

Selektion von *Rhododendron* - Teilbereich III – ARC seibersdorf research

Erfassung der genetischen Vielfalt mittels Mikrosatelliten

Kurzfassung

Zielstellung des Projekts

Von den beiden heimischen *Rhododendron* Wildarten *R. ferrugineum* und *R. hirsutum* gibt es unseres Wissens noch keine in vitro vermehrten Klone. Der Einsatz der in vitro Vermehrung erlaubt eine rasche Selektion und Massenvermehrung praxisrelevanter Klone, die im Gartenbau und in der Begrünung eingesetzt werden können.

Im Vordergrund dieses Projektes steht die in vitro Etablierung und gezielte Selektion von *Rhododendron ferrugineum*, *R. hirsutum* und *R. x intermedium* Klonen aus umfassenden Naturstandorten und postglazialen Reliktbeständen (Österreich, Deutschland, Schweiz, Slowenien).

Es erfolgt somit eine Selektion von *Rhododendron* -Klonen die an bestimmte Boden- und Klimaverhältnisse angepasst sind und dadurch gezielter eingesetzt werden können.

Praxisrelevante Klone werden in der Folge beim Europäischen Sortenschutzamt angemeldet.

Die Erfassung der existierenden genetischen Vielfalt in den natürlichen Beständen - als auch die Zertifizierung spezieller *Rhododendron* -Klone - erfolgt mittels der gut reproduzierbaren Mikrosatellitenanalyse (SSRs). Für die beiden heimischen *Rhododendron* -Wildarten *R. ferrugineum* und *R. hirsutum* werden daher spezielle SSR Primer entwickelt.

1. Arbeitbericht:

1.1 Material

Von der HBLVA Schönbrunn wurde Pflanzenmaterial von 11 unterschiedlichen Naturstandorten und 12 in vitro Kulturen bereitgestellt. Das Material wurde in Form von Blattproben von insgesamt 305 Einzelpflanzen und Sämlinge der Probe 22/1 zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Aufstellung des Untersuchungsmaterials

Standort	Spezies	Kennung	Probenanzahl
Populationen			
A/ Gutenstein-Klostertal	<i>h</i>	19	22
A/ Kirchkogel-Predigtstuhl	<i>f</i>	20	20
SLO/ Trnovski gozd	<i>h</i>	21	21
A/ Patscherkofel	<i>f</i>	22	22
A/ Karwendel-Seegrube	<i>h</i>	23	24
A/Kalkkögel-Saile	<i>f</i>	24	20
A/ Axamer Lizum	<i>i/f</i>	25	20
I/Viote-Trient		26	20
A/ Großes Walsertal	<i>h</i>	28	20
A/ Fernpass-Blindsee	<i>f/i</i>	29	20
CH/Versam-Station, Chur	<i>h</i>	30	20
Samenherkünfte			
Churfürsten (CH)	<i>f</i>	1	4
Bot. Garten Frankfurt (D)	<i>f</i>	2	4
Pinzgau (A)	<i>f</i>	3	3
Pongau (A)	<i>f</i>	5	5
Tennengau (A)	<i>h</i>	8	5
Karawanken (A)	<i>h</i>	11	3
Churfürsten (CH)	<i>h</i>	12	8
Koralpe (A)	<i>f</i>	13	8
Karnische Alpen (A)	<i>f</i>	14	6
Karnische Alpen (A)	<i>h</i>	15	5
Steiner Alpen (SLO)	<i>h</i>	16	5
Trnovski gozd-Predmeja (SLO)	<i>h</i>	17	20
Sämlinge			
A/ Patscherkofel	<i>f</i>	22 Individ.1	50
Summe			355

* Legende: *f*: *R. ferrugineum*; *h*: *R. hirsutum*; *i*: *R. x intermedium*
17=21; Herkunft Trnovski gozd-Predmeja (SLO) wurde zweimal beprobt.

DNA-Präparationen:

Das oben beschriebene Pflanzenmaterial wurde zur Isolierung von gesamtgenomischer DNA herangezogen. Die DNA Präparationen, wurden mittels DNeasy Plant Minikit (Qiagen) durchgeführt. Diese DNA liegt in jeweils 2 Fraktionen á 100µl für nachfolgende populationsanalytische Untersuchungen vor. Agarosegeleanalysen dokumentieren die DNA Qualität (Abbildung 1).

Die für die Markerentwicklung benötigte DNA wurde ebenfalls mittels DNeasy Plant Minikit (Qiagen) gewonnen, da andere Protokolle nicht zum Erfolg führten. Zur Herstellung einer ausreichenden DNA-Menge wurden Proben unterschiedlicher Standorte gepoolt.

Abbildung 1

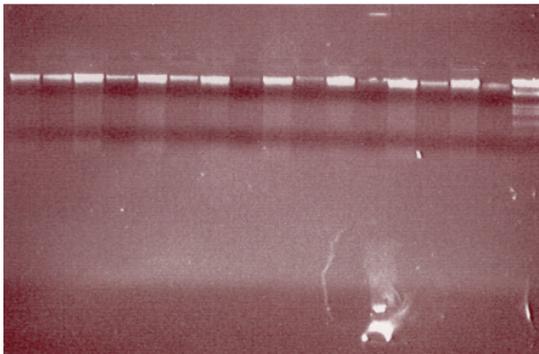


Abb.1 zeigt ein 0,8%, EtBr gefärbtes Agarosegel. In den Lanes 1-16 sind jeweils die erste und zweite Fraktion der DNA-Präparation eines einzelnen Individuums zu sehen. In Lane 17 (re. Aussen) befindet sich der Längenmarker.

2. Microsatellitenanalysen (SSR):

Um auf dem schnellsten Wege zu aussagekräftigen Daten über die genetische Vielfalt in Österreichischen *Rhododendron* -Populationen zu kommen, wurden 2 Ansätze gewählt:

1. Testung heterologer Microsatelliten-Primer, die für *R.metternichii* entwickelt wurden (Lit: K. Naito, Y Isagi, N. Nakagoshi; Isolation and characterisation of microsatellites of *R.metternichii* Sieb. et Zucc.Var. *hondoense* Nakai; 1998; Molecular Ecology, 7, 925-931)
2. Neuentwicklung von *R. ferrugineum* und *R. hirsutum* spezifischen -Microsatellitenprimern

1.2 Ad1) Testung heterologer Primer

Die folgenden sieben, aus der Literatur bekannten Primerpaare (Tabelle 2) wurden auf ihre Einsetzbarkeit bei *R. hirsutum*, *R. x intermedium* und *R. ferrugineum* getestet. Kriterien bei der Testung waren: der Erhalt eines PCR Produktes, sowie dessen Reinheit, und in weiterer Folge die Variabilität der SSR Region in den zu untersuchenden Populationen.

Zur Optimierung der Amplifikations -Konditionen wurden Gradienten -PCRs durchgeführt. Im Zuge dieser Arbeiten stellte sich heraus, dass nur 3 der 7 Primerpaare für die weiterführenden Analysen verwendet werden können. Es handelt sich dabei um RM9D1, RM2D2 und RM9D6, da diese sehr schöne Amplifikationsprodukte ergaben. Die anderen Primerpaare erzeugten in den Vorversuchen kein eindeutiges PCR Fragment (Abbildung 2).

Tabelle 2 Getestete SSRs

Lokus	Repeat	Sequenz fwd	Sequenz rev	Tm (°C)
RM3D2	(GA) ₁₈	TCAACACATAATAACAAAC	GAAAAGAAGGGCAAGTAAGT	46,1
RM2D2	(CT) ₁₆	ATGTGTTTCGTTGCTACTGT	ATGGGTTGGTTTGTTCCTA	49,8

RM9D1	(CT) ₂₁	TGACCAAGTGGACCTAATC	TAACCTCAACAACCAAAC	48,6
RM9D6	(GA) ₁₆	CTCGCCTCCCAAAGCAAT	CGTGTCTCACCCCCGTAAC	55,2
RM2D5	(CT) ₃₀	CTCAGCCCTTTGTCCTCT	ATCCCGATTTTATCTGTC	49,0
RM3D1	(CT) ₂₁ (AT) ₉ (GT) ₉	CTCCACAGCAGTCCTTGATAC	GGAAACAGCAACAGAAAACA	52,2
RM3D4	(CT) ₇ +(CT) ₁₉	CTCCCAACAAACAATCCAT	CACCGAACGAAGACACTCAG	52,1

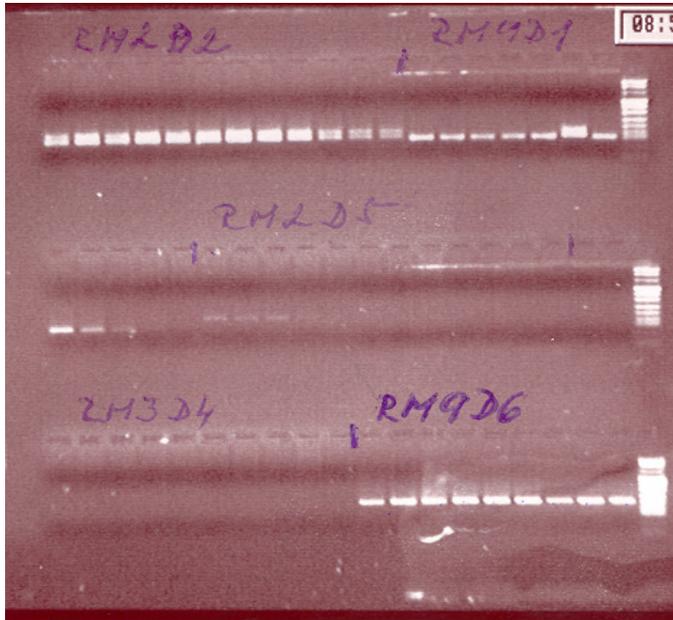


Abbildung 2 zeigt die Produkte einer Gradienten PCR. 5 SSR Primerpaare wurden mit nur einer DNA ausprobiert, um optimale PCR-Bedingungen zu ermitteln. Je Primerpaar wurden 12 idente Ansätze gemacht, die am Agarosegel analysiert wurden. An der Intensität der Banden entlang des Temperaturgradienten kann die optimale T_m ermittelt werden. Temperaturgradient: 47,5°C- 62,5°C (von li. → 47,5 – 47,8 – 48,9 – 50,5 – 52,3 – 54,1 – 55,9 – 57,6 – 59,4 – 61,1 – 62,1 – 62,5)

Tabelle 3 optimierte T_m für selektierte, heterologe SSR Primer

Primer	T _m
RM9D1	50 °C
RM9D6	56 °C
RM2D2	63 °C

Für diese 3 Primerpaare wurde jeweils der ‚Forward-Primer‘ mit Fluoreszenzfarbstoff versehen, damit die PCR-Fragmente bei den nachfolgenden automatisierten Analysen am Sequenzierer (AB 3100) detektiert werden können. Die PCR -Reaktionen wurden durchwegs mit HotStar Taq Polymerase (Qiagen), unter Verwendung von 2,5mM MgCl₂ durchgeführt.

1.3 Ad 2) Neuentwicklung spezifischer SSR-Primer

Um neue SSR-Primer für die gegenständliche Fragestellung zu entwickeln, wurde vorerst eine Literatursuche durchgeführt, um Publikationen zu sichten, die über die Entwicklung von SSR -Markern berichten. Ziel war, unterschiedliche Methoden zu evaluieren, und jene für ein weiteres Vorgehen zu wählen, die es am effizientesten erlaubt, SSRs aus angereicherten Genbanken zu isolieren.

Die Wahl fiel auf eine Methode, die für Lachs (*Salmo salar* L.) erstmals beschrieben wurde: Hybridisation capture of microsaellites directly from genomic DNA; (1997) Refseth U, Fagan B, Jakobsen K; Electrophoresis, 18, p1519-1523

Bei dieser Methode werden in Anlehnung an das AFLP -Verfahren die DNA -Fragmente mit Adaptoren versehen, diese Fragmente über magnetische Kügelchen auf die Gegenwart von

SSR-Regionen selektiert, und dieses angereicherte Gemisch zur Erzeugung einer ‚angereicherten Genbank‘ verwendet.

DNA isolation:

DNA was extracted from 6x100mg plant material (code: 22/1, 22/2, 25, 20/19) with the Qiagen Plant Minikit, was collected and further extracted with 1M NaCl, 1% SDS and 1 volume of CHCl₃. The DNA was precipitated with 2.5 volume of EtOH and dissolved in 200µl 5mM Tris Ph8.0. Concentration 113 ng/µl, 22.5µg/200µl.

Partial digestion of the genomic DNA:

5µg genomic DNA was digested in 200µl volume with 4U Sau3A restriction endonuclease. The digestion was made at 37°C with sample collection after 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 and 120 minutes. The samples were checked on 1% agarose gel.

Sample after one hour digestion showed the expected digestion grade, the fragments length between 300bp and 2kb. The fragments were purified with phenol extraction and EtOH precipitation.

Adaptor ligation:

1µg digested genomic DNA (1.5pmol) was ligated at room temperature with 177ng (22.7pmol) Sau3A adaptor for 2 hours in 50µl volume.

The ligation reaction was purified on Qiaquick PCR purification column.

Adaptor sequences:

Sau3AI A Oligo, 5'-GGCCAGAGACCCCAAGCTTCG-3'

Sau3AI B Oligo, 5'PHO-GATCCGAAGCTTGGGGTCTCTGGCC-3'

Amplification of the adapted fragments:

20, 40 and 60ng of fragmented/adapted DNA was amplified in 50µl volume with Sau3AI A adaptor primer.

The PCR product was loaded on 1% agarose gel and amplified fragments between 400bp and 1kb was cut and purified on Qiagen fragment purification kit. The three samples were pooled together. After elution 1,7µg amplified fragments in 170µl volume were obtained (10ng/µl).

PCR:

- 1, 94°C 2'
2. 94°C 1'
3. 68°C 3'
4. go to 2. 30x
5. 72°C 10'

Capture on magnetic beads:

Biotinilated (AG)₁₀ and (CA)₁₀ oligos were used to capture AG or CA repeated sequences from the digested and ligated Rhododendron genomic DNA.

AG10 5'BIO-AAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG-3'

CA10 5'BIO-AAAACACACACACACACACACA-3'

The basic protocol is written in the publication of Refseth et.al, Electrophoresis 18:1519-1523 Hybridisation capture of microsatellites directly from genomic DNA (1997).

Streptavidin Magnet Particle (Roche, 1 641 778) was used to bind the biotinilated oligoes.

The following modifications were made to the original protocol:

- 1, The selection was made on fragments after amplification with the adaptor primer

2, The capture-oligos were planed with a 5' AAAA starting sequence, to provide space between the magnetic particle and the oligo-captured genomic DNA.

3, The hybridisation procedure was made in two different ways:

A, 50µl beads were washed with 0.2xSSC and suspend in 30µl volume.

