



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Chloroplasten-DNS basierende Stammesgeschichte der
Gattung *Argentina* (Rosaceae)

Verfasst von

Jelena Martinovic

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: ao. Univ. Prof. Dr. Johannes Saukel

Meinen Eltern.

Danksagung

Ich danke Herrn ao. Univ.-Prof. Dr. Johannes Saukel für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Pharmakobotanik absolvieren zu dürfen.

Der Arbeitsgruppe um Frau Univ.-Prof. Dr. Verena Dirsch danke ich für Zeit und Raum, die es ermöglichten, einen Teil meiner praktischen Arbeit auszuführen.

Für das zur Verfügung gestellte Herbarmaterial und die Erlaubnis zum “destructive sampling“ danke ich dem Naturhistorischen Museum Wien, für die Bereitstellung der DNS- Extrakte möchte ich mich bei Herrn Dr. Juraj Paule bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. Christoph Dobeš, für die zahlreichen Hilfestellungen und lehrreichen Gespräche, ohne welche meine Diplomarbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Für die bedingungslose Unterstützung durch meine gesamte Studienzeit danke ich meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Charakterisierung der <i>Rosaceae</i> und <i>Potentilleae</i> sensu lato	1
1.2. Potentilleae	2
2. Phylogenie	7
2.1. Gen- und Art- Phylogenie.....	7
2.2. Voraussetzungen für die stammesgeschichtliche Rekonstruktion.....	7
3. Pharmazeutische und kulturelle Bedeutung der Gattung <i>Argentina</i>	9
4. Zielsetzung.....	10
5. Material und Methodik	11
5.1. Pflanzenmaterial	11
5.1.1. Zahl und Arten der Proben	11
5.2. Test von Extraktionsmethoden	11
5.2.1. DNS-Extraktion nach CTAB-Methode nach Doyle & Doyle 1987	11
5.2.2. DNS-Extraktion mit „Genomic DNA NucleoSpin II Plant- Kit“ von Macherey-Nagel.....	12
5.3. PCR.....	13
5.3.1. ausgewählte Marker.....	13
5.3.2. PCR- Bedingungen	16
5.3.3. Erfolgscheck Elektrophorese.....	18
5.3.4. Aufreinigung der Produkte	18
5.4. Sequenzierung.....	18
5.4.1. Cycle Sequencing, elektrophoretische Auftrennung	18
5.5. Assembling und Alignment	20
5.6. stammesgeschichtliche Rekonstruktion.....	20
5.6.1. Outgroup.....	21

6. Ergebnisse.....	22
6.1. Darstellung der wesentlichen Resultate bei den unterschiedlich gewählten Parametersettings.....	22
6.1.1. DNS- Extraktion nach CTAB-Methode nach Doyle und DNS- Extraktion mit „Genomic DNA NucleoSpin II Plant- Kit“ von Macherey- Nagel	22
6.1.2. PCR- Variation	22
6.2. Statistik Amplifikationserfolg	24
6.3. Beschreibung der Marker	25
6.3.1. Längenvariation	25
6.3.2. Charakterisierung der sequenzierten Region.....	25
6.3.3. Länge des Alignments	26
6.3.4. Anzahl der Mutationen	26
6.4. stammesgeschichtliche Rekonstruktion.....	27
6.4.1. Zahl der verwendeten Marker pro Probe.....	34
6.4.2. Beschreibung der Auflösung der Genbäume und der verwandtschaftlichen Beziehungen	35
7. Diskussion	37
7.1. Methodendiskussion	37
7.1.1. Diskussion der Extraktionsmethoden	37
7.1.2. Diskussion der unterschiedlichen Magnesiumkonzentration und PCR-Programme	37
7.2. Diskussion des Amplifikationserfolgs.....	38
7.3. Diskussion der Eignung der Marker	42
7.3.1. Variabilität im Vergleich.....	42
7.4. Diskussion der Phylogenie	42
8. Zusammenfassung	
.....	45
9. Summary.....	47

10. Tabellenverzeichnis	49
11. Abbildungsverzeichnis	50
12. Quellenverzeichnis	51
13. Anhang.....	53
13.1. verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte	53
13.2. Material: geographische Herkunft, Sammelhistorie	54
13.3. Alignment	59
14. Lebenslauf.....	94

1. Einleitung

Die Gattung *Argentina* aus der Familie der Rosengewächse wurde erst vor kurzem auf Basis morphologischer Merkmale als eigene Gattung abgegrenzt.

Dabei sind einige Fragen offengeblieben. So gibt es unterschiedliche, zum Teil auch widersprüchliche, auf morphologischen Merkmalen gestützte Meinungen verschiedener Autoren zur Frage der Abgrenzung der Gattung *Argentina* von den nahe verwandten Gattungen *Tylosperma* und *Piletophyllum*.

Das Ziel meiner Diplomarbeit ist, mithilfe von molekularen Merkmalen, auf Basis der Chloroplasten- Desoxyribonukleinsäure (DNS), die Stammesgeschichte der Gattung *Argentina* aufzuklären.

1.1 Charakterisierung der *Rosaceae* und *Potentilleae* sensu lato

Zur Familie der *Rosaceae* (Rosengewächse) werden ca. 95 Gattungen mit rund 3000 Arten gezählt. Die Vertreter der Familie sind weltweit verbreitet, mit einem Verbreitungsschwerpunkt in der nördlich- gemäßigten Zone. Der Habitus der Rosengewächse ist sehr vielgestaltig. Vertreten sind Kräuter, Halbsträucher, Sträucher und Bäume, die meist als ausdauernde, seltener auch in einjährigen Lebensformen vorkommen. Die Blätter sind je nach Art unterschiedlich gestaltet, entweder einfach, gefiedert, fiederschnittig oder - wie bei den Potentillen - handförmig zusammengesetzt, wobei die Blattstellung der meisten Arten wechselständig ist. Das Charakteristikum für einen Großteil der Arten sind die Stipel (Nebenblätter). Die Blüten sind in fünf Kelch- und fünf Kronblätter gegliedert. Der Fruchtknoten ist artspezifisch entweder ober- oder unterständig und entweder aus einem oder vielen, nicht verwachsenen Fruchtblättern aufgebaut. Auch die Art der Früchte variiert zwischen den einzelnen Gattungen. Es sind sowohl Stein- und Nussfrüchte, als auch Sammelsteinfrüchte, Sammelnussfrüchte und Sammelbalgfrüchte vertreten. [1, 2]

Aufgrund molekularphylogenetischer Untersuchungen werden die Rosengewächse in drei Unterfamilien gegliedert:

Taxonomisch betrachtet, nehmen sie folgende Stellung ein [1]:

- Großreich: *Eukaryota*

- Reich: *Embryophyta*
- Überabteilung: *Tracheophyta* (Gefäßpflanzen)
- Abteilung: *Spermatophyta* (Samenpflanzen)
- Unterabteilung: *Angiospermae* (Bedecktsamer)
- Klasse: *Rosopsida* (Dreifurchenpollen- Zweikeimblättrige)
- Unterklasse: *Rosidae* (Rosenpflanzen)
- Überordnung: *Rosanae* (Rosenblütige)
- Ordnung: *Rosales* (Rosenartige)
- Familie: *Rosaceae* (Rosengewächse)
- **Unterfamilie:** - *Rosoideae*
 - *Dyoideae*
 - *Spiraeoideae*

Dabei ist Taxonomie „die hierarchische Klassifizierung von Organismen auf wissenschaftlicher Grundlage“ ([4] S. 1843).

Die Kelchblätter einiger Vertreter der *Rosoideae* bilden Stipeln aus. Durch Verwachsung dieser Stipel kommt es zur Ausbildung eines Außenkelchs.

Nun möchte ich genauer auf die Tribus der *Potentilleae* (Fingerkrautförmige) der *Rosoideae* eingehen, mit deren Gattungen/Arten ich mich im Laufe meiner Diplomarbeit auseinandergesetzt habe:

1.2. Potentilleae

Die Tribus *Potentilleae* umfasst 19 Gattungen mit ca. 1700 Arten, die vorwiegend auf der nördlichen Hemisphäre beheimatet sind- mit einer Ausnahme: *Lachemilla* Rydb., einer Gattung der Subtribus *Fragariinae*, dessen Hauptdiversitätszentrum die südliche Hemisphäre ist [3, 5].

Der tschechische Botaniker Jiří Soják, der viele Jahre die Tribus *Potentilleae* auf Basis morphologischer Merkmale erforscht hat, nahm eine Einteilung der Tribus *Potentilleae* in vier Subtriben vor [6], die er nach Unterschieden in der Struktur der Antheren traf, wobei damals noch keine Abgrenzung der Gattung *Argentina* stattfand:

- Subtribus *Potentillinae*, charakterisiert durch Antheren mit zwei Theken, zu der folgende sechs Gattungen zählen:
 - *Potentilla* L.
 - *Horkelia* Cham. & Schltldl.

