und die finale Dehnung bei 72 °C für 1 min.

Das Agarose Gel wurde wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, vorbereitet. Die PCR-Produkte wurden während 90-120 min bei 80 V separiert.

2.2.4 Sequenzierung der *Gentiana sp.* Proben

Sechs Proben wurden ausgewählt und eine ITS-PCR wurde wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Das Agarose Gel wurde wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, vorbereitet. Die PCR-Produkte wurden während 30 min bei 80 V separiert.

Die Sequenzierung der extrahierten genomischen DNA aus *Gentiana sp.* erfolgte über Microsynth (Balgach). Zur Bestimmung der Sequenz wurde der *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Algorithmus der Genbank vom *National Center für Biotechnology Information* (NCBI) herangezogen.

2.3 Datenanalyse

In der Analyse wurden nur Banden verwendet, welche deutlich erkennbar waren. Aufgrund des dominanten Charakters der ISSR Marker, wurde jede ISSR Bande als dualen Charakter behandelt und als sichtbar (1) oder nicht sichtbar (0) gewertet. Es wurde angenommen, dass jede Bande einen Phänotyp repräsentiert. Poppene Version 1.32 (Yeh et al., 1997) wurde verwendet, um die genetischen Diversitätsparameter der Population zu berechnen: Prozent der polymorphen Loci, beobachtete Anzahl von Allelen, effektive Anzahl von Allelen, Nei's genetischer Diversitätsindex und den Shannon Index. Die 30 Proben wurden in vier Gruppen unterteilt: GM, GL, GO und GR.

3 Resultate

Im folgenden Kapitel werden sämtliche Resultate der Untersuchungen dargelegt.

Die DNA Konzentration der Proben lag zwischen 2.58 ng / μ l (11A) und 96.12 ng / μ l (3B). Das Verhältnis 269/280 lag zwischen 1.08 (11A) und 1.74 (0C), das Verhältnis 260/230 lag zwischen 0.37 (11A) und 1.53 (0C) (Siehe Anhang).

Die ITS-Primer konnten erfolgreich alle DNA Fragmente der *Gentiana sp.* amplifizieren (Siehe Abbildung 5)

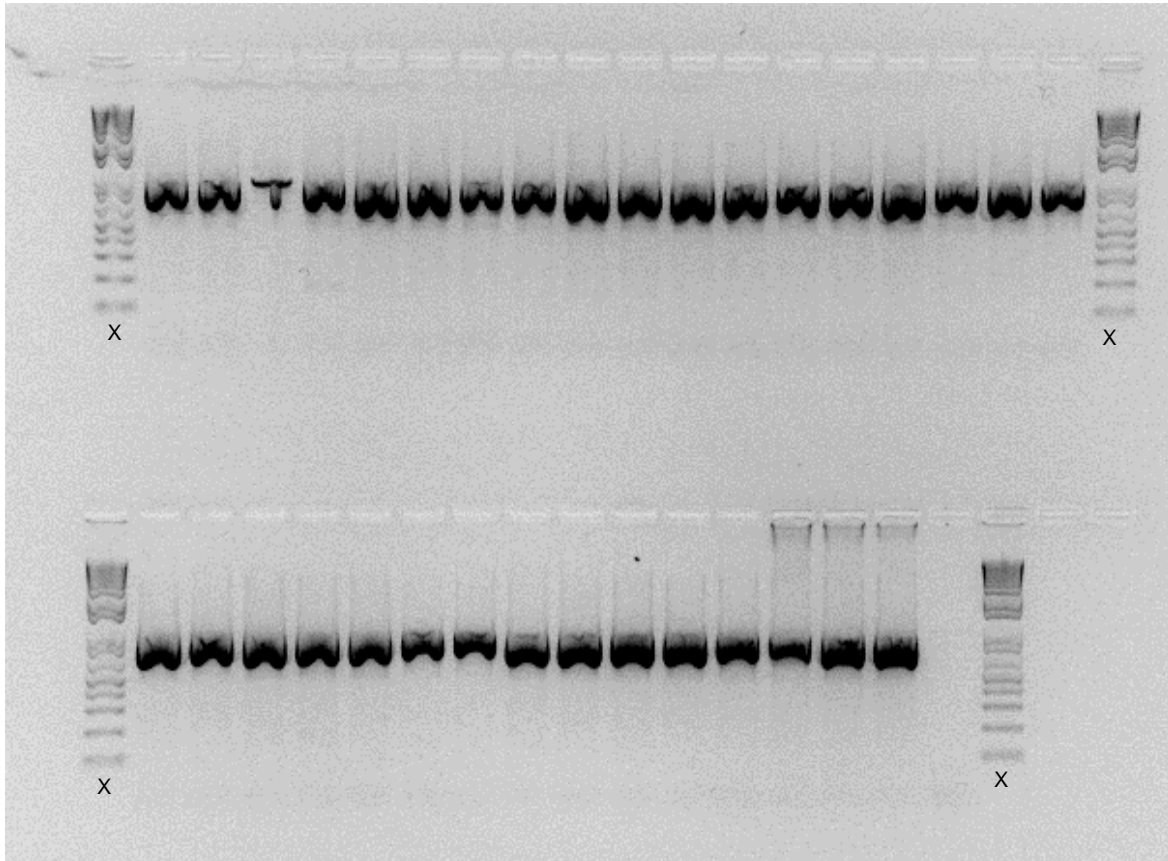


Abb. 5: Agarose Gelbild mit den Primern ITS1_1f und ITS2_1r zum Nachweis der genomischen DNA von *Gentiana sp.*; Die Spuren zeigen DNA-Fragmente in der Grösse von 900 bp. Die letzte Spur zeigt die Negativkontrolle. Die Spuren X zeigen den DNA-Grössenmarker 1 Kb Plus DNA Ladder.

Für die ISSR PCR wurden die Primer 807, 810, 811, 825, 827, 830, 836, 842, 857 und 866 aus dem UBC Primerset #9 (Biotechnology Laborator, n.d.) ausgewählt. Die Primer 825, 842 und 857 wurden nicht in die Datenanalyse miteinbezogen, da deren Negativkontrollen (NTC) positiv ausfielen. Als Beispiel einer positiven NTC ist in Abbildung 6 ein Teil des Agarose Gelbilds der PCR mit dem UBC Primer 842 dargestellt.