About 2µg biotinilated (CA)₁₀ oligo was added to the dynabeads and incubated at room temperature. After 10 minutes the non-bound oligos were washed off the beads by extensive washing with 0.2xSSC. The beads were suspended back in 160µl volume in 6xSSC buffer and 40µl (400ng) adapted fragments were add. After 15 min incubation at room temperature the beads were washed three times with 2xSSC and three times with 1xSSC.

The captured fragments were eluted 2 times in 50µl H₂O at 95 °C with 5min incubation.

In the **B** protocol the 400ng fragments were hybridised first with 2µg biotinilated oligos in 6xSSC then after 15min hybridisation separated on Streptavidin Magnetic Particles.

The washing was performed as described before.

Amplification of the microsatellite-oligos captured, Sau3AI adapted fragments:

PCR amplification with the Sau3AI A adaptor primer with the same program as before.

1 and 5.5µl captured fragments were amplified in 50µl volumes.

The fragments were purified on Qiagen PCR purification kit.

Cloning of the selected microsatellite containing fragments:

2µl of purified amplification product was ligated into TOPO TA cloning vector and 1-2µl of the 10 µl ligatum was transformed into electro-competent E.coli. 20 and 100µl transformed bacteria were plated on Km containing LB-plates.

Altogether 544 clones were analysed by multiplex PCR containing three primers (M13 fw. and rev. and one of the respective oligos CA₁₀ or AG₁₀) to select the microsatellite containing clones.

PC3 reaction: 1: 95 °C 3'; 2: 95 °C 45"; 3: 56 °C 25"; 4: 50 °C 25"; 5: go to 2 35x; 6, 72 °C 10'

The samples were checked on 1% agarose gel; among them 176 showed two (three?) amplification bands (see Fig.1).

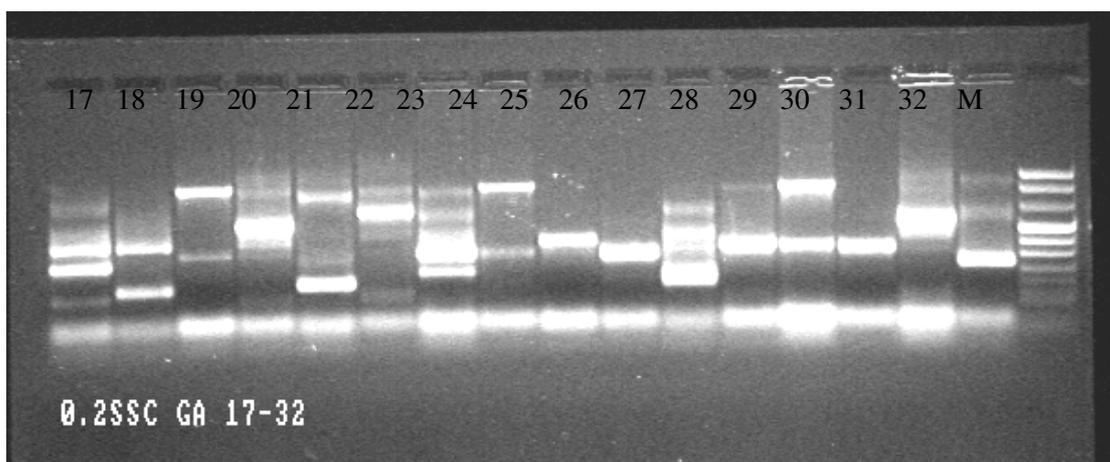


Fig.1 Direct Multiplex PCR from the selected bacterial clones.

Clones 17, 18, 19, 21, 23, 24, 27, 29 show double bands. The bigger band is the amplificatum between the M13 primers, the smaller one between the microsatellite oligo primer and one of the M13 primers, depending on its orientation.

Sequencing of the microsatellite primer containing clones:

176 clones were sequenced from two directions and 27 was found to have really microsatellites.

The other 149 sequence had only small repeats, enough to bind the (AG)₁₀ or (CA)₁₀ primers and amplify the second band.

Primer design based on the microsatellite sequences:

We had designed primers for 25 microsatellite sequences, 2 of them had the microsatellite regions very close to the 5' part of the sequence. In three cases we had planned two 3' primer, one close to the microsatellite regions, the other far away.

The designed primer pairs were tested first with two different Rhododendron genomic DNAs. PCR reactions were tested on 3% agarose gel (see Fig.2).

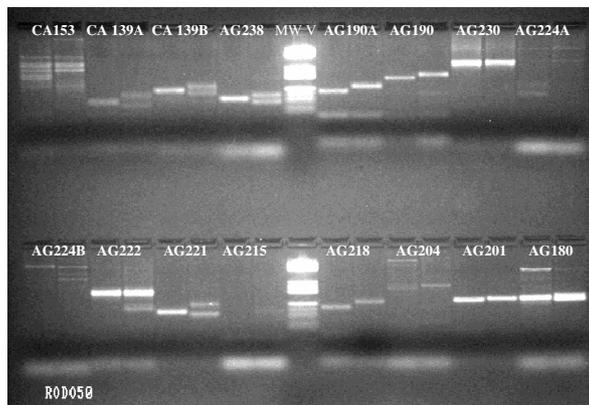


Fig.2 Testing of the Microsatellite primers on 3% agarose gels.

Primers: CA153, CA 139A, CA 139B, AG238, MWM V, AG190A, AG190B, AG230, AG224A, AG224B, AG222, AG221, AG215, AG218, AG204, AG201, AG180

Evaluation of the selected microsatellite primers:

17 of the 25 designed microsatellite primers worked on the two selected genomic DNAs.

For these 17 Primer combinations, one primer was fluorescently labelled with Fam-6 labelled for analysis of the PCR fragments on the automated sequencer. For a first trial study to evaluate the degree of polymorphism existing in the different loci, 8 different genomic DNAs from different populations were tested. The analysis was made on ABI 3100 Sequencer and analysed with the Genotyper program.

The reactions were made on the calculated T_m temperature or an optimal T_m temperature was established with gradient PCR analysis. All of the 17 amplified microsatellite regions were variable, except AG24.

13 primer pairs worked properly on 11 microsatellite sequences, for two microsatellite regions both planned primer pair worked well.

Reactions were made in 25µl volume first with Dynazym, later with Hotstar Taq polymerase (Qiagen).

1µl genomic DNA (30-50ng/µl) and 15pmol primers were used for PCR.

The all analysis result are saved on:G/UL/ULB/Rhododendron: Analysis of putative microsatellite primers.doc.

The best ones are shown on the next pages. The length of the original fragments are in brackets, the planned primer sequences are underlined

The table shows the best working SSR-Primers developed for this Project:

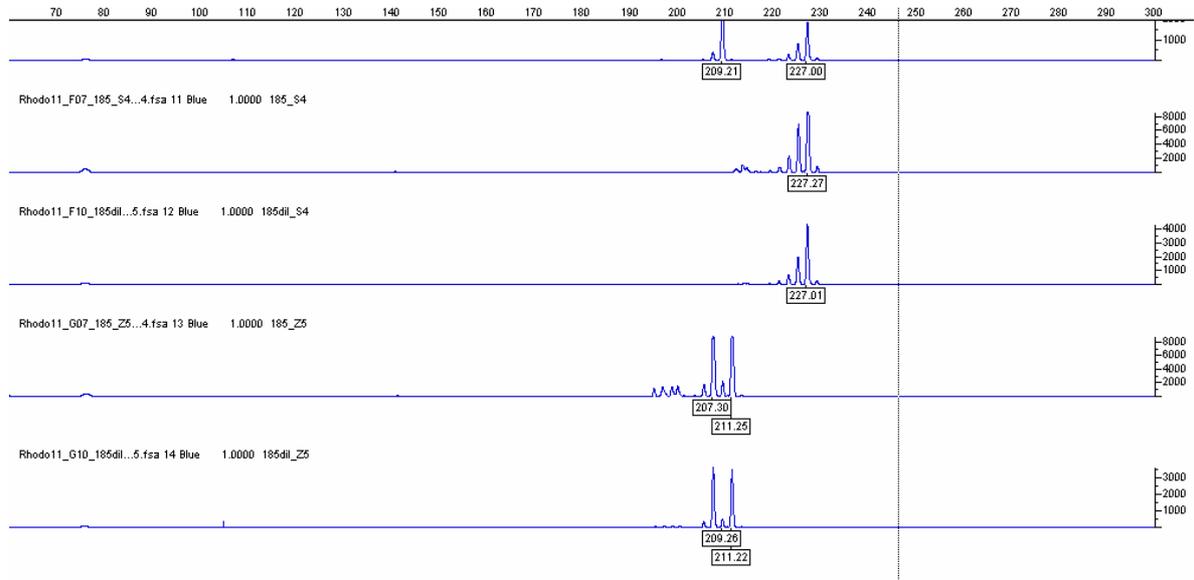
Working Microsat
primers

Primer name	Fr Length	Tm/oligo	Tm/MWG	Tm used	5' Primer sequence 5'-3'	3' Primer seq 5'-3'
6CA139 A	92bp	55	48/50	56	TATCTACAAGCCCAATG FAM	AGCACTCGAGTATGTTG
6AG238	94bp	56	52/51	59	CCTGTGCTACAGTTGG FAM	GCAGGTTACCAGTAAAAC
6AG190 A	133bp	58	51/50	50	GGACCGATGATTACTTCT FAM	GGACCGATGATTACTTCT
6AG190 B	199bp	58	51/49	50	GGACCGATGATTACTTCT FAM	GAGTTCTTCTGATTCGTT
6AG230	308bp	56	51/44	56	GATTGGAAGTGACAAGTC	AGGGTGGTCCAATG FAM
6AG218	137bp	60	49/50	50	TTCTTCTGATTCGTTGC	TTTCTTAGGACCGATGATT FAM
6AG201	150bp	57	50/50	50	ACTTAAAGAATGCCTCTC	CCCGTTTAGTATGGATG FAM
6AG180	165bp	60	55/52	65	CTGTCAGCTTTTGGGTTAC	CAGGTGGGTCTCACA FAM
6AG13	131bp	55	50/47	49	GACAAAATAGCTCCTCTAA FAM	GTTCTATTAATGGGGATT
6AG23	184bp	50	47/44	56	TATGCATACATACAGACA	TCATTAGCATAACTGC FAM
6AG219 A	104bp	51	47/39	49	GATCACATGCTTATATGT FAM	CAGCATTTTAAACCA
6AG219 B	119bp	51	47/40	49	GATCACATGCTTATATGT FAM	AGCTGCCATTGTTA
6AG185	210bp	64	57/57	65	GCACAAGGGAGGTATCAAG	GTGGCTCCTGAGACATTC FAM

Die rot markierten Primerpaare wurden für nachfolgende populations-genetische Untersuchungen verwendet.

AG185 (265bp) Tm:65 °C

GCTCTCTAGCTATCAATACAGAATAGCAATATGGCATGTCAAGGGTGACTTTGCTTGATA
 GTTGAGAGTTACTTACCAGCAATTTGCACAAGGGAGGTATCAAGGTATGGAACCTTTCTT
 ATTTCTGGCAAATGACCCTCCTCTACTCGTTTTGATCTTGTTGGGAAAATGAAATGATTT
 AACTTGTTTGATGTTATTGCAATAATCTCTCACAATCACACTTGAGCTAGTCCAAAACACA
 GA **CTCTCTCTCTCTCTC** AAATGGATGATGTATGAAATGTCTCAGGAGCCACATTATTC
 TCTGACATTTAAAGGGTTAAGGTCAGATAGGGTGAAATGATC



1.4 Populationsgenetische Untersuchungen

Bei der Untersuchung der 334 Individuen mit Hilfe der 7 Microsatelliten Regionen, konnten insgesamt 118 verschiedene Allele detektiert werden, wobei die neu entwickelten Primer eine etwas höhere Allelanzahl aufwiesen, als jene Primer, die für *R. meternichii* entwickelt wurden.

Region	Detektierte Allele
D01	12
D02	14
D06	17
AG13	22
AG218	17
Ag219	26
Ag230	10

Die Untersuchung der genetischen Vielfalt in den untersuchten 11 natürlichen Populationen zeigte, dass alle einen hohen Grad an Diversität aufweisen. In keiner der Populationen wurde klonales Material festgestellt, was bedeutet, dass jedem der gesammelten Einzelindividuen ein eindeutiger Genotyp zugewiesen werden kann. Die existierende genetische Vielfalt ist relativ hoch, wobei der beobachtete Heterozygotiegrad zumeist dem Erwarteten entspricht. Nur in den Populationen 4 (Versam-Station) und 10 (Kirchkogel) ist eine verminderte genetische Vielfalt zu beobachten.

Bei der Untersuchung des Samenmaterials (50 Sämlinge) eines Einzelindividuums der Population Patscherkofel konnten in jedem Locus die mütterlichen Allele wiedergefunden werden. Jedes dieser Allele machte zumindest 25% bis 50% der detektierten Allele aus. In den meisten Fällen stammten annähernd 100% der detektierten Allele von der Mutterpflanze, nur im Locus 218 konnten ca.30% der gefundenen Allele auf paternalen Ursprung zurückgeführt werden. Bei allen anderen Loci fanden sich nur 1-4% nicht-maternalen Allele. Dieses Ergebnis lässt auf eine hohe Selbstungsrate schließen.

Bei der Analyse der genetischen Distanz zwischen den natürlichen Populationen bildeten sich 2 Cluster (siehe Dendrogramm), wobei aber die verschiedenen Herkünfte genetisch dennoch relativ weit von einander entfernt sind, und kein eindeutiger geografischer Trend ausgemacht werden kann.

Die Untersuchung der bereits in vitro etablierten Samenherkünfte (9) zeigte, dass auch diese Linien zum Grossteil genetisch unterschiedlich sind. Nur bei den Herkünften Tennengau und Pinzgau handelt es sich um identische Pflanzenlinien. Für die Samenherkunft (Trnovski Gozd, Predmeja (SLO) liegen aufgrund labortechnischer Schwierigkeiten nicht genügend genetische Daten vor, weshalb die Proben aus allen populationsgenetischen Analysen ausgeklammert wurden.

Setzt man diese Samenherkünfte, und auch die Sämlinge der Herkunft Patscherkofel miteinander in Beziehung, so zeigt sich wiederum eine Zweiteilung des Dendrogramms in 2 Cluster. In dem einen Cluster finden sich die beiden Samenherkünfte Churfürsten dicht nebeneinander, und auch die Sämlinge (Patscherkofel) clustern mit der natürlichen Population Patscherkofel, von der sie auch abstammen. Im zweiten Cluster finden sich 6 natürliche Populationen sowie 5 Samenherkünfte unterschiedlichen geografischen Ursprungs.

Versucht man, die verschiedenen Spezies anhand ihrer Allelfrequenzen zu unterscheiden, so zeigt sich, dass in allen Loci die Allele in den 3 Spezies annähernd gleich verteilt sind, außer in Locus 219. Hier kann beobachtet werden, dass in *R. ferrugineum* die Allele A (74bp) und D (84bp) beinahe 90% der detektierten Fragmente ausmachen (38%:A, 53%:D),

während genau diese Fragmentlängen in *R. x intermedium* selten (8%:A, 12%:D), in *R. hirsutum* beinahe gar nicht auftreten (0%:A, 3%:D).