- *Ivesia* Torr. & A.Gray
 - *Stellariopsis* Rydb.
 - *Tylosperma* Botsch.
 - *Piletophyllum* Soják
- Subtribus *Fragariinae*, charakterisiert durch Antheren mit einer Theke, die bis auf die Basis der Antheren, das gesamte Konnektiv umfasst und folgende zehn Gattungen enthält:
 - *Fragaria* L.
 - *Comarum* L.
 - *Farinopsis* Chrtek & Soják
 - *Schistophyllidium* (Juz. Ex Fed) Ikonn.
 - *Sibbaldia* L.
 - *Sibbaldianthe* Juz.
 - *Sibbaldiopsis* Rydb.
 - *Drymocallis* Fourr. Ex Rydb.
 - *Potaninia* Maxim.
 - *Dasiphora* Raf.
- Subtribus *Chamaerhodotinae*, charakterisiert durch Antheren mit einer lateralen Theke, das auch die Basis, also das gesamte Konnektiv umfasst und nur eine Gattung enthält:
 - *Chamaerodos* Bunge
- Subtribus *Alchemillinae*, charakterisiert durch Antheren mit einer elliptischen Theke an der ventralen Seite des Konnektivs und folgende drei Gattungen umfasst:
 - *Alchemilla* L.
 - *Aphanes* L.
 - *Lachemilla* Rydb.

Die erste Abgrenzung der Gattung *Argentina* von der Gattung *Potentilla* innerhalb des Tribus *Potentilleae* erfolgte 1756 durch John Hill anhand morphologischer Charakteristika [7]. Diese Abgrenzung wurde 1908 durch Rydberg bestätigt, der sich dabei hauptsächlich auf die Art der Griffel-Insertionen berief. So hat *Potentilla s.str.* subterminal angesetzte Griffel, während sie bei *Argentina* lateral inseriert sind [7]. Rydbergs Konzept wurde von den wenigsten späteren Autoren akzeptiert, so auch ursprünglich (1989) nicht von J. Soják, der dies damit begründete,

dass der einzige Unterschied, auf dem die Abgrenzung basiert, also die Art der Griffelinsertion, erstens, bei einigen Arten nur schwer festzustellen ist und zweitens, die Griffel bei zehn asiatischen Arten der „*Argentina*- Gruppe“ mehr oder weniger subterminal angesetzt sind [7]. 2010 stieß J. Soják dann auf ein für ihn verlässliches morphologisches Charakteristikum zur Abgrenzung der Gattung *Argentina*. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Gattungen betrifft die Stipel (Nebenblätter). Diese sind bei *Potentilla s.str.* nur lateral angewachsen, während sie bei *Argentina* zusätzlich ventral verwachsen sind [7]:

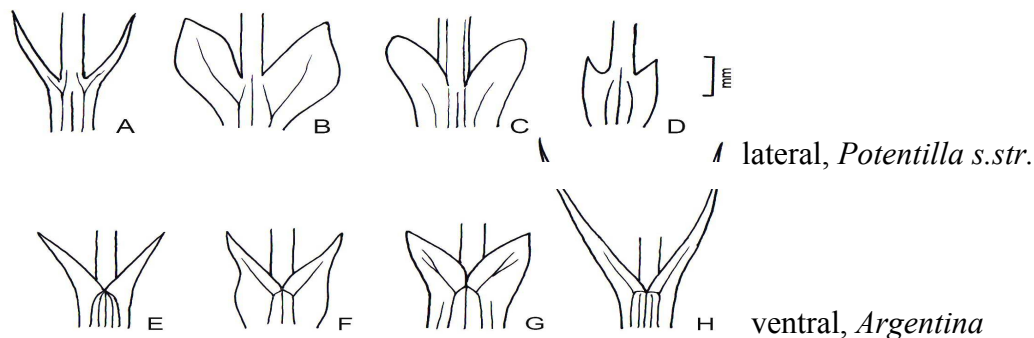


Abbildung 1: Vergleich der Nebenblätter von *Potentilla* und *Argentina* [7]

Auf DNS- molekularer Ebene wurde diese morphologische Abgrenzung von Eriksson et al. (2003) bestätigt. Die Aussagekraft des Stammbaums war aufgrund der geringeren Anzahl von untersuchten Arten eingeschränkt, wurde aber durch Dobeš & Paule (2010) gestützt. In dieser phylogenetischen Studie wurden 14 Arten der Subtribus *Fragariinae* und über 80 Spezies der Subtribus *Potentillinae* auf Basis der Chloroplasten-DNS untersucht, wodurch man zu dem Ergebnis kam, dass die *Potentillinae* zwei evolutionäre Linien bilden. Eine Linie beinhaltete 69 Arten der Gattung *Potentilla s.str.* und vier Arten der amerikanischen Gattungen *Ivesia* und *Horkelia*, während die andere von *Potentilla anserina* L., *Potentilla leuconota* (D.Don), *Piletophyllum micropetalum* (D.Don) Soják und *Tylosperma lignosa* (Willd.) Botsch gebildet wurde. [8]

Der Stammbaum zeigt deutlich, dass *Argentina* inklusive *Tylosperma* und *Piletophyllum* eine isolierte und abgegrenzte Entwicklungslinie bilden. [8]

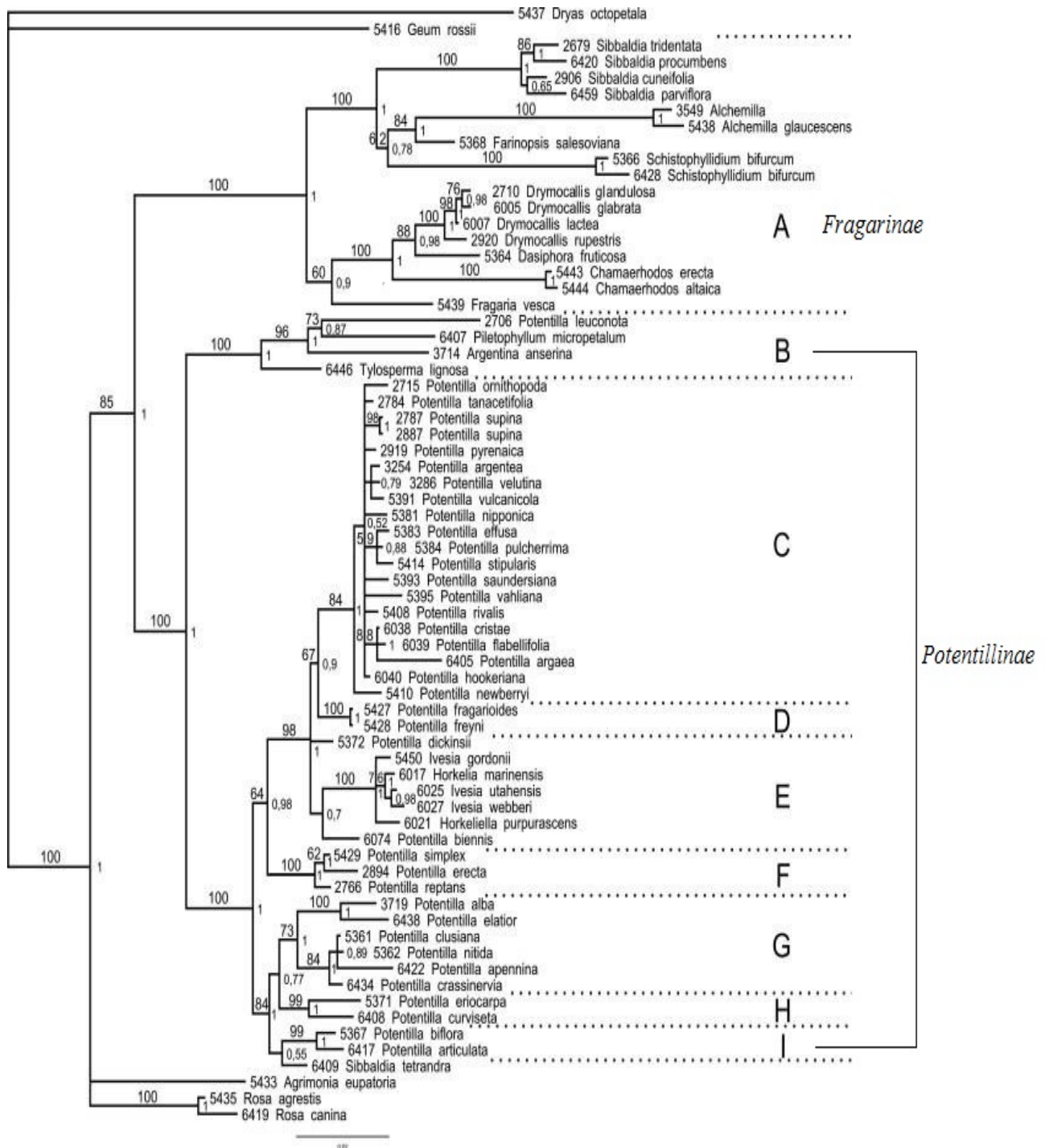


Abbildung 2: Stammbaum der Gattung *Potentilleae* basierend auf Plastidensequenzen [8]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Ergebnisse der morphologischen und molekularen Methoden größtenteils decken. Jedoch stützen sich die molekularen Befunde nur auf eine geringe Anzahl von Arten.

Fraglich ist, ob *Tylosperma* und *Piletophyllum* in die Gattung *Argentina* fallen, da diese von J. Soják morphologisch als eigene Gattungen abgegrenzt wurden. Einerseits aufgrund der lateralen

Griffelininsertionen, andererseits nennt J. Soják bei *Tylosperma* zwei weitere mögliche Abgrenzungsunterschiede [7]:

- verhärtete und verdickte Basis der Achänen
- die Beweglichkeit der Blütenstiele und der Blattstiele an der Basis

Betreffend *Piletophyllum* gibt es unterschiedliche Meinungen verschiedener Autoren. So wurden die *Piletophyllum*- Arten von Yü & Li 1985, Rajput et al. 1997, Dikshit & Panigrahi 1998 und schließlich 2003 von Li, Ikeda und Ohba der Gattung *Sibbaldia* der Subtribus *Fragariinae* zugeteilt [6]. Diese Einteilung widerspricht jener J. Sojáks, nach der *Piletophyllum* aufgrund der Antheren mit zwei Theken (bei *Fragariinae* haben die Vertreter nur ein Thekum) in die *Potentillinae* fällt [7].