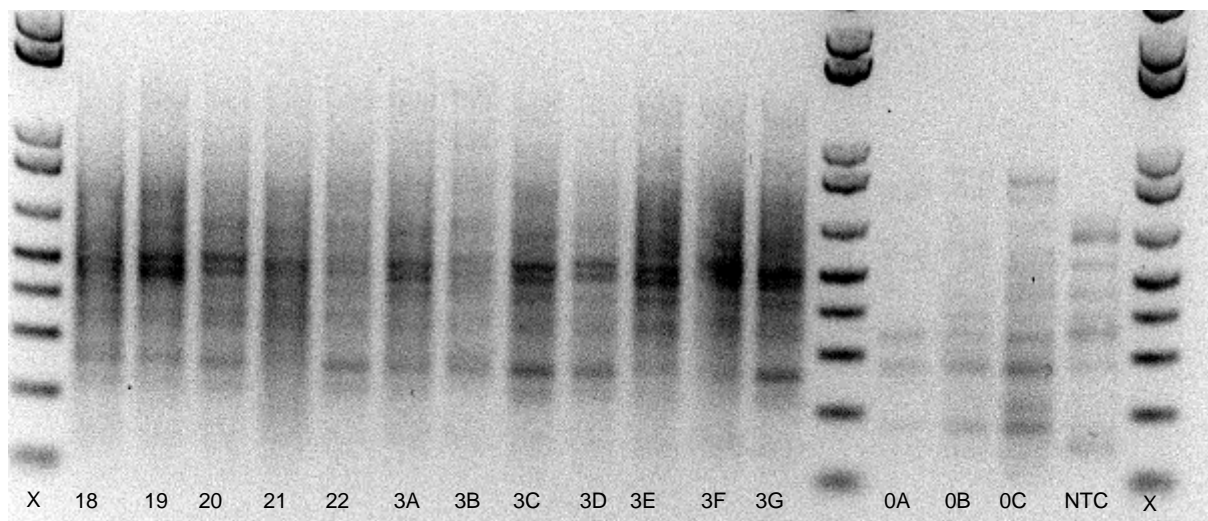


Abb. 6: Teil des Agarose Gelbilds der PCR mit dem UBC Primer 842, 18-0C = DNA Fragmente der Proben, die letzte Spur zeigt die Negativkontrolle (NTC) und die Spuren X den DNA-Größenmarker 1 Kb Plus DNA Ladder.

Die restlichen sieben Primer ergaben für die *G. germanica* Proben 68 deutliche Banden mit fünf bis 15 Banden pro Primer. In Tabelle 1 ist die Anzahl Banden pro Primer sowie dessen Sequenz dargestellt. Dabei schwankte der prozentuale Anteil polymorpher Loci pro Gruppe zwischen 60.29 % und 76.47 %, wie in Tabelle 2 ersichtlich.

Abbildung 7 zeigt das Agarose Gelbild des Primers 807 repräsentativ für die Anzahl Banden pro Primer.

Tab. 1: UBC Primer, deren Sequenz und # Banden pro Primer

Primer	Sequenz	Anzahl Banden
807	(AG) ₈ T	9
810	(GA) ₈ T	15
811	(GA) ₈ C	10
827	(AC) ₈ G	12
830	(TG) ₈ G	5
836	(AG) ₈ (CT)A	9
866	(CTC) ₆	8

Tab. 2: Anzahl und prozentualer Anteil polymorpher Loci pro Gruppe; GM = Gruppe Mitte, GL = Gruppe links, GO = Gruppe oben; GR = Gruppe rechts; # PL = Anzahl polymorpher Loci, PA-PL = prozentualer Anteil polymorpher Loci

Gruppe	# PL	PA-PL [%]
GM	52	76.47
GL	48	79.59
GO	44	64.71
GR	41	60.29

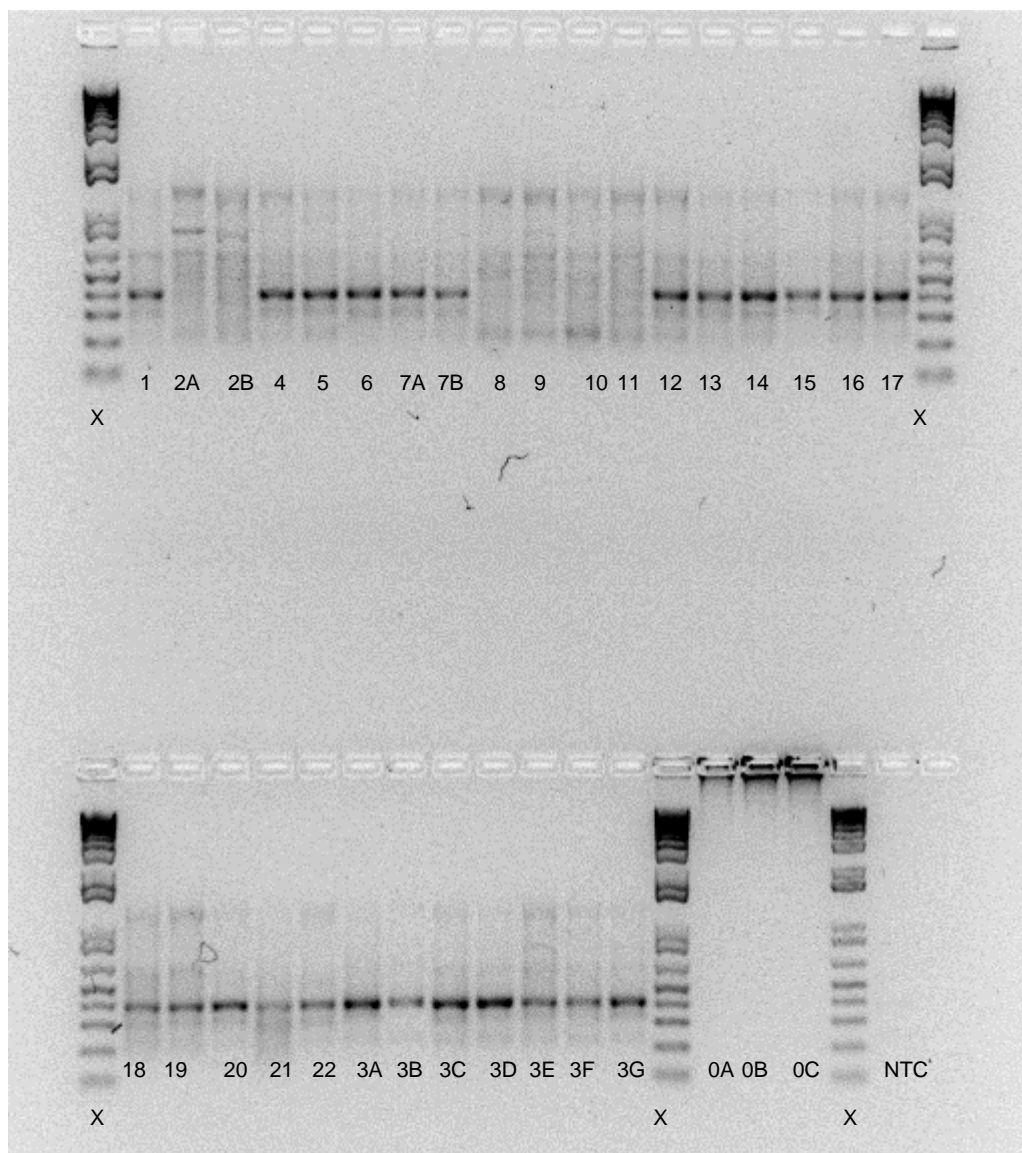


Abb. 7: Agarose Gelbild der PCR mit dem UBC-Primer 807, Die Spuren 1-0C zeigen DNA-Fragmente im Bereich 400 – 3000 bp. Die Spuren X zeigen die Grössenmarker 1 Kb Plus DNA Ladder und die letzte Spur die Negativkontrolle (NTC).

Für die Sequenzierung wurden Proben der *G. germanica* (3B,16, 8) sowie Proben der *G. ciliata* (0A-C) ausgewählt.

Die BLAST Analyse der Proben 0A, 0B und 0C ergab mit 99.43 % eine Übereinstimmung mit *Gentianopsis ciliata* (AJ580551). Die BLAST Analyse der Proben 3B und 16 ergab mit 96.01 % bzw. 98.71 % eine Übereinstimmung mit *Gentianella austriaca* (AJ580580). Die BLAST Analyse der Probe 8 ergab mit 99.15 % eine Übereinstimmung mit *Gentianella germanica* (AJ580564).