1.5 Populationsanalysen der 11 natürlichen Populationen:

Summary of Genetic Variation Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	na*
D01	422	110.000
D02	440	130.000
D96	430	180.000
AG13	432	180.000
AG218	416	140.000
AG219	442	240.000
AG230	412	90.000
Mean	428	152.857
St. Dev		50.897

* na = Observed number of alleles

Heterozygosity Statistics über alle Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	422	0.3886	0.6114	0.2182	0.7818	0.7800	0.5453
D02	440	0.4136	0.5864	0.2206	0.7794	0.7776	0.5647
D96	430	0.3256	0.6744	0.1266	0.8734	0.8713	0.7290
AG13	432	0.3148	0.6852	0.1340	0.8660	0.8640	0.6931
AG218	416	0.3606	0.6394	0.1428	0.8572	0.8551	0.6646
AG219	442	0.4977	0.5023	0.0996	0.9004	0.8984	0.6417
AG230	412	0.4466	0.5534	0.2963	0.7037	0.7020	0.5541
Mean	428	0.3925	0.6075	0.1769	0.8231	0.8212	0.6275
St. Dev		0.0658	0.0658	0.0700	0.0700	0.0698	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity

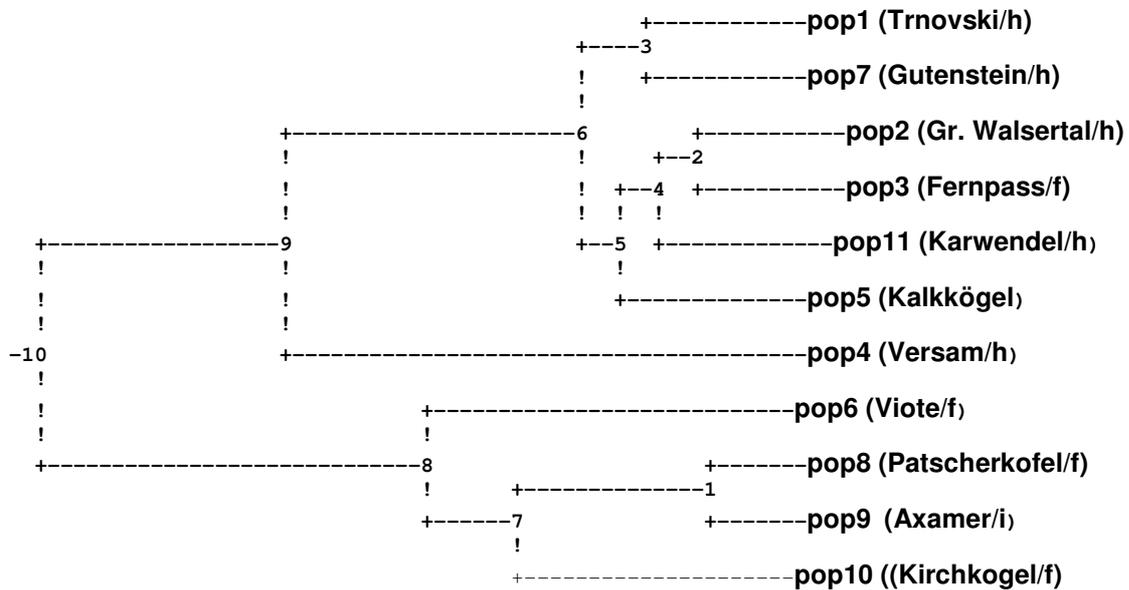
Nei's Original Measures of Genetic Identity and Genetic distance

[See Nei (1972) Am. Nat. 106:283-292]

pop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0.6226	0.6834	0.3445	0.7141	0.2808	0.7545	0.1321	0.3895	0.1471	0.7148
2	0.4739	****	0.7715	0.4182	0.6784	0.3351	0.6165	0.2922	0.5647	0.2304	0.7197
3	0.3807	0.2594	****	0.4887	0.7464	0.3925	0.6568	0.2201	0.5344	0.2117	0.7586
4	10.655	0.8719	0.7160	****	0.4038	0.2425	0.4053	0.0259	0.2556	0.0303	0.3768
5	0.3367	0.3881	0.2925	0.9068	****	0.5201	0.6606	0.2720	0.5199	0.3191	0.7339
6	12.703	10.934	0.9351	14.169	0.6538	****	0.3560	0.4852	0.5486	0.5270	0.4058
7	0.2816	0.4837	0.4204	0.9031	0.4147	10.328	****	0.2081	0.5197	0.2583	0.6861
8	20.245	12.305	15.136	36.529	13.021	0.7232	15.696	****	0.8396	0.6361	0.3498
9	0.9429	0.5714	0.6266	13.643	0.6541	0.6003	0.6544	0.1748	****	0.5757	0.6750
10	19.169	14.680	15.527	34.953	11.424	0.6405	13.536	0.4524	0.5521	****	0.3130
11	0.3358	0.3289	0.2763	0.9761	0.3093	0.9018	0.3768	10.505	0.3931	11.616	****

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

Dendrogramm aller natürlichen Populationen:



Based Nei's (1972) Genetic distance: Method = UPGMA
 --Modified from NEIGHBOR procedure of PHYLIP Version 3.5

Herkunf	Spezies	Bezeichnung
SLO/Trnovski/21	R.hirsutum	Pop 1
A/Gr. Walsertal/28	R.hirsutum	Pop 2
A/Fernpass/29	alle	Pop3
CH/Versam-Station/30	R.hirsutum	Pop4
A/Kalkkögel/24	R.hirsutum	Pop 5
I/Viote/26	R.ferrugineum	Pop 6
A/Gutenstein/19	R.hirsutum	Pop 7
A/Patscherkofel/22	R.ferrugineum	Pop 8
A/Axamer L./25	alle	Pop 9
A/Kirchkogel/20	R.ferrugineum	Pop 10
A/Karwendel/23	R.hirsutum	Pop 11

1.6 Populationsgenetische Analyse aller untersuchten Individuen

Summary of Genetic Variation Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	na*
D01	618	120.000
D02	652	140.000
D96	624	180.000
AG13	620	180.000
AG218	620	150.000
AG219	650	250.000
AG230	624	90.000
Mean	630	158.571
St. Dev		51.455

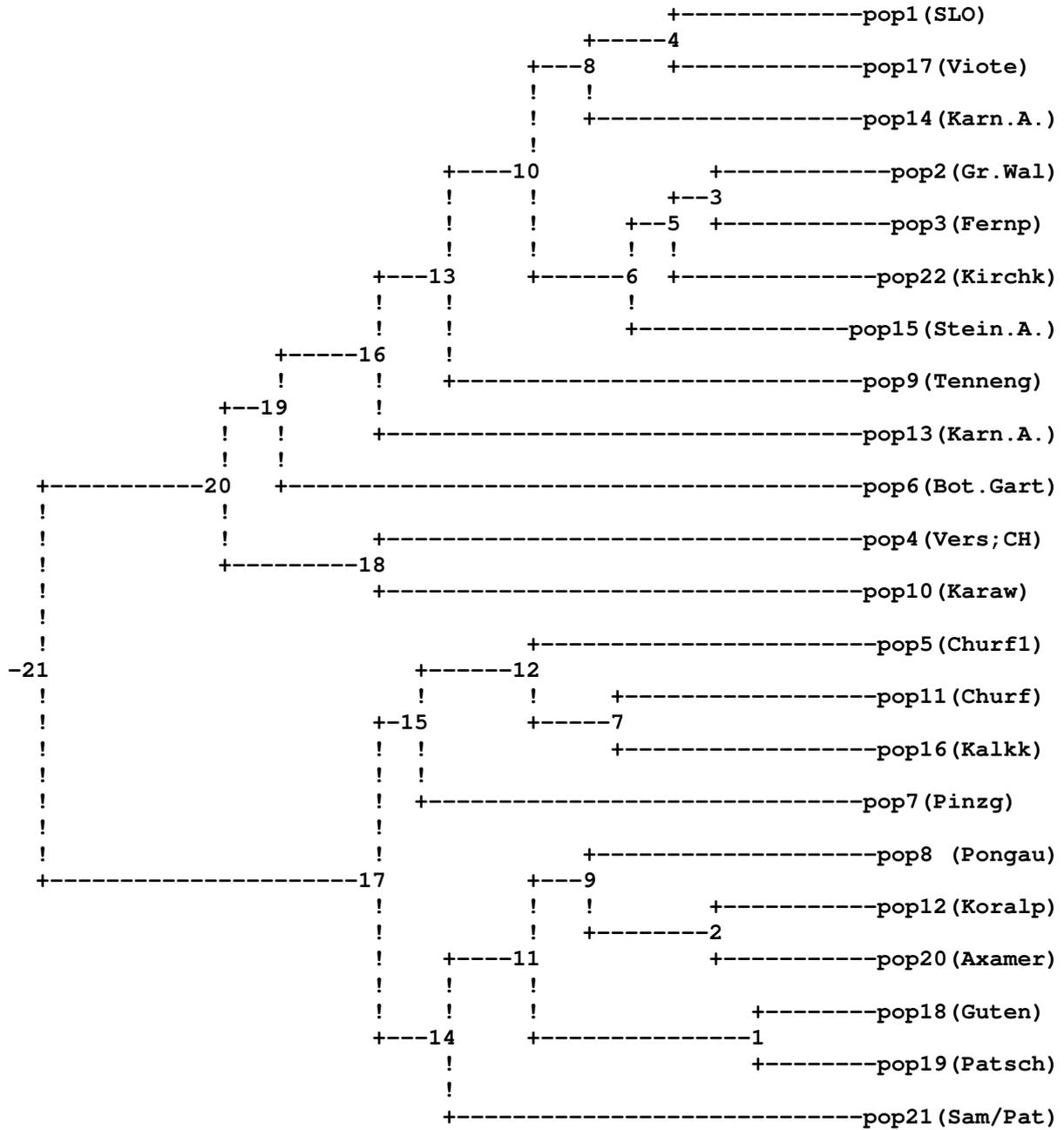
* na = Observed number of alleles

Tabelle der Nei's Original Measures of Genetic Identity and Genetic distance

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	****	0.6228	0.8894	0.3445	0.3219	0.4579	0.3448	0.4818	0.4819	0.4446	0.4121	0.3102	0.5850	0.6940	0.7141	0.2803	0.7545	0.1321	0.3995	0.2872	0.1471
2	0.4739	****	0.7715	0.4182	0.3416	0.4420	0.2972	0.3925	0.4630	0.4222	0.3793	0.3186	0.5425	0.4476	0.6784	0.3951	0.6165	0.2822	0.6947	0.2865	0.2304
3	0.3807	0.2594	****	0.4887	0.3213	0.4585	0.2159	0.3410	0.4854	0.5157	0.3894	0.3475	0.5470	0.4882	0.7484	0.3925	0.6558	0.2201	0.6394	0.2804	0.2117
4	10.065	0.8719	0.7160	****	0.1722	0.1735	0.1168	0.2570	0.3760	0.4878	0.1584	0.1301	0.3078	0.3159	0.4088	0.2125	0.4053	0.0259	0.2585	0.1441	0.0308
5	11.336	10.740	11.354	17.588	****	0.2404	0.4887	0.5162	0.3717	0.2888	0.5418	0.4039	0.2770	0.2429	0.4084	0.6773	0.4084	0.4284	0.4854	0.4905	0.4627
6	0.7396	0.8166	15.382	17.513	14.256	****	0.5166	0.4074	0.2131	0.3288	0.4625	0.3347	0.4486	0.5521	0.5266	0.3882	0.3941	0.1775	0.3274	0.2103	0.2365
7	10.018	12.183	15.382	21.488	0.7763	0.6804	****	0.6367	0.2816	0.3291	0.6784	0.5189	0.3763	0.3450	0.4664	0.4603	0.4265	0.3794	0.4092	0.4763	0.5130
8	0.7302	0.9362	10.789	13.588	0.6831	0.9128	0.6241	****	0.3732	0.3221	0.6820	0.6730	0.5313	0.4823	0.5888	0.4894	0.4265	0.5130	0.5584	0.6162	0.5287
9	0.7289	0.7919	0.7024	11.841	0.9896	15.988	14.489	0.9867	****	0.4197	0.3771	0.3076	0.3221	0.6110	0.7080	0.4220	0.6627	0.2179	0.4171	0.3770	0.2891
10	0.8705	0.8623	0.8623	0.7179	12.285	11.784	11.115	11.329	0.8882	****	0.3201	0.3229	0.4288	0.4842	0.6676	0.3775	0.3763	0.1735	0.3086	0.3630	0.1832
11	0.8885	11.416	11.290	18.553	0.6129	0.7980	0.3809	0.4276	0.9752	11.391	****	0.5825	0.4607	0.3859	0.5488	0.6802	0.3919	0.4280	0.4402	0.5803	0.6287
12	11.705	11.501	10.569	20.388	0.8942	10.947	0.6889	0.3691	11.988	11.306	0.5405	****	0.4865	0.2009	0.4888	0.4267	0.2873	0.6803	0.6943	0.7880	0.5777
13	0.5709	0.6116	0.6033	11.980	12.888	0.7994	0.9801	0.6324	11.327	0.8467	0.7749	0.7003	****	0.4402	0.7762	0.2881	0.4022	0.2253	0.3882	0.4609	0.2188
14	0.3798	0.8088	0.7212	11.427	14.149	0.5941	10.642	0.8386	0.6714	0.7253	0.9267	16.047	0.8206	****	0.6064	0.3770	0.6681	0.0885	0.3297	0.2205	0.1366
15	0.3367	0.3881	0.2025	0.9088	0.8854	0.6413	0.7819	0.6783	0.3453	0.4192	0.6001	0.7199	0.3339	0.5001	****	0.5201	0.6606	0.2720	0.5799	0.4678	0.3191
16	12.703	10.984	0.9851	14.189	0.3887	0.9463	0.7871	0.6883	0.8828	0.6741	0.3884	0.8518	12.102	11.487	0.6888	****	0.3680	0.4852	0.6185	0.4128	0.5270
17	0.2816	0.4887	0.4204	0.9081	0.8865	0.9311	12.204	0.8645	0.4677	0.8775	0.9547	13.165	0.9109	0.4184	0.4147	10.328	****	0.2081	0.6797	0.2903	0.2883
18	20.215	12.305	15.136	36.529	0.8477	17.286	0.9797	0.6705	15.236	17.402	0.8534	0.3882	14.903	28.071	13.021	0.7232	15.696	****	0.8895	0.7028	0.6361
19	0.9429	0.5714	0.6286	13.643	0.7228	11.168	0.8884	0.5883	0.8743	11.793	0.8205	0.4395	0.9882	11.037	0.6641	0.6003	0.6644	0.7748	****	0.6047	0.5757
20	12.477	12.500	12.383	19.376	0.7122	15.583	0.7411	0.4942	0.9755	10.412	0.5793	0.2282	0.7748	15.116	0.7732	0.8847	12.359	0.3513	0.6780	****	0.4811
21	19.189	14.880	15.527	34.983	0.7708	13.527	0.6675	0.6573	14.310	18.757	0.4841	0.5489	15.389	19.634	11.424	0.6405	13.536	0.4624	0.6621	0.7378	****
22	0.3389	0.3289	0.2763	0.9761	0.9881	0.6984	13.053	0.8026	0.4898	0.6787	10.208	0.8721	0.6889	0.4689	0.3093	0.9018	0.3768	10.505	0.3681	11.067	11.616