Ich möchte daher in meiner Arbeit versuchen, die verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der Tribus *Potentilleae*, speziell der Subtribus *Potentillinae*, genauer aufzuschlüsseln.

2. Phylogenie

Phylogenie oder Stammesgeschichte beschreibt die evolutionäre Entwicklung eines Taxons und dessen verwandtschaftliche Beziehungen [9].

Der Begriff Phylogenie wurde 1866 vom deutschen Zoologen Ernst Haeckel geprägt, der auch als Begründer des phylogenetischen Stammbaums, der Darstellung der stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsbeziehungen von Organismen, gilt [4].

2.1. Gen- und Art- Phylogenie

Der phylogenetische Artbegriff definiert eine Art als eine Individuengruppe mit einem gemeinsamen Vorfahren. Der Vorfahre und die davon abgeleiteten Individuen bilden dabei gemeinsam einen Ast des phylogenetischen Stammbaumes. Dies wird als Monophylie bezeichnet. [9]

„So ist auch das Leben selbst, zumindest auf der Erde- vermutlich nur einmal entstanden, und alle Lebewesen der Erde gehören in diesem Sinne einer monophyletischen Gruppe an.“

([9], S. 49)

Um das Ziel einer phylogenetischen Analyse, das Auffinden monophyletischer Gruppen, zu erreichen, ist es notwendig, wenige besonders informative Merkmale zu benutzen. Dabei sind die Merkmale der Wahl, DNS-Sequenzen.

Für jeden Marker oder „Gen“ (hier nicht biologische Definition von Gen gemeint) wird zunächst ein Stammbaum rekonstruiert, der Genbaum.

Die verschiedenen Genbäume werden auf Kongruenz geprüft. Stimmen diese überein, ist dies ein starkes Indiz für die Findung der tatsächlichen evolutionären Geschichte, genauer der Art-Phylogenie. Dabei ist ein Artbaum umso besser aufgelöst, je mehr übereinstimmende Daten die einzelnen Genbäume aufweisen. [9]

2.2. Voraussetzungen für die stammesgeschichtliche Rekonstruktion

- Homologisierbarkeit

Homologie bezeichnet „die nicht-zufällige Übereinstimmung von Merkmalen, die auf ursprüngliche, gemeinsame, also genetische Information zurückgeht“ ([9], S. 290).

In der molekularen Phylogenetik ist die Definition der Merkmale einfach, da deren Komplexität (vier Basen) sehr gering ist.

Im Gegensatz dazu, zeigen morphologische Merkmale eine viel höhere Komplexität, was eine Homologisierung auf tieferen Niveaus (Gattungen, Arten) oft unmöglich macht [9]. Ein Beispiel für ein morphologisches Merkmal, das zur Unterscheidung auf tieferem Niveau herangezogen werden kann, wäre die Variation der Griffelposition der *Potentilleae*:

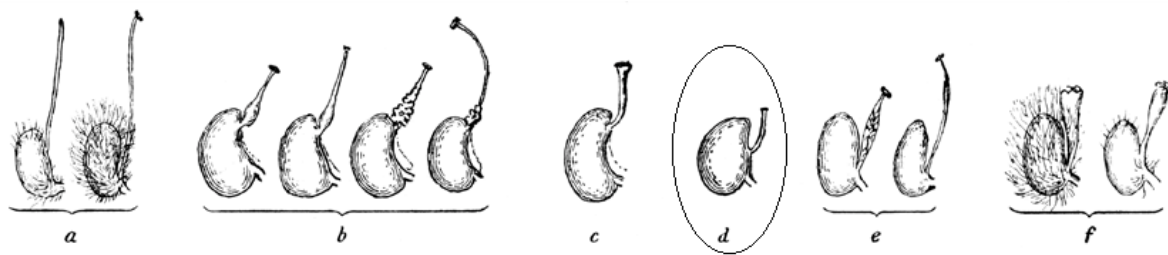


Abbildung 3: Griffelposition der *Potentilleae* nach Wolf (1908) [10]

- a) Nematostylae
- b) Conostylae
- c) Gomphostylae
- d) Leptostylae (entspricht Gattung *Argentina*)
- e) Closterostylae
- f) Rhopalostylae

- hohe Merkmalszahlen

Einen erheblichen Vorteil bietet die molekulare Phylogenie bezüglich der quasi unerschöpflichen Menge von Merkmalen, die herangezogen werden können. Diese hohe Merkmalszahl ermöglicht vor allem eine bessere statistische Auswertung der Daten und somit eine Beurteilung, wie zuverlässig die Topologie (Verzweigungsmuster) eines Stammbaumes ermittelt wurde [9].

- Komplexität

Phylogenie auf molekularer Basis, folgt einfachen Prinzipien, die wenig Vorwissen erfordern. Im Gegensatz dazu setzt Phylogenie auf morphologischer Basis ein profundes morphologisches Verständnis voraus.

3. Pharmazeutische und kulturelle Bedeutung der Gattung *Argentina*

Volksmedizinische und historische Belege zeigen die schon lange zurückliegende Verwendung des Gänsefingerkrauts (*Argentina anserina*) als Arzneimittel. Diese langjährige Anwendung und die zahlreichen Erfahrungsberichte, führten dazu, dass *Argentina anserina*, genauer *Herba Argentinae* in das Österreichische Arzneibuch aufgenommen wurde [11].

Erstmals wird *Argentina anserina* in den Schriften von Dioskurides erwähnt, zur Behandlung von Diarrhö, Ruhr und Epilepsie [12].

Bis heute werden die oberirdischen Anteile der *Argentina anserina* volksmedizinisch vor allem aufgrund des hohen Gerbstoffgehalts von 5–10% und der darauf zurückzuführenden adstringierenden Wirkung, in Form von Tees, Tinkturen, Lösungen und topischen Zubereitungen bei folgenden Beschwerden eingesetzt: bei viralen Infektionen oder generell bei Immunschwäche, bei akuter, unspezifischer Diarrhö mit leichten Beschwerden. Auch bei leichten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhaut sowie bei Zahnschmerzen kommen sie zur Anwendung. [13]

In neueren Publikationen wird dem Gänsefingerkraut spasmolytische Wirksamkeit zugeschrieben, die mit der des Papaverin Hydrochlorids verglichen werden kann [13].

Des Weiteren zeigen ärztliche Erfahrungsberichte den therapeutischen Nutzen von Extrakten der Droge bei dysmenorrhoeischen Beschwerden, durch die Wirkung auf den Tonus und die Kontraktion der glatten Muskulatur des Uterus [14]. Auch eine antivirale Wirkung gegen Herpesviren wurde beobachtet. Diese basiert vermutlich auf der antioxidativen Wirkung der enthaltenen Polyphenole [13].

Bisher sind weder toxische Wirkungen noch Nebenwirkungen oder Wechselwirkungen durch Anwendung der Droge bekannt. Einzig eine Studie (Rodewald, 1950) konnte den kardiotoxischen Effekt der *Argentina anserina* auf Meerschweinchen und Katzen zeigen. [13]

Folgende Inhaltsstoffe sind in *Argentina anserina* enthalten [13]:

Triterpenoide, Proanthocyanidine sowie hydrolysierbare Tannine.

Flavonoide mit großer struktureller Variabilität mit dem charakteristischen Merkmal der mono-, di- als auch tri- Hydroxy -Substitution des Ringes B als auch Flavonoide, die als O-Glykoside

und O-Glucuronide vorliegen, finden sich in *Argentina anserina*.

Auch Cumarine, organische Säuren und Phenolcarbonsäuren, sowie Sterole, Zucker, Aminosäuren und Fettsäuren sind in den ober- als auch unterirdischen Pflanzenanteilen vorliegend.

4. Zielsetzung

Mein Ziel ist die Aufklärung der stammesgeschichtlichen Position sowie die Charakterisierung von *Argentina* auf Basis von Chloroplasten-DNS.

Als Voraussetzung teste ich auf Amplifizierbarkeit und Sequenzierbarkeit sowie Variabilität verschiedener Plastidenregionen.

Meine Untersuchungen werden dabei vor allem auf wissenschaftlichem Herbarmaterial basieren, neben einigen Garten-Akzessionen.

Speziell stelle ich die folgenden drei Fragen:

1. Ist *Argentina* eine eigenständige Gattung, im Sinne einer monophyletischen Gruppe?
2. Sind *Piletophyllum* und *Tylosperma* eigenständige Gattungen oder fallen diese in die Gattung *Argentina*?
3. Weisen die unterschiedlichen Genbäume Kongruenz auf und resultiert daraus ein Artbaum?