Die BLAST Analyse ergab mit 99.2 % bzw. 98.8 % eine Übereinstimmung der *G. austriaca* mit *G. germanica*, dabei waren sechs bzw. neun Nukleotide auf 749 Basenpaare verschieden. Bei den zwei *G. austriaca* ergab die BLAST Analyse mit 99.33 % eine Übereinstimmung, fünf Nukleotide auf 749 Basenpaare waren verschieden (Siehe Tabelle 3).

Tab. 3: ITS Sequenzierungsergebnisse; dargestellt ist die Übereinstimmung der vorliegenden Proben untereinander, orange: Identität in %, grün: Anzahl unterschiedliche Nukleotide auf 749 Basenpaare

	<i>Gentianella austriaca</i>	<i>Gentianella austriaca</i>	<i>Gentiana germanica</i>	<i>Gentiana ciliata</i>
<i>Gentianella austriaca</i>		5	6	51
<i>Gentianella austriaca</i>	99.33		9	54
<i>Gentiana germanica</i>	99.20	98.80		50
<i>Gentiana ciliata</i>	93.19	92.79	93.32	

In Tabelle 4 ist die Aufteilung der Proben in 4 Gruppen dargestellt, GM steht für Gruppe Mitte, GL für Gruppe links, GO für Gruppe oben und GR für Gruppe rechts.

Tab. 4: Aufteilung der Proben in 4 Gruppen: GM = Gruppe Mitte
GL = Gruppe links, GO = Gruppe oben, GR = Gruppe rechts

Gruppe	Proben
GM	3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G
GL	6, 7A, 7B, 8, 9, 10, 11, 12, 22
GO	13, 14, 15, 16, 17, 2A, 2B
GR	1, 4, 5, 18, 19, 20, 21

Unter der Voraussetzung des Hardy-Weinberg Equilibriums, lag die mittlere genetische Diversität zwischen 0.2014 (GR) und 0.2703 (GM) und der Shannon Index zwischen 0.3054 (GR) und 0.4037 (GM).

Die mittlere effektive Populationsgröße (Ne) schwankte von 1.3359 bis 1.4650 wobei die Gruppe GR die tiefsten und GM die höchsten Werte aufwies.

Die genetische Diversität nach Nei (H) variierte zwischen 0 und 0.4984, dabei hatten bei der Gruppe GM 53.47 % der DNA-Banden einen Wert über 0.35. GO lag mit einem Prozentsatz von 31.71 % der Bandenwerte über 0.35 am tiefsten. Die mittlere Gruppe GM weist die höchste genetische Diversität auf (PA-PL 72.47 %, I 0.4037, H 0.2703 mit 53.47 % der Werte über 0.35).

In den Tabellen 5 - 11 werden die Anzahl effektiver Allele (Ne), Nei's genetische Diversität (H) und der Shannon's Information Index (I) pro Primer und Locus dargestellt, unterteilt in die 4 Gruppen.

Tab. 5: UBC Primer 807: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von *G. germanica*, DFbp: DNA Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index

807 DFbp	Ne				H				I			
	GM	GL	GO	GR	GM	GL	GO	GR	GM	GL	GO	GR
1	1.5848	1.0000	1.8876	1.8254	0.3690	0.0000	0.4702	0.4522	0.5557	0.0000	0.6631	0.6445
2	1.1592	1.0000	1.0000	1.1592	0.1374	0.0000	0.0000	0.1374	0.2643	0.0000	0.0000	0.2643
3	1.3545	1.4279	1.3545	1.0000	0.2617	0.2997	0.2617	0.0000	0.4310	0.4767	0.4310	0.0000
4	1.8876	1.8000	1.8876	1.9905	0.4702	0.4444	0.4702	0.4976	0.6631	0.6365	0.6631	0.6908
5	1.0000	1.2631	1.0000	1.0000	0.0000	0.2083	0.0000	0.0000	0.0000	0.3631	0.0000	0.0000
6	1.0000	1.1209	1.1592	1.0000	0.0000	0.1078	0.1374	0.0000	0.0000	0.2192	0.2643	0.0000
7	1.0000	1.9935	1.0000	1.0000	0.0000	0.4984	0.0000	0.0000	0.0000	0.6915	0.0000	0.0000
8	1.9905	1.8000	1.9905	1.0000	0.4976	0.4444	0.4976	0.0000	0.6908	0.6365	0.6908	0.0000
9	1.0000	1.9533	1.5848	1.8254	0.0000	0.4880	0.3690	0.4522	0.0000	0.6811	0.5557	0.6445

Tab. 6: UBC Primer 810: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von *G. germanica*, DFbp: DNA Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index

810 DFbp	Ne				H				I			
	GM	GL	GO	GR	GM	GL	GO	GR	GM	GL	GO	GR
1	1.3545	1.9533	1.3545	1.1592	0.2617	0.4880	0.2617	0.1374	0.4310	0.4880	0.4310	0.2643
2	1.0000	1.1209	1.8254	1.1592	0.0000	0.1078	0.4522	0.1374	0.0000	0.1078	0.6445	0.2643
3	1.1592	1.9533	1.8254	1.5848	0.1374	0.4880	0.4522	0.3690	0.2643	0.4880	0.6445	0.5557
4	1.1592	1.9935	1.0000	1.3545	0.1374	0.4984	0.0000	0.2617	0.2643	0.4984	0.0000	0.4310
5	1.9905	1.6119	1.1592	1.5848	0.4976	0.3796	0.1374	0.3690	0.6908	0.3796	0.2643	0.5557
6	1.8254	1.9533	1.1592	1.5848	0.4522	0.4880	0.1374	0.3690	0.6445	0.4880	0.2643	0.5557
7	1.1592	1.6119	1.3545	1.8254	0.1374	0.3796	0.2617	0.4522	0.2643	0.3796	0.4310	0.6445
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
9	1.8876	1.0000	1.0000	1.0000	0.4702	0.0000	0.0000	0.0000	0.6631	0.0000	0.0000	0.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.1592	0.0000	0.0000	0.0000	0.1374	0.0000	0.0000	0.0000	0.2643
11	1.8876	1.0000	1.0000	1.0000	0.4702	0.0000	0.0000	0.0000	0.6631	0.0000	0.0000	0.0000
12	1.8876	1.8000	1.8876	1.0000	0.4702	0.4444	0.4702	0.0000	0.6631	0.4444	0.6631	0.0000
13	1.1592	1.0000	1.0000	1.0000	0.1374	0.0000	0.0000	0.0000	0.2643	0.0000	0.0000	0.0000
14	1.9905	1.9533	1.9905	1.0000	0.4976	0.4880	0.4976	0.0000	0.6908	0.4880	0.6908	0.0000
15	1.1592	1.1209	1.3545	1.1592	0.1374	0.1078	0.2617	0.1374	0.2643	0.1078	0.4310	0.2643

Tab. 7: UBC Primer 811: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von *G. germanica*, DFbp: DNA Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index