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

Dendrogramm aller untersuchten Populationen



Herkunft	Spezies	Bezeichnung
A/Kalkkogel/24	R. hirsutum	Pop 16
I/Viote / Trient/26	R.ferrugineum	Pop 17
A/Patscherkofel/22	R.ferrugineum	Pop 19
A/Kirchkogel/20	R.ferrugineum	Pop 22
A/Karwendel/23	R.hirsutum	Pop 23
SLO/Trnovski/21	R.hirsutum	Pop01
A/Gr. Walsertal/28	R.hirsutum	Pop02
A/Fernpass/29	alle	Pop03
CH/Versam/30	R.hirsutum	Pop04
Churfürsten (CH)1/Gw	R. ferrugineum	Pop05
Bot.Garten Frankfurt	R. ferrugineum	Pop06
Pinzgau/Gw	R. ferrugineum	Pop07
Pongau (A)/GW	R. ferrugineum	Pop08
Tennengau (A)/Gw	R.hirsutum	Pop09
Karawanken (A)/Gw	R.hirsutum	Pop10
Churfürsten (CH)/Gw	R. hirsutum	Pop11
Koralpe (A)/Gw	R. ferrugineum	Pop12
Karnische Alpen (A)/Gw	R. ferrugineum	Pop13
Karnische Alpen (A)/Gw	R. hirsutum	Pop14
Steiner Aplen (SLO)/Gw	R. hirsutum	Pop15
A/Gutenstein/19	R.hirsutum	Pop18
A/Axamer L./25	alle	Pop20
Samen/Patscherk/1	R.ferrugineum	Pop21

Tabellen zur Zweisung der Allelgrößen zu Buchstabencodes für Popgen Analysen

D6

176,0 - 176,9	176	A
178,0 - 178,8	178	B
182	182	C
184 - 185	184	D
186 - 187,7	186	E
188 - 188,6	188	F
189,3-190,7	190	G
191,9 - 192,5	192	H
194 - 194,5	194	I
196 - 196,5	196	J
197,8 - 198,2	198	K
203,5 - 204,5	204	L
208 - 209	208	M
210 - 210,5	210	N
215 - 216	216	O
217 - 217,8	218	P
219,81	220	Q

D1

108,4 - 109,5	108	A
111,49	110	B
112 - 113,4	112	C
113,5 - 114,6	114	D
115 - 116,5	116	E
118,4 - 119,4	118	F
120,4 - 121,62	120	G
122,4 - 123,4	122	H
124,4 - 125,2	124	I
126,7 - 127,3	126	J
130 - 131,2	130	K
134,79	134	L

D2

115,85	116	A
118,6 - 118,8	118	B
120,5 - 120,9	120	C
122 - 123,55	122	D
123,7 - 124,95	124	E
		F
126 - 127	126	G
128,1 - 129,1	128	H
130,2 -131	130	I
132,9 - 133,2	133	J
136,92	137	K
140,42 - 141,5	141	L
147,1 - 149,7	148	M
154,9 - 155	155	N
173,8 - 174,2	174	O

AG 218

107,6 - 109,1	108	A
109,6 - 111,84	110	B
112 - 113,35	112	C
114,5 - 115,1	114	D
116,1 - 117,5	116	E
118,6 - 119,3	118	F
119,7 - 121,2	120	G
122,6 - 123	122	H
124,1 - 125,4	124	I
126,3 - 127,3	126	J
128,5 - 129	128	K
130,3 - 132	130	L
132,3 - 133,2	132	M
134,5 - 134,8	134	N
143,5 - 143,7	143	O

AG 230

278,7 - 278,9	278	A
292,7	292	B
294,1 - 294,99	294	C
295,7 - 297	296	D
300,2 - 300,9	300	E
304 - 305	304	F
306,96	306	G
307,7 - 309,4	308	H
309,8 - 311	310	I
312 - 312,5	312	J

AG 219

74,8 - 75	74	A
76,7 - 77,4	76	B
78,6 - 78,8	78	C
83,2-83,8	84	D
85,3 - 86,2	86	E
87,4 - 87,8	87	F
89,6 - 90,2	89	G
91,1 - 92,2	91	H
93,8 - 94,7	94	I
96 - 97	96	J
98,2 - 98,7	98	K
100,4 - 101	100	L
102,4 - 102,7	102	M
104,4 - 104,9	104	N
106,3 - 106,8	106	O
108,3 - 108,8	108	P
110,1 - 110,8	110	Q
112,3 - 112,5	112	R
114,4 - 114,7	114	S
116,4 - 116,7	116	T
118,4	118	U
120 - 120,6	120	V
122,3 - 122,6	122	W
124 - 124,7	124	X
126,2 - 126,8	126	Y
129,2 - 129, 6	129	Z

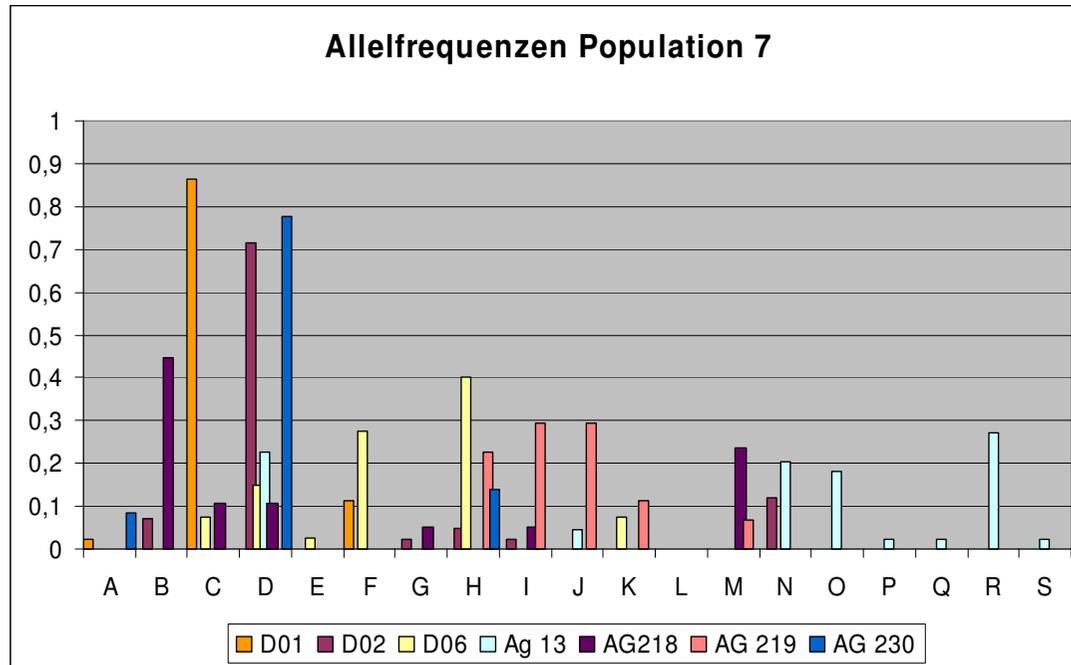
AG 13

122,85	122	A
124,6 - 125,02	124	B
126,9 - 127	126	C
128,8 - 129,4	138	D
130,9 - 131	131	E
150 - 151	151	F
152,6 - 152,9	153	G
157,9 - 158,2	158	H
159,6 - 160,9	160	I
164,9 - 165,4	165	J
166,9 - 167,4	167	K
169 - 169,9	169	L
171,2 - 171,9	171	M
173 - 174	173	N
175 - 176,1	175	O
177 - 177,9	177	P
179,2 - 179,7	179	Q
181 - 181,9	181	R
183,2 - 184	183	S
185,2 - 185,9	185	T
186,4 - 187,8	187	U
189,3 - 190	189	V

1.7 Analysen zur genetischen Vielfalt in den natürlichen Populationen:

Nummerierungsschlüssel

Herkunft	Spezies	Bezeichnung
SLO/Trnovski/21	R.hirsutum	Pop 1
A/Gr. Walsertal/28	R.hirsutum	Pop 2
A/Fernpass/29	alle	Pop3
CH/Versam/30	R.hirsutum	Pop4
A/Kalkkögel/24	R. hirsutum	Pop 5
I/Viote / Trient/26	R.ferrugineum	Pop 6
A/Gutenstein/19	R.hirsutum	Pop 7
A/Patscherkofel/22	R.ferrugineum	Pop 8
A/Axamer L./25	alle	Pop9
A/Kirchkogel/20	R.ferrugineum	Pop 10
A/Karwendel/23	R.hirsutum	Pop 11

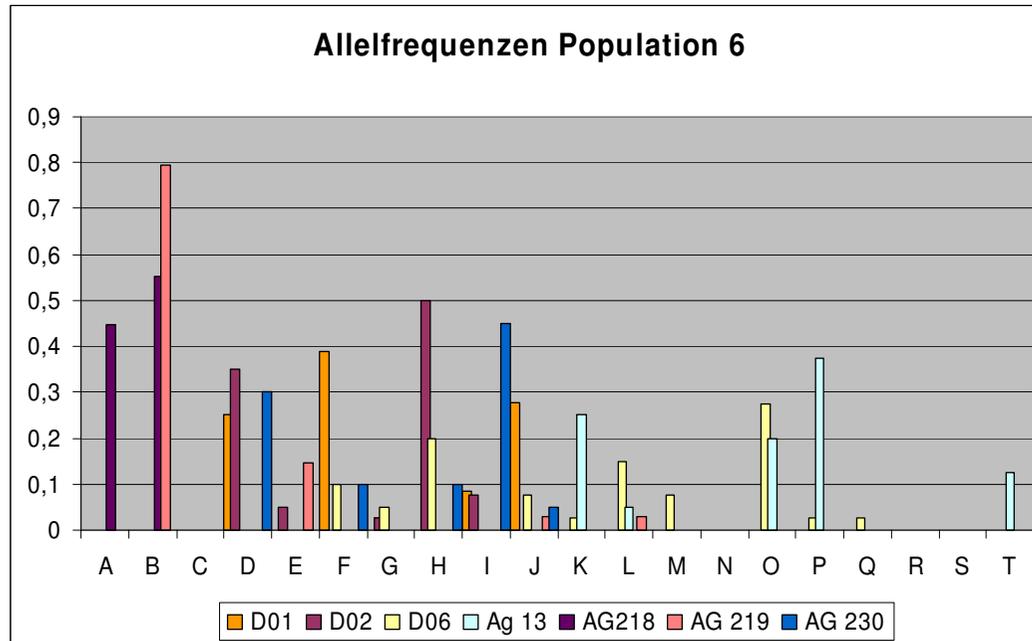


	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,0227						0,0833
B			0,0714			0,4474		
C		0,8636		0,075		0,1053		
D			0,7143	0,15	0,2273	0,1053		0,7778
E				0,025				
F		0,1136		0,275				
G			0,0238			0,0526		
H			0,0476	0,4			0,2273	0,1389
I			0,0238			0,0526	0,2955	
J					0,0455		0,2955	
K				0,075			0,1136	
L								
M						0,2368	0,0682	
N			0,119		0,2045			
O					0,1818			
P					0,0227			
Q					0,0227			
R					0,2727			
S					0,0227			

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	44	0.7273	0.2727	0.7537	0.2463	0.2407	0.5453
D02	42	0.6667	0.3333	0.5215	0.4785	0.4671	0.5647
D96	40	0.6000	0.4000	0.2513	0.7487	0.7300	0.7290
AG13	44	0.2273	0.7727	0.1860	0.8140	0.7955	0.6931
AG218	38	0.4211	0.5789	0.2646	0.7354	0.7161	0.6646
AG219	44	0.7727	0.2273	0.2262	0.7738	0.7562	0.6417
AG230	36	0.5556	0.4444	0.6206	0.3794	0.3688	0.5541
Mean	41	0.5672	0.4328	0.4034	0.5966	0.5821	0.6275
St. Dev		0.1897	0.1897	0.2254	0.2254	0.2202	0.0733

Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)
 ** Nei's (1973) expected heterozygosity



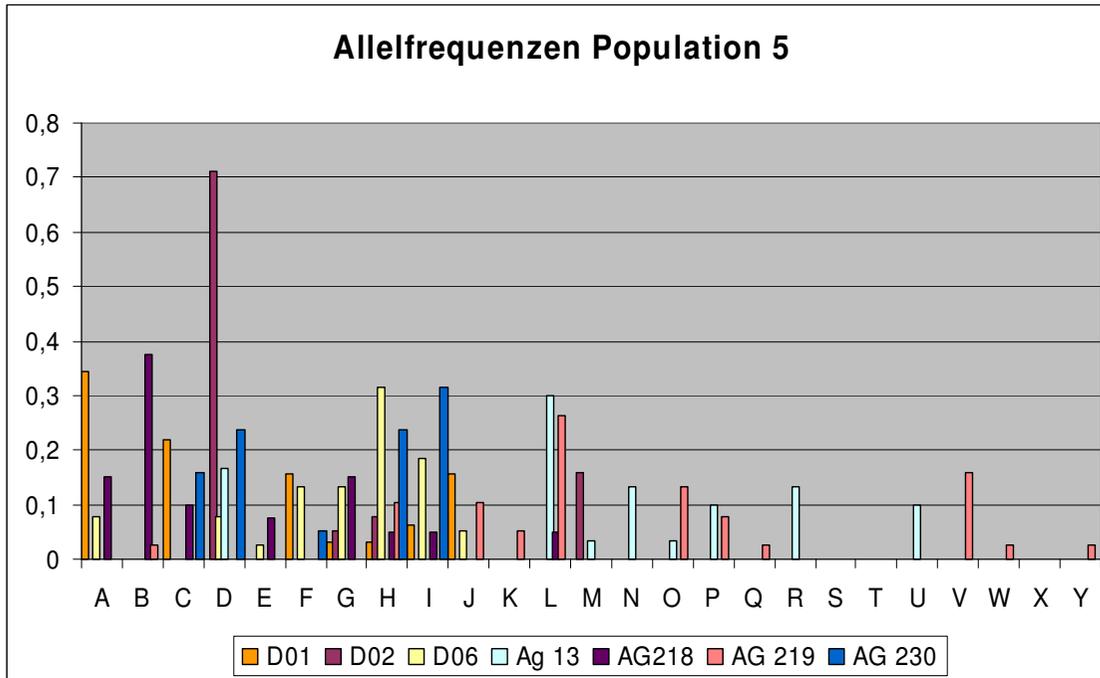
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A						0,4474		
B						0,5526	0,7941	
C								
D		0,25	0,35					0,3
E			0,05				0,1471	
F		0,3889		0,1				0,1
G			0,025	0,05				
H			0,5	0,2				0,1
I		0,0833	0,075					0,45
J		0,2778		0,075			0,0294	0,05
K				0,025	0,25			
L				0,15	0,05		0,0294	
M				0,075				
N								
O				0,275	0,2			
P				0,025	0,375			
Q				0,025				
R								
S								
T					0,125			