5. Material und Methodik

5.1. Pflanzenmaterial

5.1.1. Zahl und Arten der Proben

Insgesamt wurden 64 Individuen unterschiedlicher Quellen analysiert (siehe Anhang 13.2.):

- Garten- Akzessionen aus dem Arzneigarten Pharmakognosie, die mit Silikagel getrocknet wurden, vier Individuen;
- Herbarmaterial aus dem Naturhistorischen Museum (NHM) Wien, 29 Individuen;
- bereits extrahierte DNS- Proben aus Herbarmaterial des Herbarium Görlitz, 24 Individuen;
- Silikagel getrocknetes Material aus der Sammlung von Dr. Christoph Dobeš, vier Individuen;
- NCBI- Datenbank- Akzessionen; drei Individuen;

5.2. Test von Extraktionsmethoden

Vor Extraktion des gesamten Probenmaterials wurden mit einigen ausgewählten Proben (frisch gesammeltes, Silikagel getrocknetes Material sowie sehr altes Herbarmaterial) zwei Methoden der DNS- Extraktion miteinander verglichen.

5.2.1. DNS-Extraktion nach CTAB-Methode nach Doyle & Doyle 1987

Die Extraktion der Gesamt- DNS folgte Doyle & Doyle [15] (leicht modifiziert).

Zuerst wurde das Blattmaterial (+/- 10 mg) zusammen mit zwei Glaskugeln als Mahlkörper in 2ml Reaktionsgefäßen 10 Minuten lang, bei 30 Hertz, mittels Schwingmühle MM 200 (Firma Retsch) gemahlen. Das pulverisierte Blattmaterial wurde jeweils mit 700µl einer Mischung aus 15µl Isolationspuffer und 30µl Mercaptoethanol versetzt und 30 Minuten lang, auf dem Wasserbad bei 60°C, mehrmals invertiert.

Die Reaktionsgefäße wurden anschließend auf Eis gestellt und sofort mit jeweils 500µl einer frisch zubereiteten Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) versetzt und 15 Minuten stengelassen.

Es folgte das Abzentrifugieren, 5 Minuten bei 4°C und 13.000 Umdrehungen, sowie vorsichtiges Abpipettieren von ca. 600µl der wässrigen Phase und Überführen dieser in ein 1,5ml Reaktionsgefäß. Die organische Phase wurde verworfen.

Um die in der wässrigen Phase vorliegende DNS auszufällen, wurden 450µl Isopropanol (aus dem Kühlschrank) zugesetzt, mehrmals invertiert, danach 20 Minuten lang bei -20°C inkubiert. Erneutes Abzentrifugieren, 5 Minuten bei 4°C und 13.000 Umdrehungen.

Möglichst vollständiges Abpipettieren des Überstands, ohne dabei das DNS-Pellet am Boden zu verletzen.

Zur Reinigung der DNS wurden 180µl 70% Ethanol hinzugefügt, vorsichtig geschüttelt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach 2 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand möglichst restlos entfernt und der Reinigungsschritt wiederholt.

Um das Pellet vollständig zu trocknen, wurden die Eppendorf-Gefäße offen, 15 Minuten lang, in einen Exsikkator unter Vakuum gestellt. Das Pellet wurde in 50µl TE-Puffer bei 37°C gelöst, jedem Extrakt wurden 2µl Ribonuklease A zugesetzt bei 40°C auf dem Wasserbad eine Stunde lang inkubiert.

Zur Prüfung der Länge und Konzentration der DNS-Extrakte wurde eine Gelelektrophorese auf einem 0,6% Agarosegel durchgeführt.

5.2.2. DNS-Extraktion mit „Genomic DNA NucleoSpin II Plant- Kit“ von Macherey- Nagel

Das mittels Schwingmühle MM 200 (Firma Retsch) pulverisierte Blattmaterial wurde jeweils mit 400µl PL1- Puffer und 10µl RNase A-Lösung versetzt und gevortext. Die Mischung wurde 10 Minuten bei 65°C auf dem Wasserbad inkubiert.

Zur Filtration wurden die Proben in die Filtrationssäulchen (NucleoSpin Filter) übertragen und 2 Minuten lang zentrifugiert. Das Filtrat wurde jeweils mit 450µl PC-Puffer versetzt und gevortext, danach in die Extraktionssäulchen (NucleoSpin Plant II Column) übertragen und 1 Minute lang zentrifugiert. Die auf der Silicamembran zurückbleibende DNS wurde in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit 400µl PW1-Puffer, mit 700µl PW2-Puffer und zuletzt mit 200µl PW2-Puffer versetzt und zentrifugiert.

Zur Elution der DNS wurden 50µl PE-Puffer (65°C) zugesetzt, 5 Minuten lang bei 65°C auf dem Wasserbad inkubiert, danach 1 Minute lang zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde zweimal durchgeführt.

5.3. PCR

5.3.1. ausgewählte Marker

Die Primer wurden so gewählt, dass Sequenzabschnitte resultieren, die eine möglichst hohe Mutationsrate aufweisen, da hier eine Auflösung auf sehr tiefem Niveau (Gattungen, Arten) erfolgen soll [9].

In der Plastiden- DNS gibt es im Vergleich zur Kern-DNS relativ geringe Mutationsraten. Da keine sexuelle Rekombination, sondern eine rein maternale Vererbung stattfindet, wird der gesamte Plastid als eine Einheit vererbt, wodurch der Plastid eines Individuums weiters genetisch monomorph ist. [4]

Einen Vorteil bieten diese konservierten Regionen bezüglich ihrer sehr guten Homologisierbarkeit, was für das spätere Alignment der einzelnen Sequenzen wichtig ist [9].

Die Primer-Information wurde aus der Literatur übernommen und anhand der Genomsequenzen von *Potentilla micrantha* (NCBI Akzessionsnummer: HG931056) und *Fragaria chiloensis* (NCBI Akzessionsnummer.: JN884816) modifiziert [16, 17, 18, 19].

Dazu wurde ein „Blast search“ (www.ncbi.com) der publizierten Primer durchgeführt und auf Übereinstimmung mit den Genomsequenzen geprüft. Stimmt diese zu 100% überein, wurden die „Original-Primer“ für die Analysen herangezogen, während bei geringerem Prozentsatz an Übereinstimmung, diese entsprechend der genannten Genomsequenzen modifiziert wurden.

Es wurden acht Primer ausgewählt, mit denen sowohl Intergenic spacer (IGS) als auch Introns amplifiziert wurden. (siehe Tabelle 1)

- Intergenic spacer (IGS)

IGS sind Sequenzabschnitte zwischen Genen, die nicht- kodierend sind und somit höhere Mutationsraten aufweisen. Dabei wurden Primer gewählt, die in benachbarten streng konservierten Regionen (Exons) binden, um Bindung der Primer zu garantieren und so die variablen Regionen amplifizieren zu können. [9]

Zusätzlich wurde für den trnC-ycf6 intergenic spacer noch ein interner Primer (3.) entwickelt, da es sich bei diesem Marker um einen langen Sequenzabschnitt handelt und so - durch Aufteilen der Sequenz - sichergestellt werden kann, dass die gesamte Sequenz amplifiziert wird.

- Intervening region (Intron)

Introns stellen nicht-kodierende Abschnitte innerhalb eines Gens dar. Da diese, wie auch die intergenic spacer, nicht kodieren und somit einer schnelleren Evolution unterliegen, ist auch hier erhöhte Variabilität gegeben. [9]

Alle Primer, forward als auch reverse, wurden jeweils an ihrem 5'-Ende mit einer M13-Extension (5'- GCA TGT TTT CCC AGT CAC GAC-3' bzw. 5'-ACT TCA GGA AAC AGC TAT GAC-3') versehen, welche dann, im Cycle Sequencing als Bindungsregion der Sequenzierprimer dienten.

Tabelle 1: Primer- Charakterisierung

Primer	Sequenz	Länge	Annealingtemp.	Quelle
1. trnH-psbA IGS			64°C	
<i>trnH_forward</i>	CGGGCATGGTGGATTACAAATCC	23		Shaw et al 2005 Do7147
<i>psbA_reverse</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	22		Shaw et al 2005 Do7147
2. trnC-ycf6 IGS			65°C	
<i>trnC_ROSA_forward</i>	CCAGTTCAAATCCGGGTG	18		modifiziert nach Shaw et al. 2005 Do7147
<i>ycf6_ROSA_reverse</i>	GCCCAAGGAGATTACTATATCCAT	26		modifiziert nach Shaw et al. 2005 Do7147
3. trnC-ycf6 IGS primer intern			65°C	
<i>trnC_ycf6_int_forward</i>	GGAAGAATAAGGGTATGGGCT	22		entwickelt für Potentilla-core group/DA Hagenhofer
<i>trnC_ycf6_int_ROSA_reverse</i>	CGGAGATCCCCCTTGGAAATATC	22		modifiziert nach Hagenhofer
4. trnS-ycf9 IGS			63°C	
<i>trnS_forward</i>	GAGAGAGAGGGATTCTGAACC	20		Shaw et al 2005 Do7147
<i>ycf9_ROSA_reverse</i>	CAAAAACAGCCAACTGGAAGC	22		modifiziert nach Heinze, bfw.ac.at/200/2043.html
5. trnL-trnF IGS			59°C	
<i>trnL_forward</i>	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	20		Taberlet 1991 Do5784, primer E
<i>trnF_reverse</i>	ATTTGAACTGGTGACACGAG	20		Taberlet 1991 Do5784, primer F
6. trnL intron			60°C	
<i>trnL_ROSA_forward</i>	CGAAATTGGTAGACGCTAGG	20		modifiziert nach Taberlet 1991 Do5784, primer C
<i>trnL_reverse</i>	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	20		Taberlet 1991 Do5784, primer D
7. trnK-rps16			61°C	
<i>trnK_ROSA_forward</i>	TACTCTACCGTTGAGTTAGCAAC	23		modifiziert nach Johnsohn, L.A. & Soltis, D.E. (1995) Ann.Mo.Bot.Gard. 82, 149-175
<i>rps16_ROSA_reverse</i>	AAAGCGCTCAACCTACAGGAAC	23		modifiziert nach Kress et al. 2005
8. trnV-atpE*			62°C	
<i>trnV_ROSA_forward</i>	GTGTAACGAGGTGCTCTACC	21		modifiziert nach Kress et al. 2005
<i>atpE_reverse</i>	CGACATTTGCACATTTAGATGCTAC	24		Demesure, B., Sodzi, N. & Petit, R.J. (1995) Mol. Ecol. 4, 129-131

*atpE-Primer in Literatur falsch angegeben, Primer liegt im atpB-Gen;

5.3.2. PCR- Bedingungen

Zur Vervielfältigung der gewünschten DNS- Sequenzabschnitte wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, dazu wurde der Thermocycler C1000TM (Firma BIO–RAD) verwendet.