811 DFbp	Ne				H				I			
	GM	GL	GO	GR	GM	GL	GO	GR	GM	GL	GO	GR
1	1.1592	1.1209	1.0000	1.0000	0.1374	0.1078	0.0000	0.0000	0.2643	0.2192	0.0000	0.0000
2	1.1592	1.2631	1.0000	1.1592	0.1374	0.2083	0.0000	0.1374	0.2643	0.3631	0.0000	0.2643
3	1.0000	1.9533	1.5848	1.5848	0.0000	0.4880	0.3690	0.3690	0.0000	0.6811	0.5557	0.5557
4	1.8876	1.0000	1.0000	1.0000	0.4702	0.0000	0.0000	0.0000	0.6631	0.0000	0.0000	0.0000
5	1.8254	1.4279	1.3545	1.0000	0.4522	0.2997	0.2617	0.0000	0.6445	0.4767	0.4310	0.0000
6	1.0000	1.0000	1.1592	1.0000	0.0000	0.0000	0.1374	0.0000	0.0000	0.0000	0.2643	0.0000
7	1.5848	1.8000	1.0000	1.0000	0.3690	0.4444	0.0000	0.0000	0.5557	0.6365	0.0000	0.0000
8	1.8254	1.8000	1.9905	1.9905	0.4522	0.4444	0.4976	0.4976	0.6445	0.6365	0.6908	0.6908
9	1.8876	1.0000	1.0000	1.0000	0.4702	0.0000	0.0000	0.0000	0.6631	0.0000	0.0000	0.0000
10	1.0000	1.2631	1.3545	1.1592	0.0000	0.2083	0.2617	0.1374	0.0000	0.3631	0.4310	0.2643

Tab. 8: UBC Primer 827: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von *G. germanica*, DFbp: DNA Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index

827 DFbp	Ne				H				I			
	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO
1	1.3545	1.0000	1.8254	1.3545	0.2617	0.0000	0.4522	0.2617	0.4310	0.0000	0.6445	0.4310
2	1.8254	1.4279	1.1592	1.8876	0.4522	0.2997	0.1374	0.4702	0.6445	0.4767	0.2643	0.6631
3	1.8254	1.9935	1.0000	1.3545	0.4522	0.4984	0.0000	0.2617	0.6445	0.6915	0.0000	0.4310
4	1.8254	1.9935	1.9905	1.8876	0.4522	0.4984	0.4976	0.4702	0.6445	0.6915	0.6908	0.6631
5	1.5848	1.2631	1.0000	1.3545	0.3690	0.2083	0.0000	0.2617	0.5557	0.3631	0.0000	0.4310
6	1.5848	1.9533	1.1592	1.8254	0.3690	0.4880	0.1374	0.4522	0.5557	0.6811	0.2643	0.6445
7	1.8876	1.0000	1.8876	1.0000	0.4702	0.0000	0.4702	0.0000	0.6631	0.0000	0.6631	0.0000
8	1.1592	1.2631	1.1592	1.5848	0.1374	0.2083	0.1374	0.3690	0.2643	0.3631	0.2643	0.5557
9	1.8876	1.0000	1.0000	1.0000	0.4702	0.0000	0.0000	0.0000	0.6631	0.0000	0.0000	0.0000
10	1.8876	1.8000	1.8876	1.8876	0.4702	0.4444	0.4702	0.4702	0.6631	0.6365	0.6631	0.6631
11	1.3545	1.6119	1.1592	1.5848	0.2617	0.3796	0.1374	0.3690	0.4310	0.5674	0.2643	0.5557
12	1.3545	1.8000	1.5848	1.9905	0.2617	0.4444	0.3690	0.4976	0.4310	0.6365	0.5557	0.6908

Tab. 9: UBC Primer 830: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von *G. germanica*, DFbp: DNA Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index

830	Ne				H				I			
	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO
DFbp 1	1.8254	1.4279	1.0000	1.3545	0.4522	0.2997	0.0000	0.2617	0.6445	0.4767	0.0000	0.4310
2	1.8254	1.4279	1.1592	1.3545	0.4522	0.2997	0.1374	0.2617	0.6445	0.4767	0.2643	0.4310
3	1.8876	1.8000	1.0000	1.0000	0.4702	0.4444	0.0000	0.0000	0.6631	0.6365	0.0000	0.0000
4	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	1.3545	1.6119	1.5848	1.3545	0.2617	0.3796	0.3690	0.2617	0.4310	0.5674	0.5557	0.4310

Tab. 10: UBC Primer 836: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von *G. germanica*, DFbp: DNA Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index

836	Ne				H				I			
	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO
DFbp 1	1.8876	1.0000	1.9905	1.8876	0.4702	0.0000	0.4976	0.4702	0.6631	0.0000	0.6908	0.6631
2	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	1.3545	1.4279	1.1592	1.5848	0.2617	0.2997	0.1374	0.3690	0.4310	0.4767	0.2643	0.5557
5	1.8254	1.4279	1.5848	1.1592	0.4522	0.2997	0.3690	0.1374	0.6445	0.4767	0.5557	0.2643
6	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
7	1.1592	1.2631	1.1592	1.1592	0.1374	0.2083	0.1374	0.1374	0.2643	0.3631	0.2643	0.2643
8	1.0000	1.0000	1.8876	1.8876	0.0000	0.0000	0.4702	0.4702	0.0000	0.0000	0.6631	0.6631
9	1.8876	1.2631	1.8254	1.8254	0.4702	0.2083	0.4522	0.4522	0.6631	0.3631	0.6445	0.6445

Tab. 11: UBC Primer 866: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von *G. germanica*; DFbp: DNA Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index

866	Ne				H				I			
	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO	GM	GL	GO
DFbp 1	1.5848	1.1209	1.3545	1.0000	0.3690	0.1078	0.2617	0.0000	0.5557	0.2192	0.4310	0.0000
2	1.0000	1.9935	1.0000	1.8876	0.0000	0.4984	0.0000	0.4702	0.0000	0.6915	0.0000	0.6631
3	1.8254	1.4279	1.3545	1.5848	0.4522	0.2997	0.2617	0.3690	0.6445	0.4767	0.4310	0.5557
4	1.1592	1.2631	1.5848	1.3545	0.1374	0.2083	0.3690	0.2617	0.2643	0.3631	0.5557	0.4310
5	1.8254	1.9935	1.9905	1.0000	0.4522	0.4984	0.4976	0.0000	0.6445	0.6915	0.6908	0.0000
6	1.3545	1.4279	1.5848	1.5848	0.2617	0.2997	0.3690	0.3690	0.4310	0.4767	0.5557	0.5557
7	1.8254	1.0000	1.1592	1.0000	0.4522	0.0000	0.1374	0.0000	0.6445	0.0000	0.2643	0.0000
8	1.5848	1.6119	1.3545	1.8876	0.3690	0.3796	0.2617	0.4702	0.5557	0.5674	0.4310	0.6631

Aufgrund des vorhandenen Fotomaterials war eine phänotypische Untersuchung nicht möglich.

4 Diskussion

In der Literatur (Fischer & Matthies, 1998; Oostermeijer et al., 2002; Runge, 1963; Url, 1962) und auf Taxonomie-Datenbanken ('Info Flora', n.d.; 'The International Plant Names Index', 2015; 'The Plant List', 2013; Milcent, 2011) werden verschiedene Gattungsnamen wie *Gentianella*, *Gentiana* und *Gentianopsis* verwendet. Laut 'Info Flora' (n.d.) und Milcent (2011) handelt es sich bei diesen Gattungsnamen um Synonyme bzw. Basionyme. Diese sind im Verlaufe der Zeit und mit der Entwicklung genetischer Untersuchungsmethoden entstanden.