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	36	0.0000	10.000	0.2778	0.7222	0.7022	0.5453
D02	40	0.0500	0.9500	0.3654	0.6346	0.6188	0.5647
D96	40	0.2500	0.7500	0.1423	0.8577	0.8362	0.7290
AG13	40	0.2500	0.7500	0.2423	0.7577	0.7388	0.6931
AG218	38	0.6316	0.3684	0.4922	0.5078	0.4945	0.6646
AG219	34	0.8824	0.1176	0.6435	0.3565	0.3460	0.6417
AG230	20	0.0000	10.000	0.2789	0.7211	0.6850	0.5541
Mean	35	0.2948	0.7052	0.3489	0.6511	0.6316	0.6275
St. Dev		0.3407	0.3407	0.1691	0.1691	0.1642	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



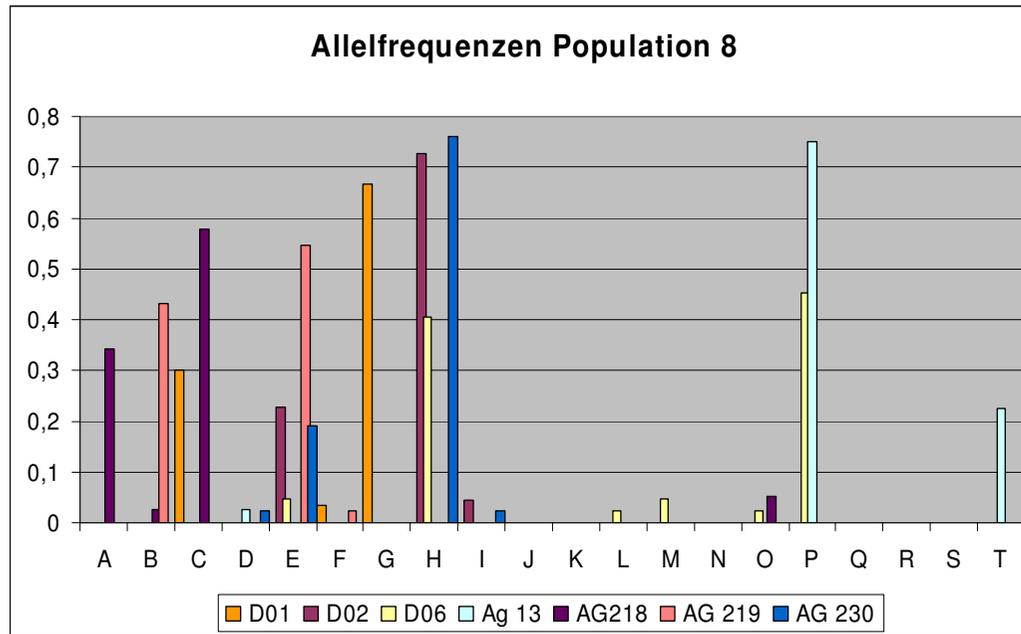
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,3438		0,0789		0,15		
B						0,375	0,0263	
C		0,2188				0,1		0,1579
D			0,7105	0,0789	0,1667			0,2368
E				0,0263		0,075		
F		0,1562		0,1316				0,0526
G		0,0312	0,0526	0,1316		0,15		
H		0,0312	0,0789	0,3158		0,05	0,1053	0,2368
I		0,0625		0,1842		0,05		0,3158
J		0,1562		0,0526			0,1053	
K							0,0526	
L					0,3	0,05	0,2632	
M			0,1579		0,0333			
N					0,1333			
O					0,0333		0,1316	
P					0,1		0,0789	
Q							0,0263	
R					0,1333			
S								
T								
U					0,1			
V							0,1579	
W							0,0263	
X								
Y							0,0263	

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci (Pop5)

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	32	0.0000	10.000	0.1956	0.8044	0.7793	0.5453
D02	38	0.5263	0.4737	0.5263	0.4737	0.4612	0.5647
D96	38	0.2105	0.7895	0.1622	0.8378	0.8158	0.7290
AG13	30	0.1333	0.8667	0.1471	0.8529	0.8244	0.6931
AG218	40	0.2500	0.7500	0.1885	0.8115	0.7913	0.6646
AG219	38	0.2632	0.7368	0.1223	0.8777	0.8546	0.6417
AG230	38	0.2632	0.7368	0.2191	0.7809	0.7604	0.5541
Mean	36	0.2352	0.7648	0.2230	0.7770	0.7553	0.6275
St. Dev		0.1596	0.1596	0.1376	0.1376	0.1333	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



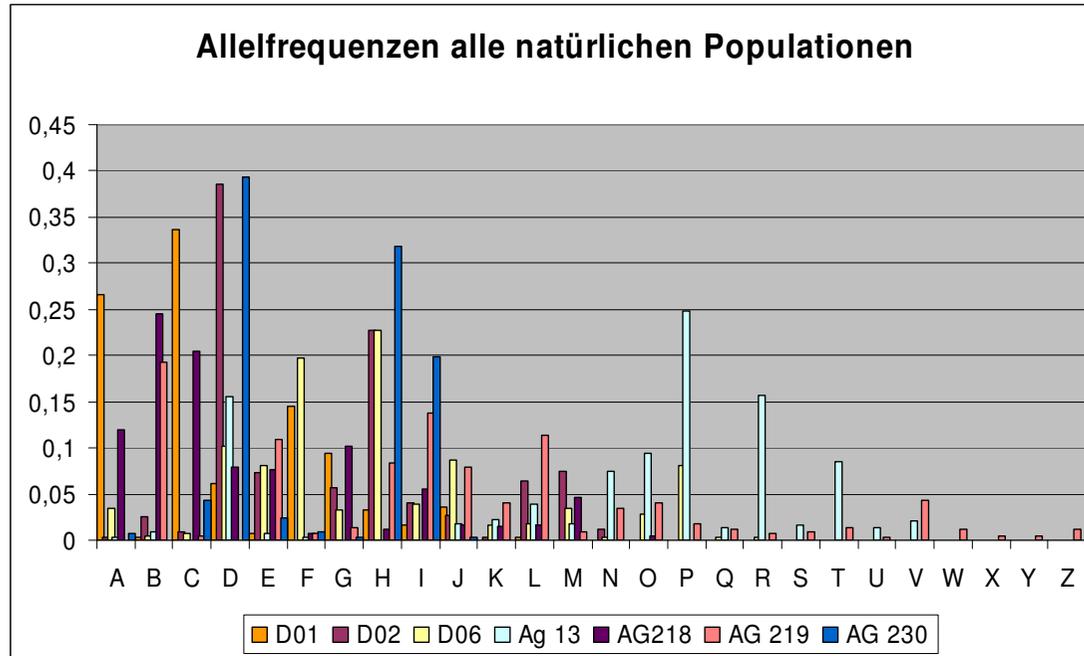
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A						0,3421		
B						0,0263	0,4318	
C		0,3				0,5789		
D					0,025			0,0238
E			0,2273	0,0476			0,5455	0,1905
F		0,0333					0,0227	
G		0,6667						
H			0,7273	0,4048				0,7619
I			0,0455					0,0238
J								
K								
L				0,0238				
M				0,0476				
N								
O				0,0238		0,0526		
P				0,4524	0,75			
Q								
R								
S								
T						0,225		

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	30	0.6667	0.3333	0.5195	0.4805	0.4644	0.5453
D02	44	0.7273	0.2727	0.5729	0.4271	0.4174	0.5647
D96	42	0.5238	0.4762	0.3589	0.6411	0.6259	0.7290
AG13	40	0.6500	0.3500	0.6038	0.3962	0.3862	0.6931
AG218	38	0.5789	0.4211	0.4410	0.5590	0.5443	0.6646
AG219	44	0.5000	0.5000	0.4725	0.5275	0.5155	0.6417
AG230	42	0.5714	0.4286	0.6086	0.3914	0.3821	0.5541
Mean	40	0.6026	0.3974	0.5110	0.4890	0.4765	0.6275
St. Dev		0.0818	0.0818	0.0927	0.0927	0.0905	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



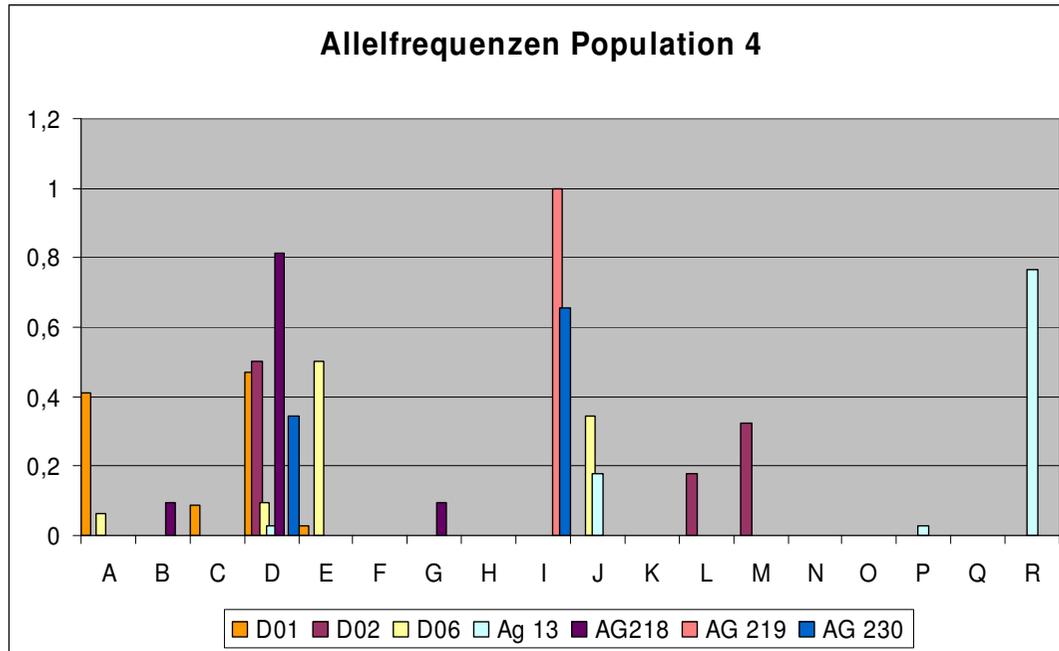
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,2654	0,0023	0,0349	0,0023	0,1202		0,0073
B		0,0024	0,025	0,0047	0,0093	0,2452	0,1923	
C		0,3365	0,0091	0,007		0,2043	0,0045	0,0437
D		0,0616	0,3864	0,1023	0,1551	0,0793		0,3932
E		0,0071	0,0727	0,0814	0,0069	0,0769	0,1086	0,0243
F		0,1445		0,1977	0,0023	0,0072	0,0068	0,0097
G		0,0948	0,0568	0,0326		0,101	0,0136	0,0024
H		0,0332	0,2273	0,2279		0,012	0,0837	0,318
I		0,0166	0,0409	0,0395		0,0553	0,138	0,199
J		0,0355	0,0273	0,086	0,0185	0,0168	0,0792	0,0024
K			0,0023	0,0163	0,0231	0,0144	0,0407	
L		0,0024	0,0636	0,0186	0,0394	0,0168	0,1131	
M			0,075	0,0349	0,0185	0,0457	0,009	
N			0,0114	0,0023	0,0741		0,0339	
O				0,0279	0,0949	0,0048	0,0407	
P				0,0814	0,2477		0,0181	
Q				0,0023	0,0139		0,0113	
R				0,0023	0,1574		0,0068	
S					0,0162		0,009	
T					0,0856		0,0136	
U					0,0139		0,0023	
V					0,0208		0,043	
W							0,0113	
X							0,0045	
Y							0,0045	
Z							0,0113	

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	422	0.3886	0.6114	0.2182	0.7818	0.7800	0.5453
D02	440	0.4136	0.5864	0.2206	0.7794	0.7776	0.5647
D96	430	0.3256	0.6744	0.1266	0.8734	0.8713	0.7290
AG13	432	0.3148	0.6852	0.1340	0.8660	0.8640	0.6931
AG218	416	0.3606	0.6394	0.1428	0.8572	0.8551	0.6646
AG219	442	0.4977	0.5023	0.0996	0.9004	0.8984	0.6417
AG230	412	0.4466	0.5534	0.2963	0.7037	0.7020	0.5541
Mean	428	0.3925	0.6075	0.1769	0.8231	0.8212	0.6275
St. Dev		0.0658	0.0658	0.0700	0.0700	0.0698	0.0733

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,4118		0,0625				
B						0,0938		
C		0,0882						
D		0,4706	0,5	0,0938	0,0294	0,8125		0,3438
E		0,0294		0,5				
F								
G						0,0938		
H								
I							1	0,6562
J				0,3438	0,1765			
K								
L			0,1765					
M			0,3235					
N								
O								
P					0,0294			
Q								
R					0,7647			

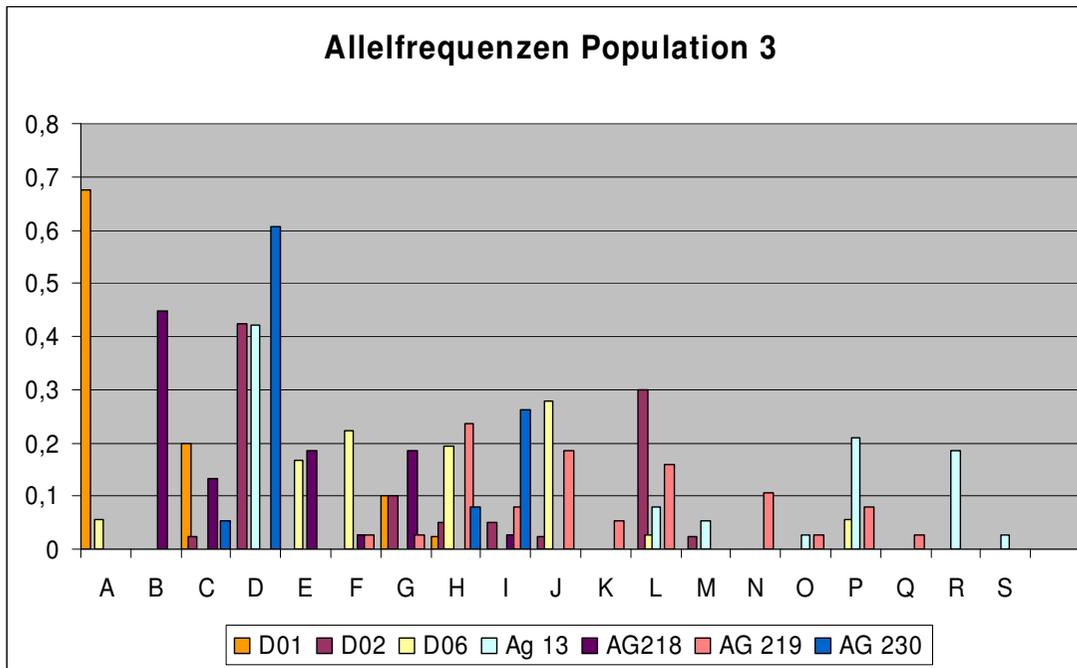
Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	34	0.0000	10.000	0.3815	0.6185	0.6003	0.5453
D02	34	0.0000	10.000	0.3672	0.6328	0.6142	0.5647
D96	32	0.0000	10.000	0.3609	0.6391	0.6191	0.7290
AG13	34	0.5882	0.4118	0.6061	0.3939	0.3824	0.6931
AG218	32	0.6250	0.3750	0.6673	0.3327	0.3223	0.6646
AG219	34	10.000	0.0000	10.000	0.0000	0.0000	0.6417
AG230	32	0.3125	0.6875	0.5343	0.4657	0.4512	0.5541
Mean	33	0.3608	0.6392	0.5596	0.4404	0.4271	0.6275
St. Dev		0.3922	0.3922	0.2297	0.2297	0.2228	0.0733