Folgende Komponenten wurden zur Herstellung des sogenannten Mastermix mit einem Reaktionsvolumen von 25µl verwendet:

- das Templat, der DNS-Extrakt, der den zu vervielfältigenden Sequenzabschnitt enthält;
- zwei Primer- einen forward und einen reverse, die jeweils den Startpunkt der DNS-Synthese festlegen;
- DNS- Polymerase, die, den durch die Primer begrenzten DNS- Abschnitt, repliziert; Es wurde die Phire Hot Start Polymerase von Finnzymes eingesetzt, diese weist eine geringere Fehlerquote als die Taq (*Thermus aquaticus*) - Polymerase auf.
- Desoxyribonukleotide (dNTPs), die als Bausteine für den synthetisierten DNS- Strang fungieren;
- Mg^{2+} - Ionen, die als Cofaktor der Polymerase für deren Funktion essentiell sind;
- Reaktionspufferlösung, um ein für die Funktion der DNS- Polymerase bestimmtes Milieu sicherstellen zu können;

Tabelle 2: PCR- Mastermixzusammensetzung

	Ausgangs- konzentration	End- konzentration	Volumen [µl]
Puffer	5x	1x	5
MgCl₂	25mM	0,5/1,5/2,5/3,5 mM	0,5/1,5/2,5/3,5
Ultra H₂O	-	-	16,9/15,9/14,9
dNTPs	25mM each	0,4mM	0,4
Primer 1	10µM	0,2µM	0,5
Primer 2	10µM	0,2µM	0,5
Polymerase	4u/µl	0,8u/µl	0,2
Template	-	-	1
Reaktionsvolumen	-	-	25

Im Zuge meiner Arbeit wurden folgende Parameter variiert um den PCR- Amplifikationserfolg zu optimieren:

1. Variation der Mg^{2+} - Ionen- Konzentration

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an Magnesiumchlorid ausprobiert:

- 2mM Mg^{2+} - Ionen
- 3mM Mg^{2+} - Ionen
- 4mM Mg^{2+} - Ionen
- 5mM Mg^{2+} - Ionen

2. Variation der Annealingtemperatur

Anfangs wurden die einzelnen PCRs mit der für das Primerpaar errechneten Annealingtemperatur durchgeführt (www.sigma.com). Auf Basis der empfohlenen Werte wurden um +/- 4 °C abweichende Annealingtemperaturen ausgetestet.

3. Variation des PCR-Programms

Es wurden einfache (herkömmliche) als auch doppelte Programme verwendet. Beim doppelten PCR-Programm wurden nach Beendigung der ersten 24 Zyklen, den Reaktionsgefäßen jeweils 5µl Mastermix (ohne Primer) zupipettiert, danach wurden weitere 24 Zyklen durchlaufen.

Tabelle 3: PCR- Programme

	einfaches PCR-Programm	doppeltes PCR-Programm
Step 1	98°C, 60 sec	98°C, 60 sec
Step 2	98°C, 10 sec	98°C, 10 sec
Step 3	59-65°C (variabel), 10 sec	59-65°C (variabel), 10 sec
Step 4	72°C, 15 sec	72°C, 15 sec
forever	10°C	skip step to step 1 nach 24 Zyklen
Anzahl der Zyklen (WH step 2-4)	34 x	48 x

5.3.3. Erfolgscheck Elektrophorese

Um den Amplifikationserfolg beurteilen zu können, wurde jedes PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese (0,6% Agarosegel) auf Länge und Quantität überprüft.

Um die Länge des PCR-Produkts festzustellen, wurde eine DNS- Leiter (100 bp DNA-ladder "equalized", Carl Roth) mitlaufen gelassen.

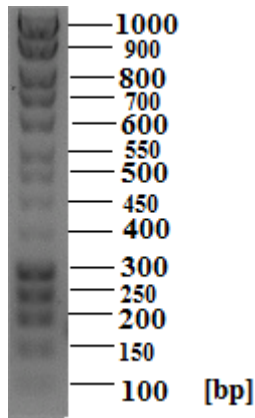


Abbildung 4: DNS- Leiter mit DNS- Fragmentlängen in Basenpaaren (Bp)

5.3.4. Aufreinigung der Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate für das nachfolgende Cycle Sequencing erfolgte mit dem NucleoFast 96 PCR clean-up Kit von Macherey Nagel.

Dazu wurde das gesamte Volumen (ca. 20µl) der einzelnen PCR-Amplifikate jeweils auf die Siebmembran der NucleoFast Platte aufgetragen, auf eine Vakuumkammer platziert und mittels Vakuumpumpe (ca. 700mbar) unter zweimaligem Zusatz von je 100µl Aqua destillata 15 Minuten lang gewaschen. Dadurch erfolgte die Abtrennung der wässrigen Phase, die Salze, unverbrauchte Primer und Nukleotide enthielt, von den PCR- Produkten, die aufgrund ihrer Größe, die ultrafeine Siebmembran, nicht passieren können. Nach Abschalten der Vakuumpumpe wurde die DNS in 20µl Aqua destillata gelöst.

5.4. Sequenzierung

5.4.1. Cycle Sequencing, elektrophoretische Auftrennung

Für die Sequenzierung wurde ein Mastermix (10µl Reaktionsvolumen) folgender Zusammensetzung hergestellt: 1x Reaktionspuffer, Wasser (ultrarein), forward- oder reverse-Primer, Big DyeTM Terminator v3.1 Reaktionsmix (Applied Biosystems).

Die M13-f- / M13-r- Extensions (5' - GCA TGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3' bzw. 5' - ACT TCA GGA AAC AGC TAT GAC - 3') dienen nun als forward- bzw. reverse- Sequenzierprimer.

Das Cycle Sequencing erfolgte auf dem C1000TM Thermocycler mit folgendem Reaktionsprogramm:

Tabelle 4: Cycle Sequencing Programm

	Cycle Sequencing Programm
Step 1	96°C, 60 sec
Step2	96°C, 10 sec
Step 3	48°C reverse- Primer / 50°C forward- Primer, 5 sec
Step 4	60°C, 180 sec
forever	10°C
Anzahl der Zyklen (WH step 2-4)	34

Tabelle 5: Cycle Sequencing- Mastermixzusammensetzung

	Ausgangs- konzentration	End- konzentration	Volumen [µl]
Puffer	5x	1x	2
Ultra H₂O	-	-	2,5
Big Dye	25mM each	0,4mM	1
Primer 1	10µM	0,2µM	0,5
Primer 2	10µM	0,2µM	0,5
Template	-	-	4
Reaktionsvolumen	-	-	10

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit einem 3130x1 Genetic Analyzer Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems) elektrophoretisch aufgetrennt. Dieser Schritt erfolgte durch das Fakultätszentrum für Biodiversität der Uni Wien.

5.5. Assembling und Alignment

Beim Assembling wurden die Elektropherogramme und die daraus resultierenden forward- und reverse- Sequenzen übereinandergelegt (assembliert) und manuell auf Übereinstimmung geprüft, gegebenenfalls nachbearbeitet. Dazu wurde das Programm SeqMan Pro von DNASTAR Lasergene verwendet.

Die aus dem Assembling resultierten Konsensussequenzen wurden in einem nächsten Schritt aligniert. Hierbei war das Ziel, die einzelnen Konsensussequenzen eines Markers so weit wie möglich in Deckung zu bringen (homologisieren), sodass eine minimale Anzahl von Unterschieden (Punktmutationen oder Gaps) zwischen den Sequenzabschnitten resultiert. Die Bearbeitung erfolgte mithilfe des Programms Megalign DNASTAR Lasergene.

5.6. stammesgeschichtliche Rekonstruktion

Die phylogenetische Rekonstruktion wurde mithilfe des Programms PAUP „Phylogenetic Analyses Using Parsimony“ durchgeführt.