Eine genetische Untersuchungsmethode ist die Sequenzierung mittels dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Algorithmus der Genbank vom *National Center für Biotechnology Information* (NCBI). Die BLAST Analyse der Probe 8 ergab mit 99.15 % eine Übereinstimmung mit *Gentianella germanica* (AJ580564), es handelt sich also um *Gentiana germanica*. Neben der Übereinstimmung mit der Datenbank ergab die BLAST Analyse eine 99.2 % bzw. 98.8 % Übereinstimmung der *G. germanica* Probe und der *G. austriaca* Proben. Die geringen genetischen Unterschiede lassen auf dieselbe Art schliessen. In der Literatur werden diese Arten jedoch als zwei Arten angesehen (Greimler & Dobeš, 2000; Wettstein, 1896). Die vermeintliche Übereinstimmung liegt am gewählten Locus (ITS). Dieser Locus eignet sich nicht für die Unterscheidung nahverwandter Arten (Hollingsworth et al., 2011).

Bezüglich der Diversität innerhalb der Population ergaben die Resultate eine grosse Diversität. Bei allen Pflanzengruppen beträgt der Anteil an polymorphen Loci mehr als 60 %. Ebenso zeigten die Resultate des genetischen Diversitätsindex (H) im Mittel eine grosse Diversität. Durchschnittlich 46.88 % der Banden pro Primer ergaben H-Werte über 0.35, was im Vergleich zu González-López et al. (2014) auf eine hohe Diversität hinweist.

Analog zu González-López (2014), wurden 33 *Gentiana sp.* mittels *inter-simple sequence repeat* (ISSR) analysiert. ISSR Marker wurden erfolgreich in botanischen Studien und Diversitätsstudien der Gattung *Gentiana/Gentianella* verwendet (Ge et al., 2005; Zhang et al., 2007; Zheng et al., 2011).

ISSR Marker zählen zu den dominanten Markern, welche im Gegensatz zu co-dominanten Markern nicht zwischen Homo- und Heterozygot unterscheiden. Dies ist ein Vorteil, wenn die DNA-Sequenz der zu untersuchenden Art unbekannt ist (Ng & Tan, 2015). Ausserdem produzieren die dominanten Marker einen geringeren genetischen Informationsgehalt pro Locus im Vergleich zu Co-dominanten, was durch eine höhere Bandenproduktion bei der Anwendung von dominanten Markern kompensiert wird (Cavers et al., 2005; Kremer et al., 2005; Nybom, 2004). Dominante Marker eignen sich nur für eine erste Beurteilung der genetischen Diversität einer Art und deren DNA-Sequenzbestimmung.

Generiert ein genetischer Marker Multi-Locus-Daten, so ist dieser Marker geeignet um die genetische Diversität eines Organismus zu bestimmen (Anne, 2006). Im Beispiel der Mikrosatelliten, welche über das ganze Genom verteilt sind, zeigt sich eine hohe Variabilität und Reproduzierbarkeit. Die Methode der *random amplification of polymorphic DNA* (RAPD) wird aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit nicht empfohlen (Arif et al., 2009). Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die Methode der *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP). Hierbei wird jedoch ein Restriktionsverdau vor der PCR durchgeführt, dies führt zu einem höheren Zeit- und Kostenaufwand (Anne, 2006). Bei der ISSR-PCR ist eine hohe Reproduzierbarkeit aufgrund der Länge des Markers und deren Lokalisation im Genom gegeben (Souframanien & Gopalakrishna, 2004) und eignet sich für die genetische Variations- und Diversitätsuntersuchung, das Fingerprinting und die Phylogenetik (Iruela et al., 2002; Shafiei-Astani et al., 2015; Shen et al., 2006; Wang et al., 2012).

Aufgrund ihrer Länge und der Lokalisation im Genom, sowie den Vorzügen gegenüber anderen dominanten Markern, eignen sich die ISSR Marker, um die genetische Variabilität der *G. germanica* Population auf der untersuchten Fläche abzuschätzen.

Für die Auswertung der Banden dominanter Marker, gibt es verschiedene Indexe. Einer davon ist Nei's genetischer Diversitätsindex. Dieser Index eignet sich um die Variabilität auf genetischer Ebene, sowohl innerhalb einer Population als auch zwischen den Populationen zu berechnen. Der Index benutzt zwei zufällig gewählte Allele, unabhängig der Anzahl vorkommender Allelen. (Nei, 1973)

Ein anderer Index ist der *Shannon Information Index*, welcher analog zu Nei's genetischer Diversitätsindex funktioniert. Der Shannon Index wurde allerdings ursprünglich entwickelt um den Informationsgehalt im Ingenieurwesen zu berechnen und er steht in keiner Verbindung mit der Genetik. Deshalb ist, laut Nei (1975), die Interpretation der absoluten Werte in Bezug auf genetisches Material unklar. Somit, wurde nur Nei's genetischer Diversitätsindex zur Interpretation der Diversität der Population verwendet.

Bei der Beurteilung der Diversität einer Population sollte berücksichtigt werden, dass der dominante Charakter der Primer einige Probleme mit sich bringt. Die Auswertung dominanter Marker erfolgt durch die Anzahl absenter Banden und basiert auf dem Hardy-Weinberg Equilibrium. Letzteres ist nicht direkt messbar und könnte von ISSR Loci gestört werden. Die Anzahl absenter Banden stellt ebenfalls ein Unsicherheitsfaktor dar, da diese Absenzen nicht immer durch homozygot-rezessive Genotypen hervorgerufen werden, sondern auch andere Ursachen haben können. Diese Unsicherheitsfaktoren können zu einer überschätzten Verwandtschaft zwischen den Individuen führen. (Black, 1997)

Laut Black (1997), eignen sich dominante Marker zur Bestimmung der genetischen Diversität auf Artniveau oder tiefer. In der vorliegenden Arbeit werden auf Populationsebene genetische Vergleiche gemacht und somit eignet sich die Methode ISSR-PCR um die genetische Diversität der *Gentiana*-Population zu untersuchen.

Die Resultate ergaben eine hohe Diversität innerhalb der einzelnen Gruppen. Eine Aussage über die Samenvermehrung lässt sich nicht abschliessend machen, da es keine Vergleichswerte zu den erhaltenen Resultaten gibt. Zur besseren Beurteilung sollten weitere Populationen untersucht und die Werte der Untersuchungen verglichen werden.

Trotz der hohen genetischen Variabilität, lässt sich schwer abschätzen, wie sich die Population entwickeln wird und wie sie auf veränderte Umweltbedingungen reagieren wird.