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

**

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



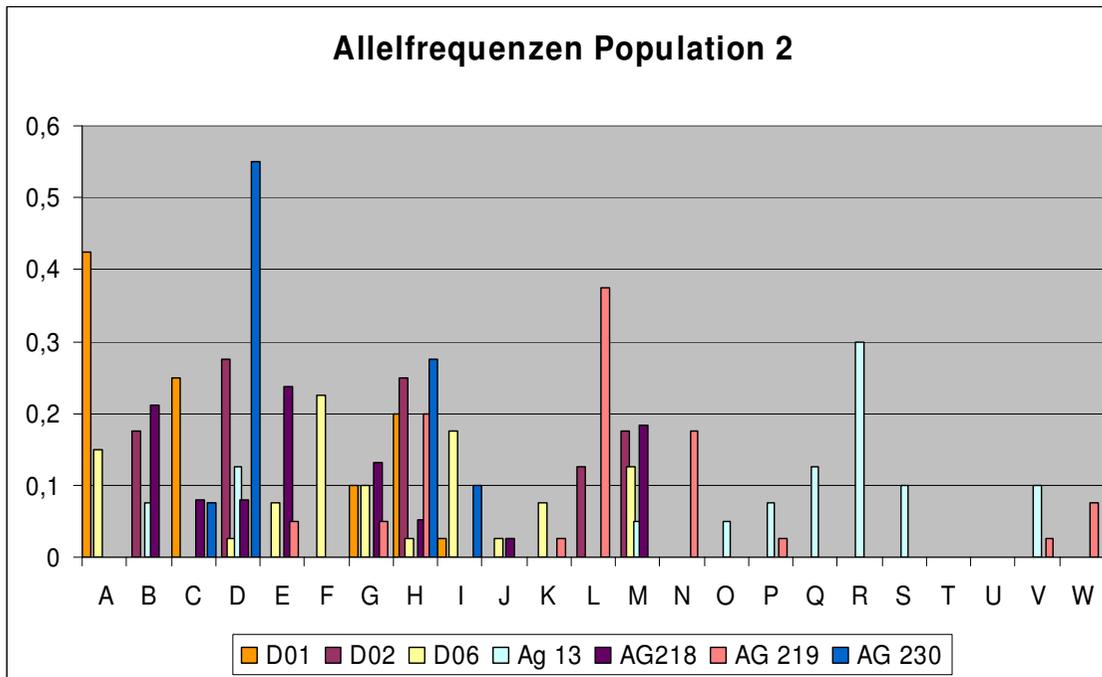
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,675		0,0556				
B						0,4474		
C		0,2	0,025			0,1316		0,0526
D			0,425		0,4211			0,6053
E				0,1667		0,1842		
F				0,2222		0,0263	0,0263	
G		0,1	0,1			0,1842	0,0263	
H		0,025	0,05	0,1944			0,2368	0,0789
I			0,05			0,0263	0,0789	0,2632
J			0,025	0,2778			0,1842	
K							0,0526	
L			0,3	0,0278	0,0789		0,1579	
M			0,025		0,0526			
N							0,1053	
O					0,0263		0,0263	
P				0,0556	0,2105		0,0789	
Q							0,0263	
R					0,1842			
S					0,0263			
T								

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	40	0.5500	0.4500	0.4936	0.5064	0.4937	0.5453
D02	40	0.4000	0.6000	0.2692	0.7308	0.7125	0.5647
D96	36	0.2778	0.7222	0.1762	0.8238	0.8009	0.7290
AG13	38	0.2105	0.7895	0.2461	0.7539	0.7341	0.6931
AG218	38	0.3158	0.6842	0.2674	0.7326	0.7133	0.6646
AG219	38	0.1579	0.8421	0.1209	0.8791	0.8560	0.6417
AG230	38	0.4211	0.5789	0.4296	0.5704	0.5554	0.5541
Mean	38	0.3333	0.6667	0.2861	0.7139	0.6951	0.6275
St. Dev		0.1344	0.1344	0.1324	0.1324	0.1286	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



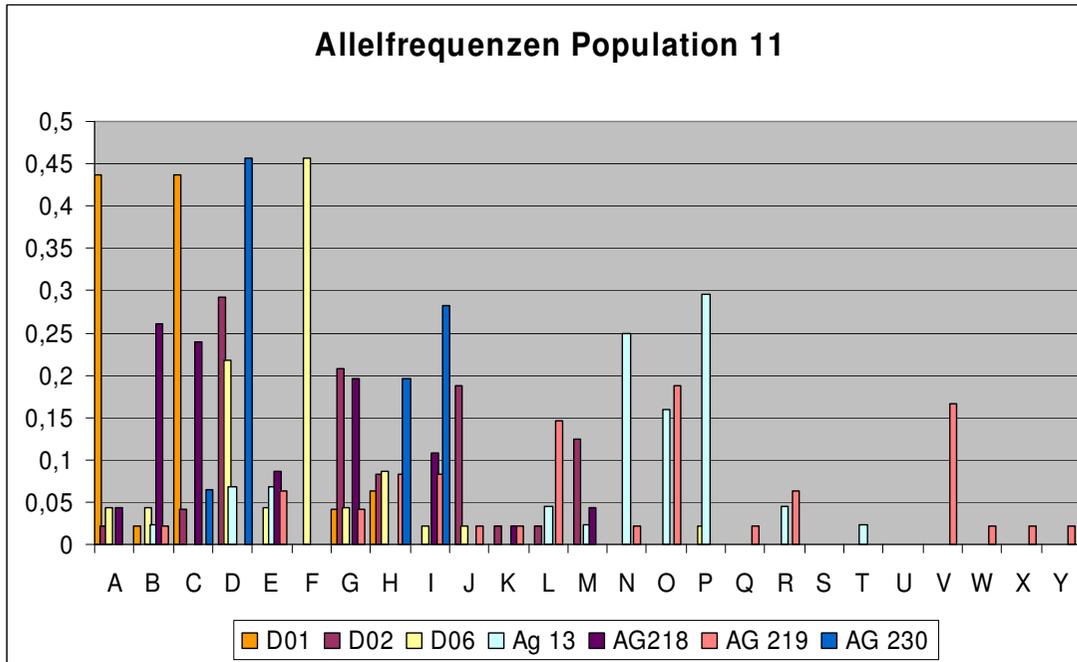
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,425		0,15				
B			0,175		0,075	0,2105		
C		0,25				0,0789		0,075
D			0,275	0,025	0,125	0,0789		0,55
E				0,075		0,2368	0,05	
F				0,225				
G		0,1		0,1		0,1316	0,05	
H		0,2	0,25	0,025		0,0526	0,2	0,275
I		0,025		0,175				0,1
J				0,025		0,0263		
K				0,075			0,025	
L			0,125				0,375	
M			0,175	0,125	0,05	0,1842		
N							0,175	
O					0,05			
P					0,075		0,025	
Q					0,125			
R					0,3			
S					0,1			
T								
U								
V					0,1		0,025	
W							0,075	

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	NeI**	Ave_Het
D01	40	0.3500	0.6500	0.2756	0.7244	0.7063	0.5453
D02	40	0.2500	0.7500	0.1949	0.8051	0.7850	0.5647
D96	40	0.1500	0.8500	0.1205	0.8795	0.8575	0.7290
AG13	40	0.1000	0.9000	0.1359	0.8641	0.8425	0.6931
AG218	38	0.1579	0.8421	0.1451	0.8549	0.8324	0.6646
AG219	40	0.2500	0.7500	0.2038	0.7962	0.7762	0.6417
AG230	40	0.5000	0.5000	0.3782	0.6218	0.6062	0.5541
Mean	40	0.2511	0.7489	0.2077	0.7923	0.7723	0.6275
St. Dev		0.1375	0.1375	0.0918	0.0918	0.0894	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity

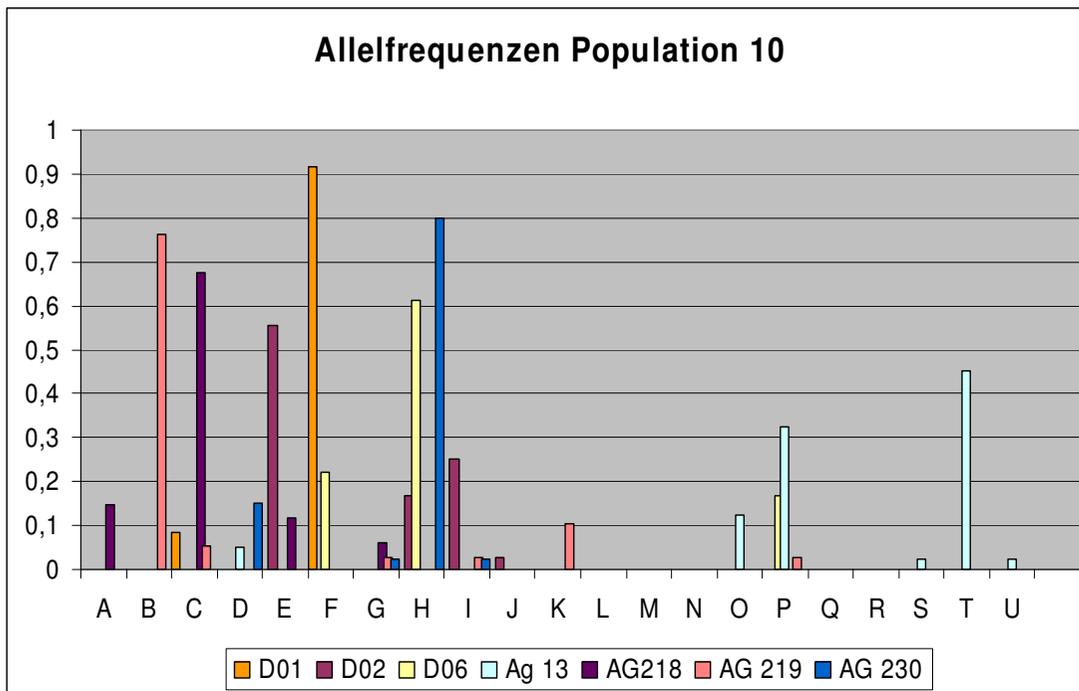


	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,4375	0,0208	0,0435		0,0435		
B		0,0208		0,0435	0,0227	0,2609	0,0208	
C		0,4375	0,0417			0,2391		0,0652
D			0,2917	0,2174	0,0682			0,4565
E				0,0435	0,0682	0,087	0,0625	
F				0,4565				
G		0,0417	0,2083	0,0435		0,1957	0,0417	
H		0,0625	0,0833	0,087			0,0833	0,1957
I				0,0217		0,1087	0,0833	0,2826
J			0,1875	0,0217			0,0208	
K			0,0208			0,0217	0,0208	
L			0,0208		0,0455		0,1458	
M			0,125		0,0227	0,0435		
N					0,25		0,0208	
O					0,1591		0,1875	
P				0,0217	0,2955			
Q							0,0208	
R					0,0455		0,0625	
S								
T					0,0227			
U								
V							0,1667	
W							0,0208	
X							0,0208	
Y							0,0208	

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	48	0.3333	0.6667	0.3759	0.6241	0.6111	0.5453
D02	48	0.0833	0.9167	0.1720	0.8280	0.8108	0.5647
D96	46	0.4348	0.5652	0.2560	0.7440	0.7278	0.7290
AG13	44	0.2727	0.7273	0.1712	0.8288	0.8099	0.6931
AG218	46	0.0870	0.9130	0.1691	0.8309	0.8129	0.6646
AG219	48	0.3333	0.6667	0.0922	0.9078	0.8889	0.6417
AG230	46	0.3043	0.6957	0.3159	0.6841	0.6692	0.5541
Mean	47	0.2641	0.7359	0.2218	0.7782	0.7615	0.6275
St. Dev		0.1320	0.1320	0.0986	0.0986	0.0965	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)



** Nei's (1973) expected heterozygosity

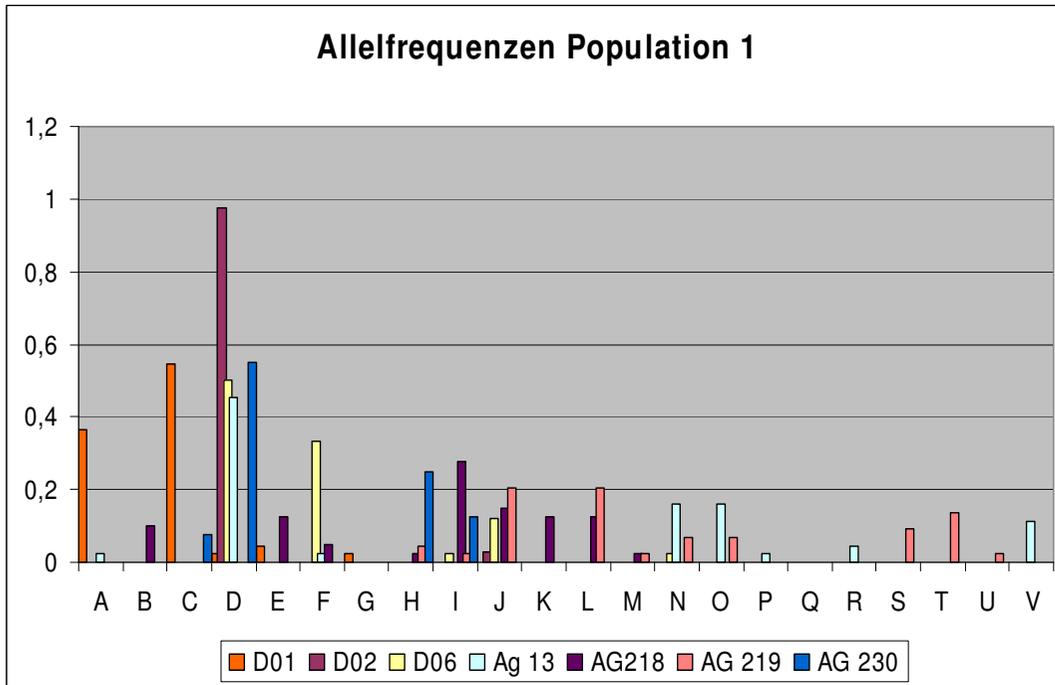
Allele	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A						0,1471		
B							0,7632	
C		0,0833				0,6765	0,0526	
D						0,05		0,15
E			0,5556			0,1176		
F		0,9167		0,2222				
G						0,0588	0,0263	0,025
H			0,1667	0,6111				0,8
I			0,25				0,0263	0,025
J			0,0278					
K							0,1053	
L								
M								
N								
O					0,125			
P				0,1667	0,325		0,0263	
Q								
R								
S					0,025			
T					0,45			
U					0,025			