Um dieses praktisch auszuführen, wurde die Funktion HSEARCH (heuristic search) als Befehl eingegeben. Diese basiert auf dem Prinzip der Parsimonie, mit dem Ziel, den kürzesten Baum zu finden. [9]

Diese heuristische Suche nach dem optimalen Baum, erfolgt schrittweise. Zuerst wird ein Ausgangsbaum mit drei Sequenzen generiert, an den schrittweise jede der übrigen Sequenzen einzeln angefügt wird, wobei diejenige gewählt wird, die zur kürzesten Baumlänge führt. Der nun aus vier Sequenzen bestehende Baum, bildet die Basis für den nächsten mit fünf Sequenzen, usw. bis sich schließlich alle Sequenzen in einem Gesamtbaum mit kürzester Baumlänge finden. Da es häufig mehr als einen kürzesten Baum gibt, kann eine höhere Anzahl kürzester Bäume gespeichert werden. [9]

Die einzelnen Alignments wurden dazu als NEXUS-Datei in den PAUP-eigenen Texteditor geladen. Dabei wurden nicht eindeutig auswertbare Regionen der Alignments, wie Short tandem repeats (STR) (kurze, sich wiederholende Sequenzmuster) oder strukturell labile Regionen ausgeschlossen.

Zuerst erfolgte die Stammbaumberechnung einzeln für jeden der Marker. Die erhaltenen Genbäume wurden auf Übereinstimmung bzw. Widersprüche geprüft.

Zuletzt wurde ein Stammbaum mit den vereinten Daten gerechnet, auf Basis der gesamten, verfügbaren Sequenzinformation.

Um die erhaltenen Stammbäume graphisch darstellen zu können, wurde die Software FigTree verwendet.

Mit der Funktion CONTREE von PAUP ist es möglich, aus allen kürzesten Bäumen einen Konsensusbaum zu erstellen. Dieser gibt Auskunft darüber, wie konsistent die einzelnen Merkmale des Original- Alignments die Merkmale eines Asts unterstützen.

Jedoch sagt dieser Konsensusbaum nichts darüber aus, durch wie viele Merkmale dies erfolgt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine „Bootstrap- Analyse“ durchgeführt.

Dazu werden aus dem Original- Alignment Merkmale zufällig gezogen, was zu einer Neuerstellung des Alignments führt. Dies dient dem Test auf Redundanz der Daten, das heißt ob eine Gruppe/ ein Ast durch mehr als ein Merkmal gestützt wird. Dieses Verfahren errechnet abschließend wieder den Prozentsatz, mit dem Gruppen in den Bootstrap- Bäumen vorkommen.

[9]

Zur weiteren qualitativen Bewertung der erhaltenen Stammbäume wurde der „consistency index“ (CI) berechnet, der angibt, wie oft die einzelnen Merkmale im Stammbaum mutieren. Ein Wert von 1 bedeutet, dass ein Merkmal nur einmal entstanden ist. Niedrigere Werte erhält man beim Auftreten von Homoplasien. [9] Ein Nachteil des „consistency index“ ist, dass er keine Information darüber liefert, ob die Topologie eines Baumes beeinflusst wird [9].

5.6.1. Outgroup

Eine „outgroup“, zu deutsch Außengruppe dient dazu, einen Stammbaum zu bewurzeln, das heißt einen Ursprung festzulegen, und dem Stammbaum so eine Leserichtung zu geben. Als Außengruppe kommt dabei jenes Taxon in Betracht, das eindeutig entfernter mit allen anderen im Stammbaum vorliegenden Taxa (Innengruppe) verwandt ist, als die Taxa der Innengruppe untereinander. [9]

Als Outgroup wurde *Rosa sp.* gewählt.

6. Ergebnisse

6.1. Darstellung der wesentlichen Resultate bei den unterschiedlich gewählten Parametersettings

6.1.1. DNS- Extraktion nach CTAB-Methode nach Doyle und DNS- Extraktion mit „Genomic DNA NucleoSpin II Plant- Kit“ von Macherey- Nagel

Da sich die durch Elektrophorese sichtbar gemachten DNS- Extrakte der Testreihe in ihrer Bandenintensität bezüglich der Extraktionsmethode nicht unterschieden, wurde das gesamte Herbarmaterial mittels Macherey- Nagel Kit extrahiert.

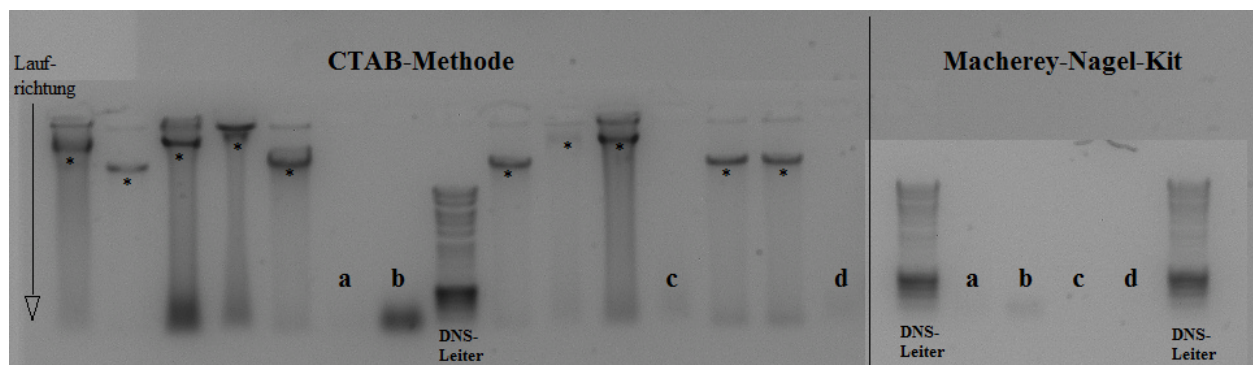


Abbildung 5: Vergleich der Extraktionsmethoden CTAB vs. Macherey- Nagel- Kit

a: Ptl 8774 b: Ptl 8775 c: Ptl 8761 d: Ptl 8785 (Herbarmaterial)

die mit * gekennzeichneten Banden (sowohl mit Silikagel getrocknetes Frischmaterial als auch Herbarmaterial) zeigen lange Fragmentstücke genomischer RNS, die durch die RNase nicht verdaut wurde; diese sind für den Vergleich der Extraktionsmethoden zu vernachlässigen;

6.1.2. PCR- Variation

- Annealingtemperatur

Die errechneten Annealingtemperaturen brachten bei allen Markern das beste Ergebnis.

- Magnesiumkonzentration

Es stellte sich heraus, dass vor allem bei älterem DNS- Material eine höhere Konzentration der Mg^{2+} - Ionen notwendig war, um die bei der Gelelektrophorese resultierenden Banden zu intensivieren, demnach mehr Amplifikationsprodukt zu erhalten.

Ich startete mit einer Konzentration von 2mM Mg^{2+} - Ionen, erhöhte bis 3mM, was vor allem eine Verbesserung des Amplifikationserfolgs bei dem mit Silikagel getrockneten

Frischmaterial brachte.

Für das Herbarmaterial brachte erst eine Mg^{2+} - Ionen- Konzentration von 4mM sichtbaren Erfolg. Eine weitere Erhöhung machte keinen Unterschied.

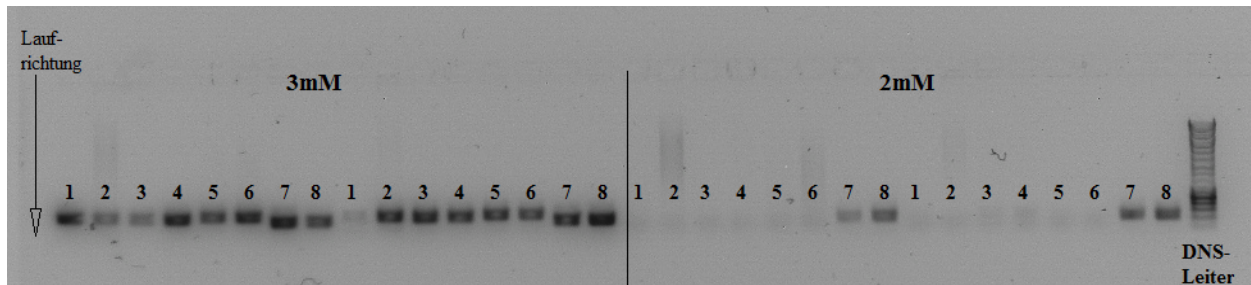


Abbildung 6: Test unterschiedlicher Magnesiumkonzentrationen

Primer: psbA-trnH IGS

Individuen: Ptl 8273, Ptl 8276, Ptl 8277, Ptl 8278, Ptl 8415, Ptl 8416, 10/1, 9/12 (1–8;)

Extraktionsmethode: „Macherey – Nagel“ - Kit

- PCR-Programm

Das doppelte PCR-Programm war entscheidend, um den Amplifikationserfolg der aus dem Herbarmaterial extrahierten DNS, deutlich zu verbessern, wohingegen es bei dem mit Silikagel getrockneten Material zu einer Verschlechterung führte.