Der Standort der Population hat gezeigt, dass es sich eindeutig um eine isolierte Population, ohne genetischen Austausch, handelt. Kery et al. (2000) erwähnt, dass die Fortpflanzungsrate bei *G. lutea* bei einer Populationsgrösse von weniger als 500 Individuen sinkt. Durch die reduzierte Fortpflanzungsleistung besteht das Risiko, dass sich die Population aufgrund fehlender genetischer Vielfalt nur schwer oder gar nicht an klimatische Veränderungen anpassen kann und somit am jetzigen Standort ausstirbt. Habitatsfragmentierungen und genetischer Drift führen zu solcher genetischer Isolation einer Population (Hogbin & Peakall, 1999; Oostermeijer et al., 1994; Schaal et al., 1998; Young et al., 1996). Der Hauptgrund für diese Fragmentierung stellt der Mensch dar (Qian et al., 2013). Umso wichtiger ist die Erhaltung seltener und isolierter Arten sowie die Verknüpfungen verschiedener Populationen. Kleine Populationen sind nicht attraktiv für Bestäuber, durch die Förderung attraktiver Blütenpflanzen, kann eine erhöhte Befruchtungsrate und somit eine grössere genetische Variabilität innerhalb der Population sichergestellt werden (Fischer & Matthies, 1998).

Die phänotypische Beurteilung der *Gentiana sp.* konnte wegen schlechtem bzw. unzureichendem Bildmaterial nicht erfolgen. Ein Grund dafür ist die Planung der Semesterarbeit, bzw. der Zeitpunkt der Feldforschung. Da Enziane bereits Anfang September blühen und mit der Semesterarbeit erst Mitte September begonnen werden konnte war der Zeitpunkt der Probennahme im Feld bereits etwas spät im Jahr und dem entsprechend waren einige Individuen schon verblüht.

Bei der Auswertung der ISSR-PCR im Labor fielen die Negativkontrollen der UBC Primern 825, 842 und 857 positiv aus. Es konnte eine Verunreinigung der Primer resp. bei der Primerverdünnung nicht ausgeschlossen werden, deshalb wurden diese Primer bei der Datenanalyse aussen vorgelesen.

Eine andere Änderung der Vorgehensweise betraf die Amplifizierung der PCR Produkte und die Beladung des Agarose Gels. Bei der Amplifizierung wurde die Elongationszeit von 60 Sek. auf 30 Sek. geändert, da nach dem ersten Durchgang festgestellt wurde, dass die DNA Fragmente im Bereich 300 bis 2000 bp zu liegen kamen und somit 30 Sekunden bei der Elongation ausreichen. Die erste Beladung des Agarose Gels mit ITS amplifizierten DNA-Fragmenten zeigte, dass das Agarose Gel mit 7 µl Template überladen war und die Banden nicht mehr unterscheidbar waren. Die ITS- PCR vor der ISSR-PCR diene als Testdurchlauf um die Qualität des genetischen Materials der Proben festzustellen. Es wurde angenommen, dass, wenn die ITS-PCR erfolgreich die DNA amplifizieren kann, dann funktioniert es auch mit den ISSR Markern.

5 Ausblick

Um eine fundierte Aussage über die genetische Diversität der *Gentiana*-Population zu machen, sind genetische Untersuchungen an weiteren Populationen derselben Art nötig. Eine Population mit mehr als 500 Individuen, welche als genetisch divers gilt (Kery et al., 2000), wäre für die Einschätzung der genetischen Diversität der untersuchten Population, hilfreich. Wie die Population auf fremdes Saatgut reagiert, ist schwer abzuschätzen (Fischer & Matthies, 1997; Waser & Price, 1994). Dabei darf man die *Outbreeding Depression* nicht ausser Acht lassen, welche bereits bei mehreren *Gentiana* Arten festgestellt wurde (Fischer & Matthies, 1997; Price & Waser, 1979; Reinartz, 1995; Templeton, 1986; Waser, 1993).

Die beste Methode um dies zu überprüfen, wäre ein mehrjähriger Feldversuch mit Samenvermehrung verschiedener Populationen und einem Monitoring der Populationsdynamik. Die Vermutung liegt nahe, dass bei einem Standort mit ähnlicher Exposition, Bodenbeschaffung und Pflanzenzusammensetzung eine Aussaat erfolgreich sein könnte.

Neben der Samenvermehrung sind die Umgebung, die Exposition sowie die Bewirtschaftung wichtige Faktoren, die über das Fortbestehen der Population bestimmen. Die genetische Untersuchung von weiteren *Gentiana*-Populationen im Jurapark, generiert Informationen inwiefern sich die Samenvermehrung resp. der Samentransfer eignen könnte. Wenn ein Samentransfer sich als erfolgreich herausstellt, könnte so der Genpool der einzelnen Populationen vergrößert werden und die Anpassungsfähigkeit der Population, beispielsweise an klimatische Veränderungen, erhöht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aceto, S., Caputo, P., Cozzolino, S., Gaudio, L., & Moretti, A. (1999). Phylogeny and Evolution of Orchis and Allied Genera Based on ITS DNA Variation: Morphological Gaps and Molecular Continuity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(1), 67–76.
- Agis. (2018). Retrieved 21 March 2018, from <https://www.ag.ch/app/agisviewer4/v1/agisviewer.html>
- Anne, C. (2006). Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, 127(1–3), 101–120.
- Arif, M., Zaidi, N. W., Singh, Y. P., Haq, Q. M. R., & Singh, U. S. (2009). A Comparative Analysis of ISSR and RAPD Markers for Study of Genetic Diversity in Shisham. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(4), 488–495.
- Baltisberger, M., Nyffeler, R., & Widmer, A. (2013). *Systematische Botanik: einheimische Farn- und Samenpflanzen* (4. Auflage). Zürich: vdf Hochschulverlag an der ETH Zürich.
- Biotechnology Laborator (Ed.). (n.d.). UBC Primer Set #9. University of British Columbia, Canada. Retrieved from <https://www.scribd.com/doc/23812434/UBC-Primer-Set>
- Black, W. (1997). *Explanation of RAPDPLOT 3.0*. Documentation file distributed with the RAPDPLOT program.
- Bornand, C., Eggenberg, S., Gygax, A., Juillerat, P., Jutzi, M., Möhl, A., ... Santiago, H. (2016). Rote Liste Gefässpflanzen: gefährdete Arten der Schweiz. Umwelt-Vollzug.
- Cavers, S., Degen, B., Caron, H., Lemes, M. R., Margis, R., Salgueiro, F., & Lowe, A. J. (2005). Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity*, 95(4), 281.
- Fischer, M., & Matthies, D. (1997). Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, 84(12), 1685–1692.
- Fischer, M., & Matthies, D. (1998). Effects of population size on performance in the rare plant *Gentianella germanica*. *Journal of Ecology*, 86(2), 195–204.

- Ge, X.-J., Zhang, L.-B., Yuan, Y.-M., Hao, G., & Chiang, T.-Y. (2005). Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). *Biodiversity & Conservation*, 14(4), 849–861. <https://doi.org/10.1007/s10531-004-0655-6>
- González-López, O., Polanco, C., György, Z., Pedryc, A., & Casquero, P. A. (2014). Genetic Variation of the Endangered *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (Gentianaceae) in Populations from the Northwest Iberian Peninsula. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 10052–10066. <https://doi.org/10.3390/ijms150610052>
- Greimler, J., & Dobeš, C. (2000). High genetic diversity and differentiation in relict lowland populations of *Gentianella austriaca* (A. and J. Kern.) Holub (Gentianaceae). *Plant Biology*, 2(06), 628–637.
- He, T., Yang, L., & Zhao, Z. (2011). Embryogenesis of *Gentiana straminea* and assessment of genetic stability of regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *African Journal of Biotechnology*, 10(39), 7604–7610.
- Hogbin, P. M., & Peakall, R. (1999). Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered plant *Zieria prostrata*. *Conservation Biology*, 13(3), 514–522.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode (Plant DNA Barcoding). *PLoS ONE*, 6(5), e19254.
- Info Flora. (n.d.). Retrieved 17 March 2018, from <https://www.infoflora.ch/>
- Iruela, M., Rubio, J., Cubero, J. I., Gil, J., & Millan, T. (2002). Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4), 643–651.
- Jurapark Aargau. (2017). Die grüne Schatzkammer. Retrieved 17 March 2018, from <http://jurapark-aargau.ch/home.html>
- Kery, M., Matthies, D., & Spillmann, H.-H. (2000). Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea*. *Journal of Ecology*, 88(1), 17–30.