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	36	0.8333	0.1667	0.8429	0.1571	0.1528	0.5453
D02	36	0.3889	0.6111	0.3825	0.6175	0.6003	0.5647
D96	36	0.5556	0.4444	0.4349	0.5651	0.5494	0.7290
AG13	40	0.3500	0.6500	0.3103	0.6897	0.6725	0.6931
AG218	34	0.7059	0.2941	0.4813	0.5187	0.5035	0.6646
AG219	38	0.6842	0.3158	0.5875	0.4125	0.4017	0.6417
AG230	40	0.6500	0.3500	0.6551	0.3449	0.3362	0.5541
Mean	37	0.5954	0.4046	0.5278	0.4722	0.4595	0.6275
St. Dev		0.1752	0.1752	0.1818	0.1818	0.1769	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



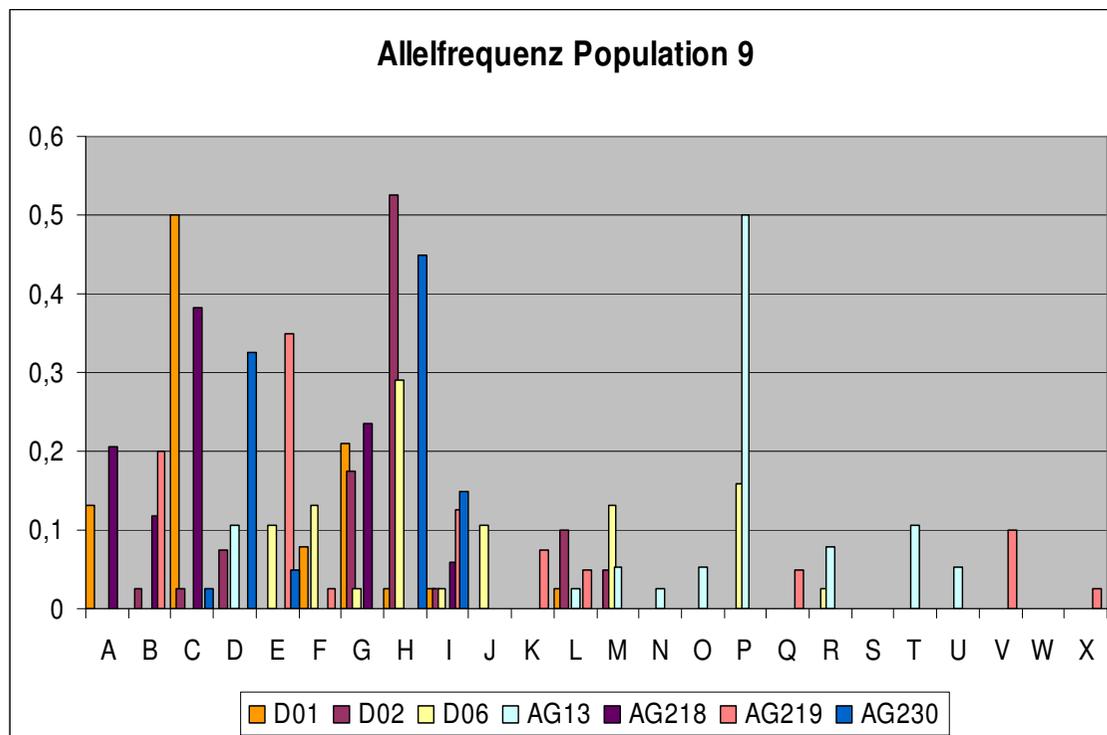
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,3636			0,0227			
B						0,1		
C		0,5455						0,075
D		0,0227	0,9737	0,5	0,4545			0,55
E		0,0455				0,125		
F				0,3333	0,0227	0,05		
G		0,0227						
H						0,025	0,0455	0,25
I				0,0238		0,275	0,0227	0,125
J			0,0263	0,119		0,15	0,2045	
K						0,125		
L						0,125	0,2045	
M						0,025	0,0227	
N				0,0238	0,1591		0,0682	
O					0,1591		0,0682	
P					0,0227			
Q								
R					0,0455			
S							0,0909	
T							0,1364	
U							0,0227	
V					0,1136			
W								
X								
Y								
Z							0,1136	

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	44	0.4545	0.5455	0.4197	0.5803	0.5671	0.5453
D02	38	0.9474	0.0526	0.9474	0.0526	0.0512	0.5647
D96	42	0.2381	0.7619	0.3612	0.6388	0.6236	0.7290
AG13	44	0.3182	0.6818	0.2569	0.7431	0.7262	0.6931
AG218	40	0.1000	0.9000	0.1372	0.8628	0.8413	0.6646
AG219	44	0.3182	0.6818	0.1163	0.8837	0.8636	0.6417
AG230	40	0.5000	0.5000	0.3705	0.6295	0.6138	0.5541
Mean	42	0.4109	0.5891	0.3727	0.6273	0.6124	0.6275
St. Dev		0.2712	0.2712	0.2791	0.2791	0.2725	0.0733

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



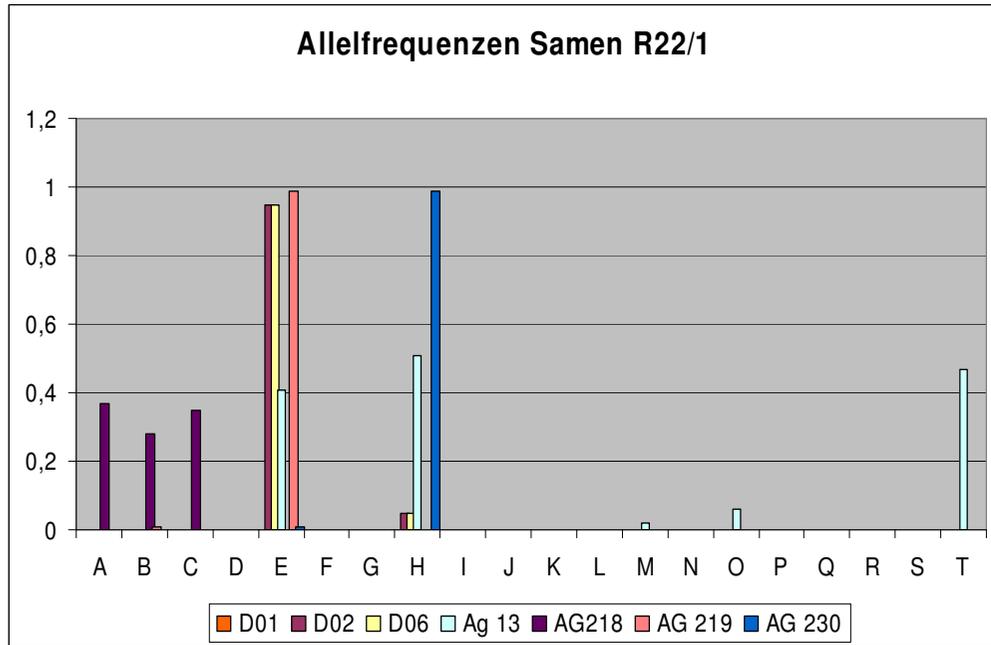
	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
Allele								
A		0,1316				0,2059		
B			0,025			0,1176	0,2	
C		0,5	0,025			0,3824		0,025
D			0,075		0,1053			0,325
E				0,1053			0,35	0,05
F		0,0789		0,1316			0,025	
G		0,2105	0,175	0,0263		0,2353		
H		0,0263	0,525	0,2895				0,45
I		0,0263	0,025	0,0263		0,0588	0,125	0,15
J				0,1053				
K							0,075	
L		0,0263	0,1		0,0263		0,05	
M			0,05	0,1316	0,0526			
N					0,0263			
O					0,0526			
P				0,1579	0,5			
Q							0,05	
R				0,0263	0,0789			
S								
T					0,1053			
U					0,0526			
V							0,1	
W								
X							0,025	

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
D01	38	0.2632	0.7368	0.3016	0.6984	0.6801	0.5453
D02	40	0.5000	0.5000	0.3090	0.6910	0.6738	0.5647
D96	38	0.2632	0.7368	0.1451	0.8549	0.8324	0.7290
AG13	38	0.3684	0.6316	0.2688	0.7312	0.7119	0.6931
AG218	34	0.2353	0.7647	0.2389	0.7611	0.7388	0.6646
AG219	40	0.4500	0.5500	0.1795	0.8205	0.8000	0.6417
AG230	40	0.6000	0.4000	0.3167	0.6833	0.6663	0.5541
Mean	38	0.3829	0.6171	0.2514	0.7486	0.7290	0.6275
St. Dev		0.1391	0.1391	0.0671	0.0671	0.0652	0.0733

* Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene (1949)

** Nei's (1973) expected heterozygosity



Allele	Locus	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A						0,37		
B						0,28	0,01	
C						0,35		
D								
E			0,95	0,41			0,99	0,01
F								
G		0,5						
H			0,05	0,51				0,99
I								
J		0,5						
K								
L								
M				0,02				
N								
O				0,06				
P					0,5306			
Q								
R								
S								
T				0,4694				

	D01	D02	D06	AG13	Ag 218	AG 219	AG 230
Mutter:	GG	EH	EH	PT	AC	EE	HH

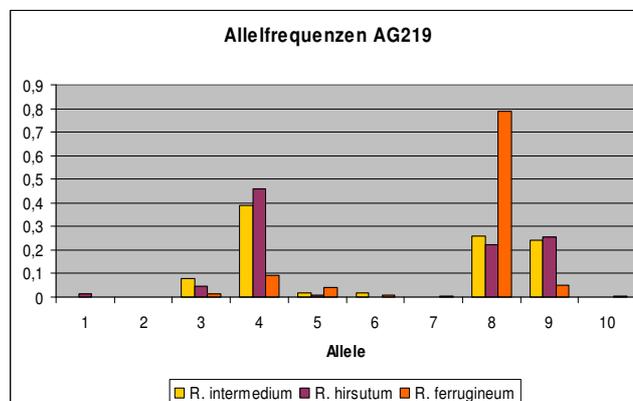
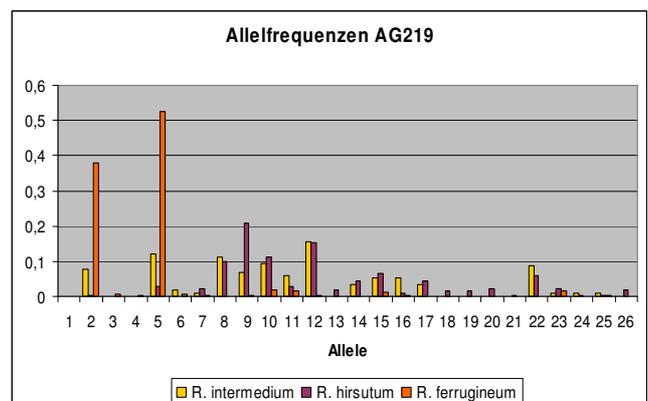
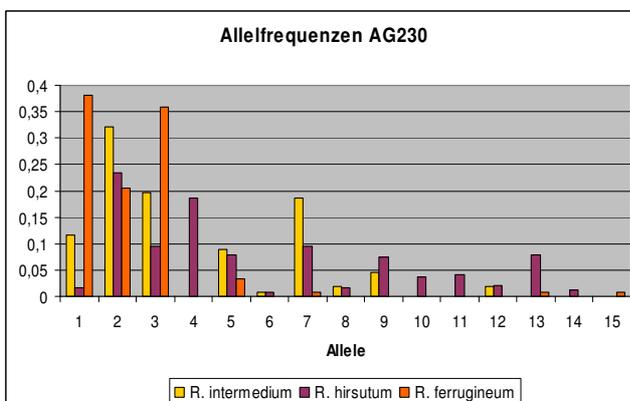
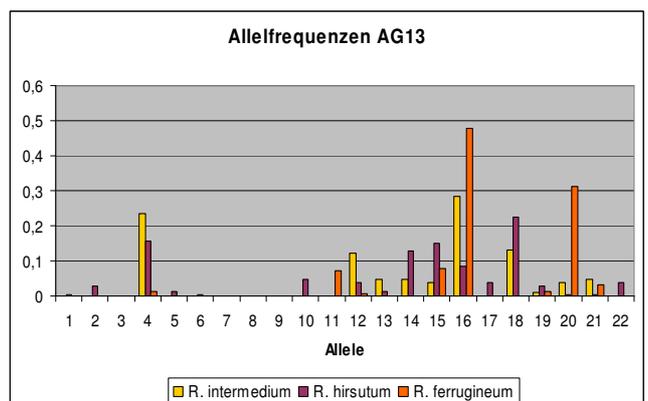
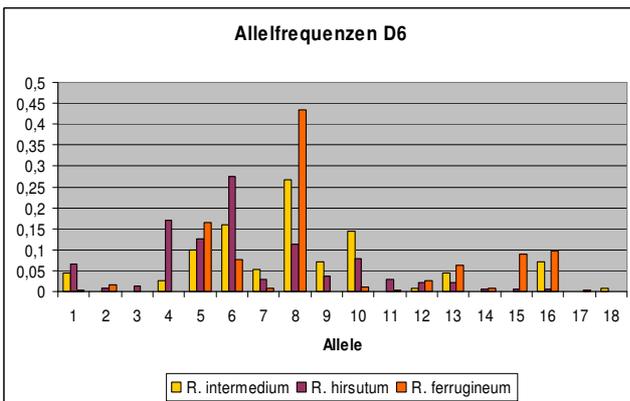
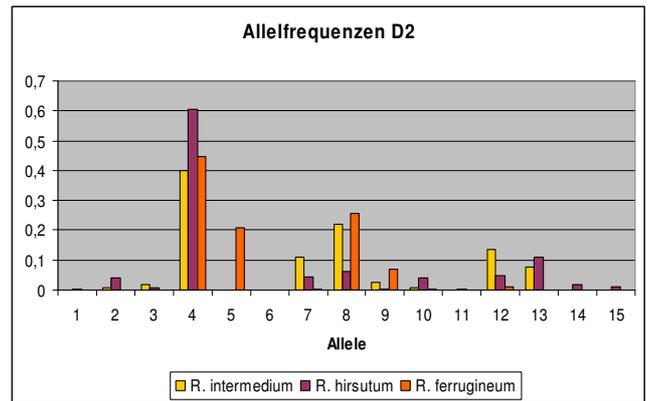
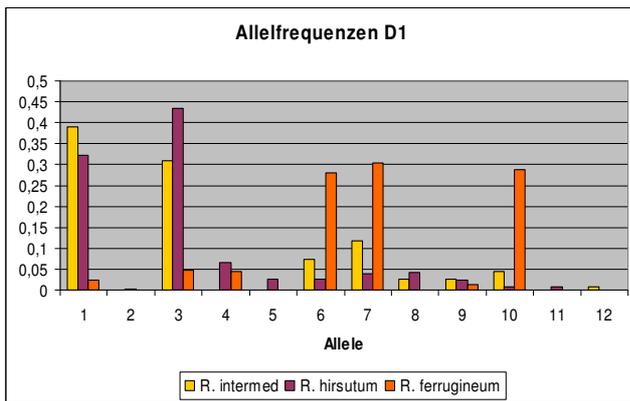
Vergleich der Allelfrequenze der 3 Spezies R.ferrugineum, hirsutum und intermed.