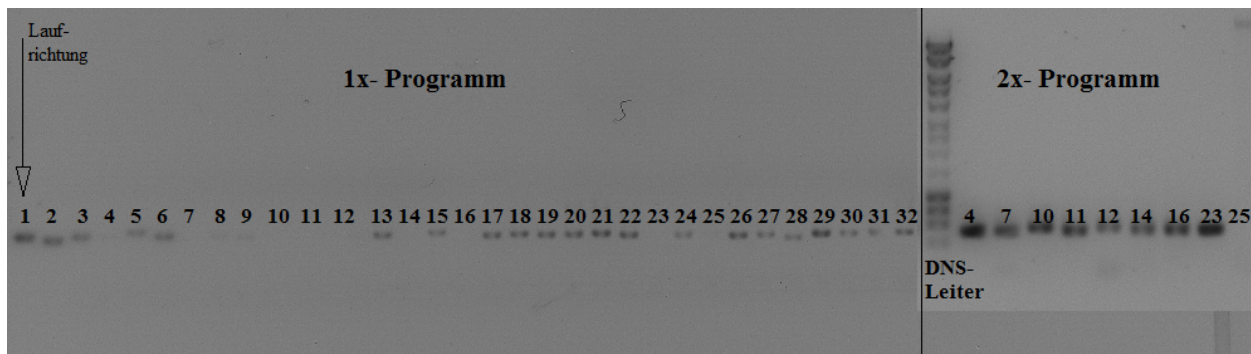


Abbildung 7: Vergleich des PCR- Programms

links: PCR- Programm einfach, 1–32;

Individuen: Ptl 8731–8754 (5–16; 21–32;) (**Herbarmaterial**)

Kontrolle (mit Silikagel getrocknetes Frischmaterial): Ptl 8273; Ptl 8276; Ptl 8277; Ptl 8278; (1–4; 17–20;)

Primer: trnL-trnF IGS

Extraktionsmethode: „Macherey - Nagel“ - Kit

rechts: PCR- Programm doppelt , 4; 7; 10–12; 14; 16; 23; 25;

Individuen: Ptl 8733 (7;) Ptl 8736–8738 (10; 11; 12;) Ptl 8740 (14;); Ptl 8742 (16;); Ptl 8749 (23;); Ptl 8751 (25;)

Kontrolle: Ptl 8728 (4;)

6.2. Statistik Amplifikationserfolg

- Amplifikationserfolg aller 61 DNS- Extrakte pro Marker:

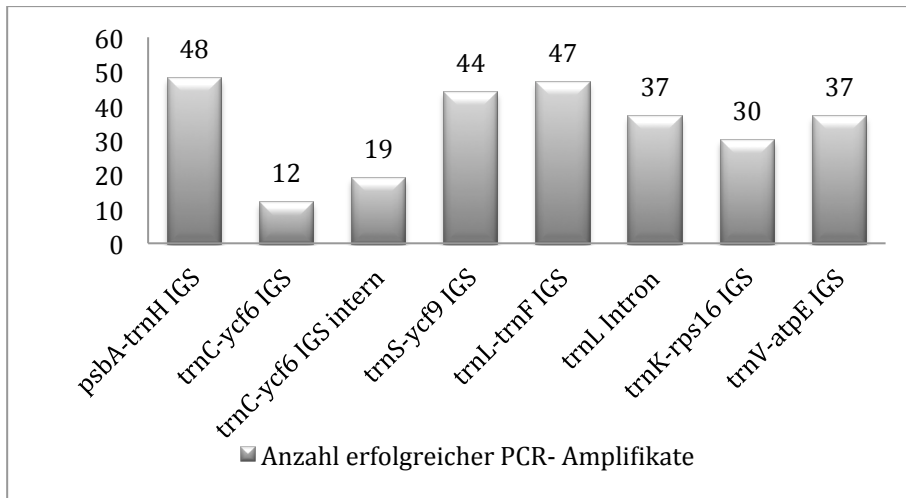


Abbildung 8: Amplifikationserfolg der Marker in Prozent

Von den insgesamt 61 DNS- Extrakten gaben vier mit keinem einzigen der acht Marker ein elektrophoretisch sichtbares Amplifikat und wurden daher im weiteren Verlauf ausgeschlossen. Es handelt sich dabei um DNS- Extrakte aus Herbarmaterial- jeweils zwei aus dem Herbarium Görlitz (Ptl 8733; Ptl 8741;) und zwei aus der Sammlung des NHM Wien (Ptl 8777; Ptl 8785;). Die Amplifikate von drei der insgesamt acht Marker wurden nicht sequenziert, da sie einerseits im Vergleich zu den anderen fünf Markern von der Anzahl der resultierenden Amplifikate geringer ausfielen (trnC-ycf6 IGS intern; trnC-ycf6 IGS;), andererseits die Quantität der DNS zu gering war (trnK-rps16 IGS).

- Amplifikationserfolg in Relation zum Alter des Probenmaterials

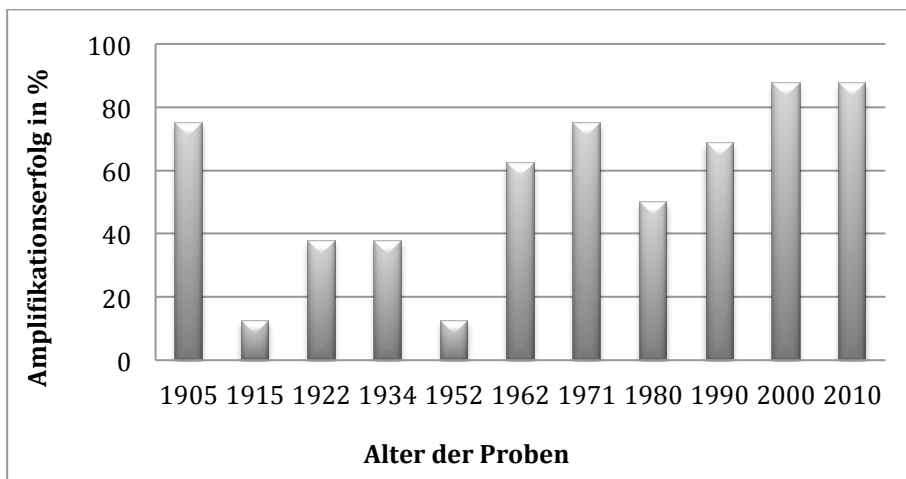


Abbildung 9 : Amplifikationserfolg im Vergleich zum Alter des Probenmaterials

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter des Probenmaterials und dessen Amplifikationserfolg beobachtet werden. Jedoch zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Amplifizierbarkeit in Abhängigkeit der Präparationsart des Probenmaterials: das mit Silikagel getrocknete Material ließ sich zu 100% amplifizieren. Das Herbarmaterial ließ sich abhängig von dessen Quelle, unterschiedlich gut amplifizieren:

Von dem Herbarmaterial des NHM Wien konnten von möglichen 248 (31 Individuen x acht Marker), 121 Amplifikate erstellt werden. Das entspricht 48,8%.

Von dem Herbarmaterial des Herbariums in Görlitz wurden von 192 (24 Individuen x acht Marker) möglichen, 141 Amplifikate erstellt. Das entspricht 73,4 %.

6.3. Beschreibung der Marker

6.3.1. Längenvariation

Tabelle 6: maximale Längen pro Marker, angegeben in Basenpaaren

Marker	Basenpaare
psbA-trnH IGS	560
trnL-trnF IGS	643
trnS-ycf9 IGS	576
trnL Intron	710
trnV-atpB IGS	1409

6.3.2. Charakterisierung der sequenzierten Region

Dazu wurde ein Sequenzabgleich des Alignments mit dem Genom von *Fragaria chiloensis* (NCBI Akzessionsnummer.: JN884816.1) durchgeführt. (www.ncbi.com)

- psbA-trnH IGS
es wurden die letzten 30 Basenpaare des trnH exons, IGS und die ersten 53 Basenpaare des psbA exons sequenziert;
- trnS-ycf9 IGS
es wurden die letzten 71 Basenpaare des trnS-UGA- exons, IGS und die ersten neun Basenpaare des ycf9 exons sequenziert; (ycf9 ist im Genom von *Fragaria chiloensis* als psbZ-Gen annotiert und synonym mit ycf9;)

- trnL-trnF IGS
es wurden die letzten zwei Basenpaare des trnL exons, IGS und die ersten 40 Basenpaare des trnF exons sequenziert;
- trnL-trnL IGS Intron
es wurden die letzten fünf Basenpaare des trnL exons, IGS und die ersten 29 Basenpaare des trnL exons sequenziert;
- trnV-atpB IGS
es wurden die letzten 13 Basenpaare des trnV Gens, IGS, das gesamte trnM Gen und nachfolgende IGS, sowie das gesamte atpE Gen, IGS und die ersten 456 Basenpaare des atpB Gens sequenziert;

6.3.3. Länge des Alignments

Das Gesamtalignment (aus den fünf Markern) ist 3898 Basenpaare lang (siehe Anhang 13.3.), jedoch wurden unklare und daher nicht alignierbare Positionen sowie strukturell instabile Bereiche entfernt. Dieses bearbeitete Alignment hat eine Länge von 3398 Basenpaaren.

6.3.4. Anzahl der Mutationen

- Punktmutationen:

Tabelle 7 Punktmutationen – Anzahl pro Sequenzabschnitt

Sequenzabschnitt	Punktmutationen gesamt	davon parsimonisch informativ*
psbA-trnH IGS	74	46
trnS-ycf9 IGS	103	65
trnL-trnF IGS	110	67
trnL Intron	81	35
trnV-atpB IGS	230	78

* 1 Variante tritt zumindest 2x im Datensatz auf;

- Insertionen und Deletionen (Indels)

Tabelle 8: Indels – Anzahl pro Sequenzabschnitt

Sequenzabschnitt	Indels gesamt	davon parsimonisch informativ*
psbA-trnH IGS	20	19
trnS-ycf9 IGS	43	34
trnL-trnF IGS	39	31
trnL intron	40	26
trnV-atpB IGS	65	53

* 1 Variante tritt zumindest 2x im Datensatz auf;

6.4. stammesgeschichtliche Rekonstruktion

Die folgenden Abbildungen (10–14) zeigen die mit dem Programm PAUP, basierend auf dem Prinzip der Parsimonie, errechneten Stammbäume der fünf einzelnen Marker mit den entsprechenden Bootstrap Werten. Diese geben in Prozent die Verlässlichkeit der Knoten in einem Stammbaum an, dabei wurden nur Werte eingetragen, die mindestens 50 Prozent ausmachen.