- Kremer, A., Caron, H., Cavers, S., Colpaert, N., Gheysen, G., Gribel, R., ... Navarro, C. (2005). Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. *Heredity*, 95(4), 274.
- Lauber, K., Wagner, G., & Gyga, A. (2012). *Flora Helvetica* (5. Auflage). Bern: Haupt Verlag.
- Luijten, S. H., Oostermeijer, J. G. B., Ellis-Adam, A. C., & den Nijs, H. C. (1998). Reproductive biology of the rare biennial *Gentianella germanica* compared with other gentians of different life history. *Acta Botanica Neerlandica*, 47(3), 325–336.
- Macherey-Nagel. (2014). Genomic DNA from Plant - NucleoSpin Plant II. Retrieved from <http://www.mn-net.com>
- Milcent, J.-P. (2011). *Gentianopsis ciliata* (L.) Ma [Taxonomische Datenbank]. Retrieved 22 March 2018, from <http://www.tela-botanica.org/site:accueil>
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321–3323.
- Nei, M. (1975). *Molecular population genetics and evolution*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Sci J*, 9(1), 30–39.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13(5), 1143–1155.
- Oostermeijer, J. G. B., Luijten, S. H., Ellis-Adam, A. C., & Den Nijs, J. C. M. (2002). Future prospects for the rare, late-flowering *Gentianella germanica* and *Gentianopsis ciliata* in Dutch nutrient-poor calcareous grasslands. *Biological Conservation*, 104(3), 339–350.
- Oostermeijer, J. G. B., Van Eijck, M. W., & Den Nijs, J. C. M. (1994). Offspring fitness in relation to population size and genetic variation in the rare perennial plant species *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Oecologia*, 97(3), 289–296.
- Price, M. V., & Waser, N. M. (1979). Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. *Nature*, 277(5694), 294.

- Qian, X., Wang, C., & Tian, M. (2013). Genetic diversity and population differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a rare and endemic orchid in China. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20399–20413.
- Reinartz, J. A. (1995). Planting State-Listed Endangered and Threatened Plants. *Conservation Biology*, 9(4), 771–781.
- Runge, F. (1963). Die Artmächtigkeitsschwankungen in einem nordwestdeutschen Enzian-Zwenkenrasen. *Vegetatio*, 11(4), 237–240.
- Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T., & Smith, W. A. (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7(4), 465–474.
- Shafiei-Astani, B., Ong, A. H. K., Valdiani, A., Tan, S. G., Yien, C. Y. S., Ahmady, F., ... Kuar, T. (2015). Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): Comparative potentials of SSRs versus ISSRs. *Gene*, 571(1), 107–116.
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Li, X., ... Chu, B. (2006). Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(3), 420–422.
- Souframanien, J., & Gopalakrishna, T. (2004). A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(8), 1687–1693. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1797-3>
- Sucher, N. J., Hennell, J. R., & Carles, M. C. (Eds.). (2012). *Plant DNA fingerprinting and barcoding: methods and protocols*. New York, NY: Humana Press.
- Templeton, A. R. (1986). Coadaptation and outbreeding depression. *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*, 105–116.
- The International Plant Names Index. (2015). Retrieved 22 March 2018, from <http://www.ipni.org/>
- The Plant List. (2013). Retrieved 22 March 2018, from <http://www.theplantlist.org/>

- Url, W. (1962). Permeabilitätsversuche an Stengelepidermiszellen von *Gentiana germanica* und *Gentiana ciliata* (mit einer Studie über Anordnung von Permeabilitätsreihen). *S.B. Öst. Akad. Wiss., Math.-nat. Kl. Abt. I*(171), 259–287.
- Wang, X., Yang, R., Feng, S., Hou, X., Zhang, Y., Li, Y., & Ren, Y. (2012). Genetic variation in *Rheum palmatum* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR markers. *Plos One*, 7(12), e51667.
- Waser, N. M. (1993). Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding*, 173–199.
- Waser, N. M., & Price, M. V. (1994). Crossing-distance effects in *Delphinium nelsonii*: outbreeding and inbreeding depression in progeny fitness. *Evolution*, 48(3), 842–852.
- Wettstein, R. (1896). *Die europäischen Arten der Gattung Gentiana aus der Section Endotricha Froel. und ihr entwicklungsgeschichtlicher Zusammenhang*. Wien: C.Gerold.
- Yeh, F. C., Yang, R., & Boyle, T. (1997). Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Bel.J.Bot.*
- Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413–418.
- Zhang, X.-L., Yuan, Y.-M., & Ge, X.-J. (2007). Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W. W. Smith and *G. striolata* T. N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154(2), 225–232. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00635.x>
- Zheng, P., Zhang, K., & Wang, Z. (2011). Genetic diversity and gentiopicroside content of four *Gentiana* species in China revealed by ISSR and HPLC methods. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4), 704–710.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Verbreitung der *G. germanica* in der Schweiz, Quelle: (Welten & Sutter, 1982)..... 4
- Abb. 2: Kartenausschnitt des Kanton Aargaus, Roter Pfeil = Standort der Probenahme, Quelle: maps.geo.admin.ch 6
- Abb. 3: Waldstandortkarte, rot-schraffiert: Untersuchte Fläche in der Waldzone Orchideen-Buchenwald Quelle: <https://www.ag.ch/app/agisviewer4/v1/agisviewer.html>, modifiziert 7
- Abb. 4: Probedesign; GM, GL, GO & GR = Pflanzengruppen; A, 1, 2, 3, 4 (Schwarz) = Referenzpfosten; X, Y, Z = Weisse Pfosten im Feld, Legende Distanzen: A-1: 20 m; Y-1: 12.3 m; 2-3: 20 m; A-4: 23.25 m; Y-4: 10.1 m; 2-1: 20 m; 2-4: 29.1 m, 1-4: 16.3 m; 3-4: 20 m; 3-1: 24 m; Quelle: maps.google.com, modifiziert..... 8
- Abb. 5: Agarose Gelbild mit den Primern ITS1_1f und ITS2_1r zum Nachweis der genomischen DNA von *Gentiana* sp.; Die Spuren zeigen DNA-Fragmente in der Grösse von 900 bp. Die letzte Spur zeigt die Negativkontrolle. Die Spuren X zeigen den DNA-Grössenmarker 1 Kb Plus DNA Ladder. 11
- Abb. 6: Teil des Agarose Gelbilds der PCR mit dem UBC Primer 842, 18-0C = DNA Fragmente der Proben, die letzte Spur zeigt die Negativkontrolle (NTC) und die Spuren X den DNA-Grössenmarker 1 Kb Plus DNA Ladder. 12
- Abb. 7: Agarose Gelbild der PCR mit dem UBC-Primer 807, Die Spuren 1-0C zeigen DNA-Fragmente im Bereich 400 – 3000 bp. Die Spuren X zeigen die Grössenmarker 1 Kb Plus DNA Ladder und die letzte Spur die Negativkontrolle (NTC). 13