Locus	D1			D2			D8			AG13			AG218			AG219			AG230			
	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2										
Allele A	0,39	0,32	0,02		0		0,04	0,07	0	0	0,12	0,02	0,38	0,12	0,02	0,38	0,08	0	0,38	0,08	0,05	0,02
Allele B	0			0,01	0,04			0,01	0,01	0,03	0,32	0,23	0,21	0,2	0,1	0,36		0,01	0,08	0,05	0,02	
Allele C	0,31	0,43	0,06	0,02	0,01			0,01			0,2	0,1	0,36	0,19				0,01	0,08	0,05	0,02	
Allele D		0,07	0,04	0,4	0,8	0,45	0,03	0,17	0,24	0,16	0,16	0,01	0,19	0,08	0,03	0,12	0,03	0,53	0,02	0,01	0,04	
Allele E		0,03				0,21	0,1	0,13	0,01	0,01	0,01		0,08	0,08	0,03	0,12	0,03	0,53	0,02	0,01	0,04	
Allele F	0,07	0,03	0,28				0,16	0,28	0,08	0	0,01	0,01		0,01	0,01	0,02		0,01	0,01	0,02	0,01	
Allele G	0,12	0,04	0,3	0,11	0,04	0	0,05	0,03	0,01		0,19	0,1	0,01	0,19	0,1	0,01	0,01	0,02	0			
Allele H	0,03	0,04		0,22	0,08	0,28	0,27	0,11	0,43		0,02	0,02		0,02	0,02		0,11	0,1	0,28	0,22	0,78	
Allele I	0,03	0,02	0,01	0,03	0	0,07	0,07	0,04			0,04	0,08		0,04	0,08		0,07	0,21	0	0,24	0,25	0,05
Allele J	0,05	0,01	0,29	0,01	0,04	0	0,14	0,08	0,01	0,05	0	0,04		0	0,04		0,09	0,11	0,02			0
Allele K		0,01			0			0,03	0		0	0,07		0	0,04		0,08	0,03	0,01			
Allele L	0,01			0,14	0,05	0,01	0,01	0,02	0,03	0,12	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02		0,18	0,15	0			
Allele M				0,08	0,11		0,04	0,02	0,08	0,05	0,01		0,08	0,01	0,01		0	0,02				
Allele N					0,02			0	0,01	0,05	0,13		0,01				0,03	0,04				
Allele O					0,01			0	0,09	0,04	0,15	0,08		0,01			0,05	0,07	0,01			
Allele P							0,07	0	0,1	0,28	0,08	0,48					0,05	0,01	0			
Allele Q									0	0,04							0,03	0,04				
Allele R							0,01			0,13	0,23						0,02	0,02				
Allele S										0,01	0,03	0,01						0,02				
Allele T										0,04	0	0,31						0,02				
Allele U									0,05	0	0,03							0				
Allele V											0,04						0,09	0,08				
Allele W																	0,01	0,02	0,01			
Allele X																	0,01	0				
Allele Y																	0,01	0	0			
Allele Z																		0,02				

G3: R. intermedium

G1: R. hirsutum

G2: R. ferrugineum



1.8 Populationsgenetische Analysen der Gewebekultur-Samenherkünfte

12	Locus	Sample Size	D01	6
			D02	8
			D06	8
			AG13	8
			AG218	8
			AG230	8

13	Locus	Sample Size	D01	4
			D02	8
			D06	6
			AG13	6
			AG218	8
			AG230	8

14	Locus	Sample Size	D01	4
			D02	6
			D06	6
			AG13	0
			AG218	6
			AG230	6

15	Locus	Sample Size	D01	8
			D02	8
			D06	8
			AG13	10
			AG218	10
			AG230	10

17	Locus	Sample Size	D01	6
			D02	6
			D06	6
			AG13	6
			AG218	6
			AG230	6

22	Locus	Sample Size	D01	10
			D02	10
			D06	2
			AG13	6
			AG218	10
			AG230	10

16	Locus	Sample Size	D01	10
			D02	10
			D06	10
			AG13	10
			AG218	10
			AG230	10

18	Locus	Sample Size	D01	12
			D02	14
			D06	12
			AG13	12
			AG218	14
			AG230	14

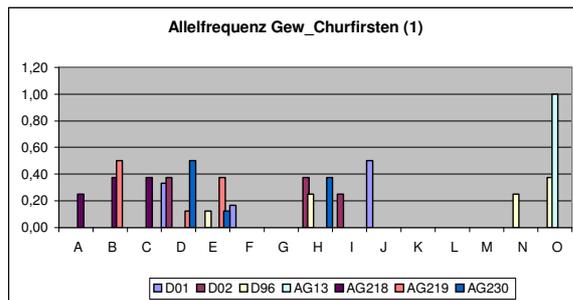
19	Locus	Sample Size	D01	14
			D02	16
			D06	14
			AG13	16
			AG218	12
			AG230	16

20	Locus	Sample Size	D01	12
			D02	12
			D06	10
			AG13	6
			AG218	12
			AG230	12

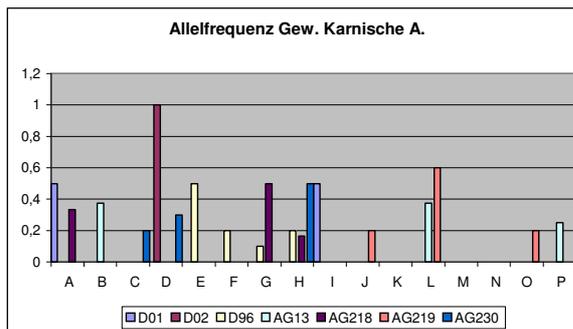
21	Locus	Sample Size	D01	10
			D02	10
			D06	10
			AG13	8
			AG218	6
			AG230	10

Allelfrequenzen

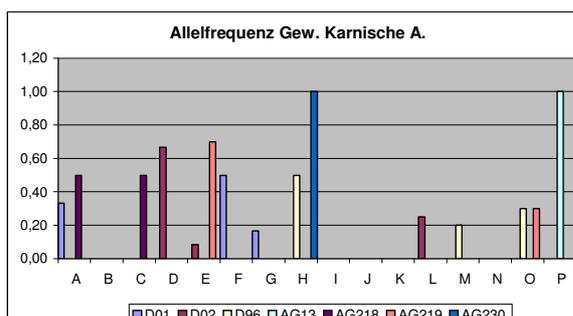
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A					0,25		
B					0,38	0,50	
C					0,38		
D	0,33	0,38				0,13	0,50
E			0,13			0,38	0,13
F	0,17						
G							
H		0,38	0,25				0,38
I		0,25					
J	0,50						
K							
L							
M							
N			0,25				
O			0,38	1,00			



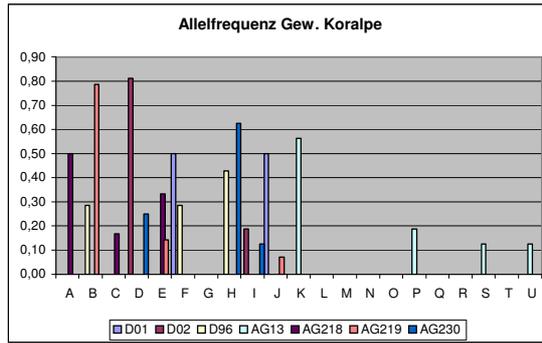
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A	0,5				0,3333		
B				0,375			
C							0,2
D		1					0,3
E			0,5				
F			0,2				
G			0,1		0,5		
H			0,2		0,1667		0,5
I	0,5						
J						0,2	
K							
L				0,375		0,6	
M							
N						0,2	
O							
P				0,25			



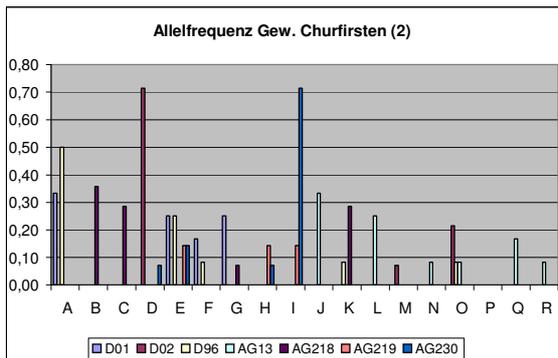
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A	0,33				0,50		
B							
C					0,50		
D		0,67					
E		0,08				0,70	
F	0,50						
G	0,17						
H			0,50				1,00
I							
J							
K							
L		0,25					
M			0,20				
N							
O			0,30			0,30	
P				1,00			



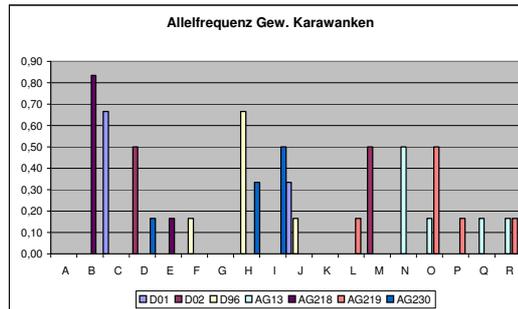
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A					0,50		
B			0,29			0,79	
C					0,17		
D		0,81					0,25
E					0,33	0,14	
F	0,50		0,29				
G							
H			0,43				0,63
I		0,19					0,13
J	0,50					0,07	
K				0,56			
L							
M							
N							
O							
P				0,19			
Q							
R							
S				0,13			
T							
U				0,13			



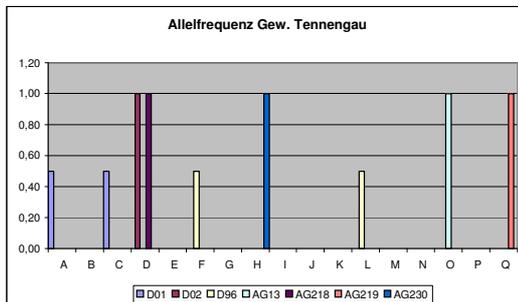
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A	0,33		0,50				
B					0,36		
C					0,29		
D		0,71					0,07
E	0,25		0,25			0,14	0,14
F	0,17		0,08				
G	0,25				0,07		
H						0,14	0,07
I						0,14	0,71
J				0,33			
K			0,08		0,29		
L				0,25			
M		0,07					
N				0,08			
O		0,21	0,08	0,08			
P							
Q				0,17			
R				0,08			
S							
T							
U						0,43	
V							0,14
W							



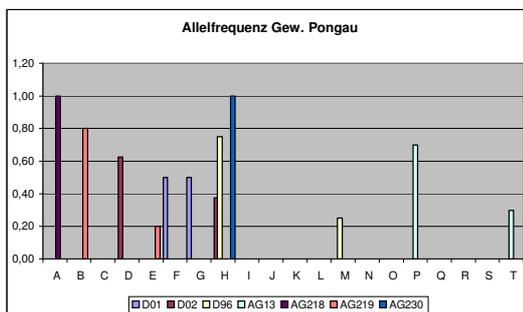
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A							
B					0,83		
C	0,67						
D		0,50					0,17
E					0,17		
F			0,17				
G							
H			0,67				0,33
I							0,50
J	0,33		0,17				
K							
L							0,17
M		0,50					
N				0,50			
O				0,17		0,50	
P						0,17	
Q				0,17			
R				0,17		0,17	



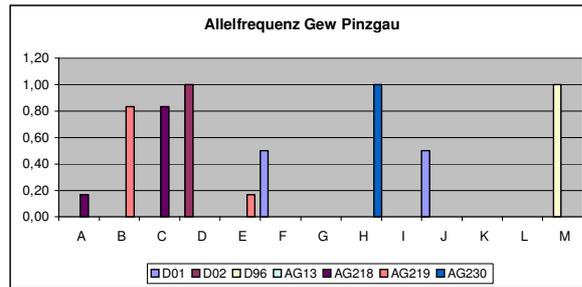
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A	0,50						
B							
C	0,50						
D		1,00			1,00		
E							
F			0,50				
G							
H							1,00
I							
J							
K							
L			0,50				
M							
N							
O				1,00			
P							
Q						1,00	



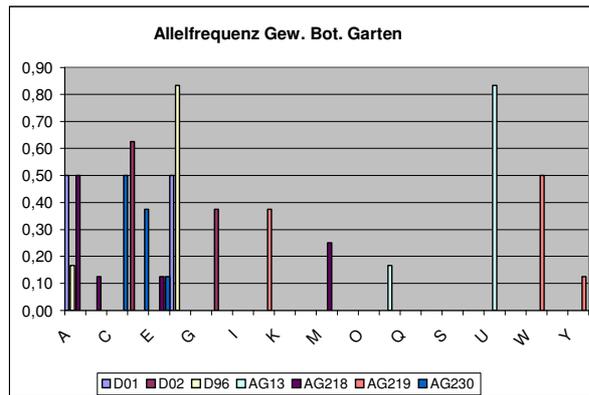
Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A					1,00		
B						0,80	
C							
D		0,63					
E						0,20	
F	0,50						
G	0,50						
H		0,38	0,75				1,00
I							
J							
K							
L							
M			0,25				
N							
O							
P				0,70			
Q							
R							
S							
T				0,30			



Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A					0,17		
B						0,83	
C					0,83		
D		1,00					
E						0,17	
F	0,50						
G							
H							1,00
I							
J	0,50						
K							
L							
M			1,00				



Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A	0,50		0,17		0,50		
B					0,13		
C							0,50
D		0,63					0,38
E					0,13		0,13
F	0,50		0,83				
G							
H		0,38					
I							
J						0,38	
K							
L							
M					0,25		
N							
O							
P				0,17			
Q							
R							
S							
T				0,83			
U							
V							
W						0,50	
X							
Y							0,13



Allele \ L	D01	D02	D96	AG13	AG218	AG219	AG230
A							
B					0,20		
C	0,70				0,10		
D		1,00			0,20		0,30
E	0,10						
F			1,00				
G						0,25	
H							0,10
I							0,60
J					0,20	0,50	
K	0,20						
L				0,17		0,13	
M						0,13	
N				0,17	0,30		
O				0,17			
P							
Q							
R							
S				0,33			
T							
U				0,17			