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: UBC Primer, deren Sequenz und # Banden pro Primer	12
Tab. 2: Anzahl und prozentualer Anteil polymorpher Loci pro Gruppe; GM = Gruppe Mitte, GL = Gruppe links, GO = Gruppe oben; GR = Gruppe rechts; # PL = Anzahl polymorpher Loci, PA-PL = prozentualer Anteil polymorpher Loci	12
Tab. 3: ITS Sequenzierungsergebnisse; Dargestellt ist die Übereinstimmung der vorliegenden Proben untereinander,	14
Tab. 4: Aufteilung der Proben in 4 Gruppen: GM = Gruppe Mitte	14
Tab. 5: UBC Primer 807: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von <i>G. germanica</i> , DFbp: DNA-Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index	14
Tab. 6: UBC Primer 810: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von <i>G. germanica</i> , DFbp: DNA-Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index	15
Tab. 7: UBC Primer 811: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von <i>G. germanica</i> , DFbp: DNA-Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index	15
Tab. 8: UBC Primer 827: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von <i>G. germanica</i> , DFbp: DNA-Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index	15
Tab. 9: UBC Primer 830: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von <i>G. germanica</i> , DFbp: DNA-Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index	16
Tab. 10: UBC Primer 836: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von <i>G. germanica</i> , DFbp: DNA-Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index	16
Tab. 11: UBC Primer 866: Vergleich der 4 Pflanzengruppen von <i>G. germanica</i> ; DFbp: DNA-Fragment pro Bandengröße, Ne: Anzahl effektive Allele; H: Nei's genetische Diversität; I: Shannon's Information Index	16

Anhang

1.1 Rohdaten der DNA Konzentrations-Messung mit dem UV-Vis Spektrometer Q5000 (Quawell, 106687)

No.	Sample ID	ID#	Sample Type	SW (nm)	SW Abs	260Abs 10mm	280Abs 10mm	260/280	260/230	Conc. (Ng/ul)
1	3A	1	dsDNA	260	0.073	0.073	0.055	1.33	0.59	3.67
2	3B	1	dsDNA	260	1.922	1.922	1.371	1.4	0.72	96.12
3	3C	1	dsDNA	260	0.236	0.236	0.143	1.66	0.88	11.8
4	3D	1	dsDNA	260	0.115	0.115	0.072	1.6	0.72	5.74
5	3E	1	dsDNA	260	0.588	0.588	0.404	1.46	0.65	29.39
6	3F	1	dsDNA	260	1.025	1.025	0.694	1.48	0.66	51.26
7	3G	1	dsDNA	260	0.137	0.137	0.103	1.33	0.55	6.86
8	0A	1	dsDNA	260	1.068	1.068	0.62	1.72	1.39	53.41
9	0B	1	dsDNA	260	0.928	0.928	0.555	1.67	1.36	46.42
10	0C	1	dsDNA	260	0.858	0.858	0.493	1.74	1.53	42.9
11	1A	1	dsDNA	260	0.797	0.797	0.555	1.44	0.7	39.83
12	2A	1	dsDNA	260	0.38	0.38	0.24	1.59	1.4	19.01
13	2B	1	dsDNA	260	0.244	0.244	0.161	1.52	0.78	12.2
14	4A	1	dsDNA	260	0.14	0.14	0.108	1.3	0.65	7.01
15	5A	1	dsDNA	260	0.099	0.099	0.072	1.38	0.59	4.95
16	6A	1	dsDNA	260	1.027	1.027	0.707	1.45	0.77	51.37
17	7A	1	dsDNA	260	0.176	0.176	0.116	1.52	0.79	8.81
18	7B	1	dsDNA	260	0.379	0.379	0.237	1.6	1.19	18.93
19	8A	1	dsDNA	260	0.222	0.222	0.135	1.65	1.09	11.08
20	9A	1	dsDNA	260	0.102	0.102	0.085	1.2	0.51	5.09
21	10A	1	dsDNA	260	1.319	1.319	1.105	1.19	0.82	65.96
22	11A	1	dsDNA	260	0.052	0.052	0.048	1.08	0.37	2.58
23	12A	1	dsDNA	260	0.151	0.151	0.102	1.48	0.89	7.57
24	13A	1	dsDNA	260	0.251	0.251	0.173	1.45	0.57	12.57
25	14A	1	dsDNA	260	1.677	1.677	1.181	1.42	0.75	83.84
26	15A	1	dsDNA	260	0.337	0.337	0.22	1.53	0.61	16.86
27	16A	1	dsDNA	260	0.272	0.272	0.201	1.35	0.68	13.58
28	17A	1	dsDNA	260	0.178	0.178	0.129	1.38	0.64	8.9

29	18A	1	dsDNA	260	1.073	1.073	0.702	1.53	0.71	53.64
30	19A	1	dsDNA	260	0.568	0.568	0.382	1.49	0.62	28.4
31	20A	1	dsDNA	260	0.456	0.456	0.308	1.48	0.53	22.81
32	21A	1	dsDNA	260	0.153	0.153	0.099	1.55	0.69	7.66
33	22A	1	dsDNA	260	0.544	0.544	0.369	1.47	0.66	27.2

1.2 Rohdaten der Agarose Gelbilder Auswertung, 0= nicht sichtbar, 1= sichtbar

	807.1	807.2	807.3	807.4	807.5	807.6	807.7	807.8	807.9	810.1	810.1	810.1	810.1	810.1	810.1	810.1	810.2	810.3	810.4	810.5	810.6	810.7	810.8	810.9	
										1	2	3	4	5	6										
1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	
2A	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
2B	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
4	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
6	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
7A	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
7B	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
8	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
9	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
10	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
11	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
12	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0
13	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
14	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
16	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
17	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
18	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
19	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
20	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0

21	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
22	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
3A	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3B	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
3C	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
3D	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
3E	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
3F	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
3G	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
0A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0

	811.1										827.1	827.1	827.1											
	811.1	1	811.2	811.3	811.4	811.5	811.6	811.7	811.8	811.9	827.1	1	2	3	827.2	827.3	827.4	827.5	827.6	827.7	827.8	827.9	830.1	830.2
1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0
2A	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
2B	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
4	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
5	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
6	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
7A	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
7B	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
8	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
10	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
11	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
12	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
13	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
14	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
15	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
16	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0

17	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
18	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
19	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
20	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
21	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
22	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
3A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
3B	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0
3C	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
3D	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0
3E	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
3F	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1
3G	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
0A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0B	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
0C	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0

	830.3	830.4	830.5	836.1	836.2	836.3	836.4	836.5	836.6	836.7	836.8	836.9	866.1	866.2	866.3	866.4	866.5	866.6	866.7	866.8
1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
2A	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
2B	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
4	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
5	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
6	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
7A	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
7B	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
9	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0
10	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0
11	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
12	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
13	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0

14	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
15	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
16	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
17	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
18	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
19	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
20	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
21	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
22	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3A	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
3B	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
3C	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
3D	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
3E	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
3F	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
3G	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
0A	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0B	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0C	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

1.3 Alignment der Sequenzierung der extrahierten genomischen DNA aus *Gentiana sp.* über Microsynth (Balgach)