Im sechsten Stammbaum (Abbildung 15) ist das Gesamtalignment, die Information aller fünf Marker vereint dargestellt.

Die Baumlänge gibt die Anzahl der Mutationschritte an, die nötig ist, um den Baum zu generieren [9]. Der Consistency Index (CI) sowie der entsprechende Homoplasy Index (1- CI) der parsimonisch informativen Merkmale sind ebenfalls angegeben.

Um die Nachteile des CI auszugleichen wurde auch der Retention Index (RI) angegeben. Dieser liegt im Idealfall bei 1 [9].

Bei der Darstellung der Bäume handelt es sich um sogenannte Phylogramme. Im Unterschied zu einem Kladogramm, in dem nur das Verzweigungsmuster eine Information zu den Verwandtschaftsverhältnissen liefert, ist hier zusätzlich die Länge jedes Astes ersichtlich. Diese unterschiedlichen Astlängen ergeben sich nach dem merkmalsbasierenden Parsimonie Verfahren aus den evolutionär bedingten Merkmalsveränderungen- in diesem Fall bestimmte Positionen im Alignment. Die auch als metrische Stammbäume bezeichneten Phylogramme geben demnach zusätzlich eine quantitative Information über die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Taxa wieder. [9]

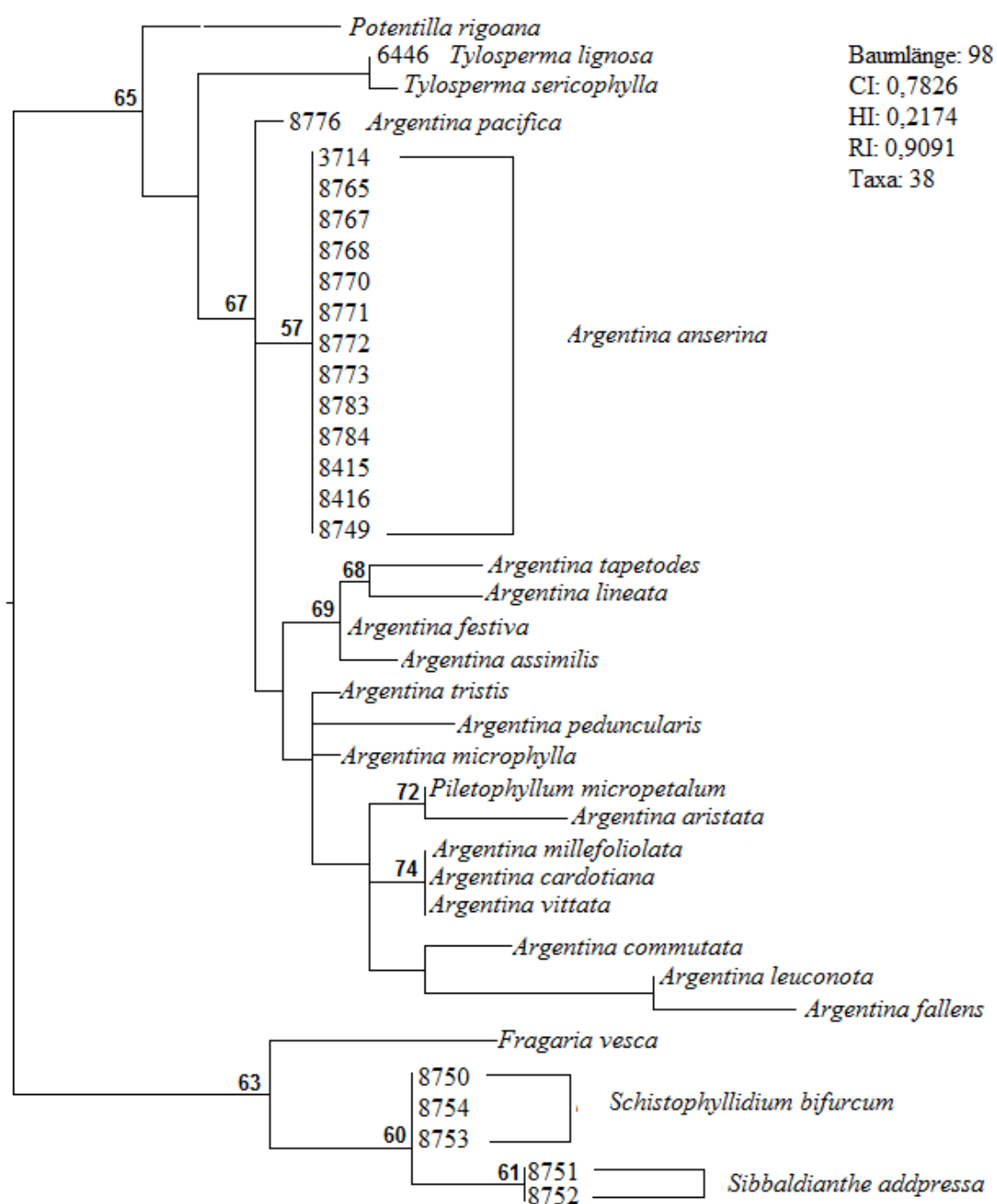


Abbildung 10 : Maximum parsimony Stammbaum Marker psbA-trnH IGS

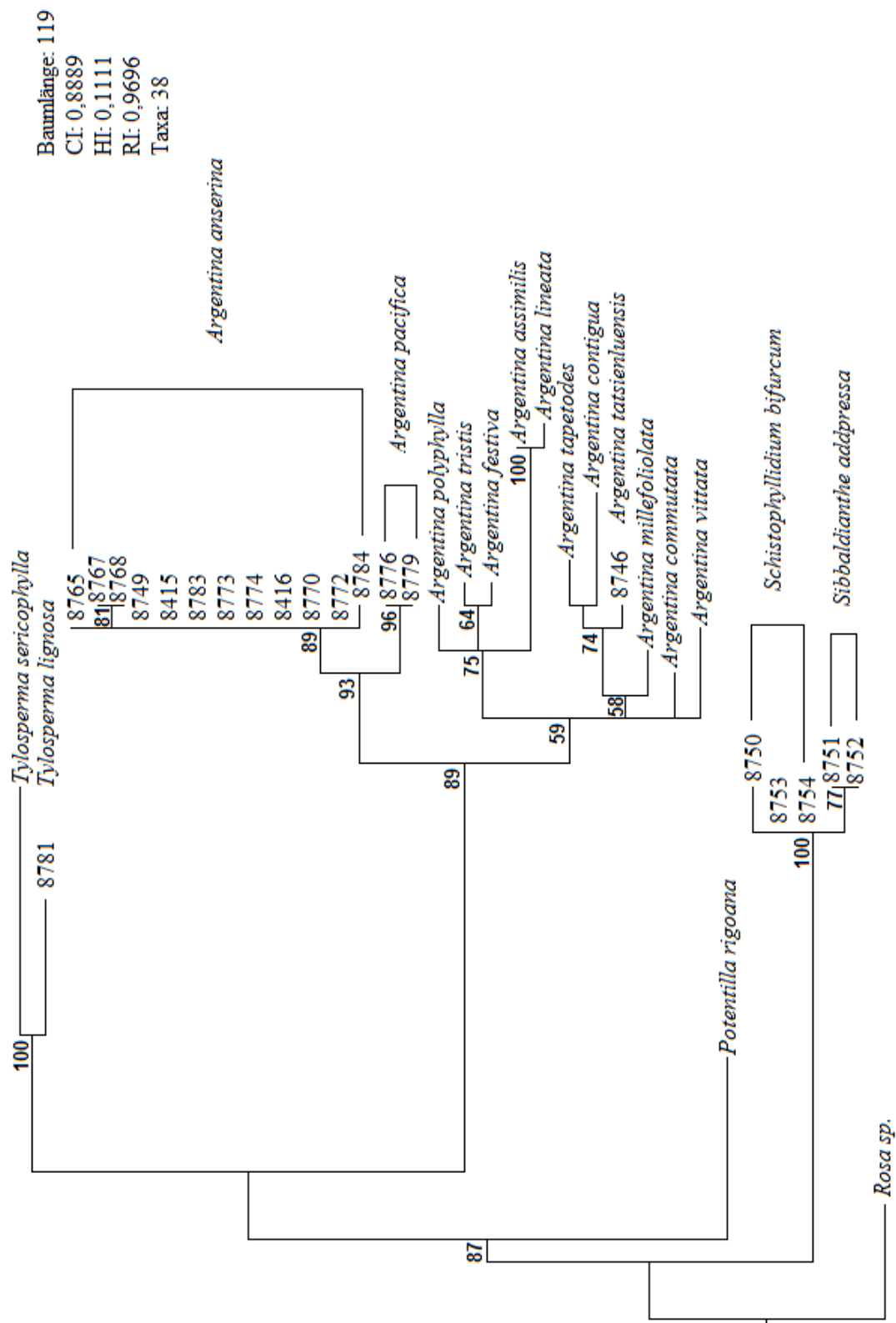


Abbildung 11 Maximum parsimony Stammbaum Marker trnS-ycf9 IGS

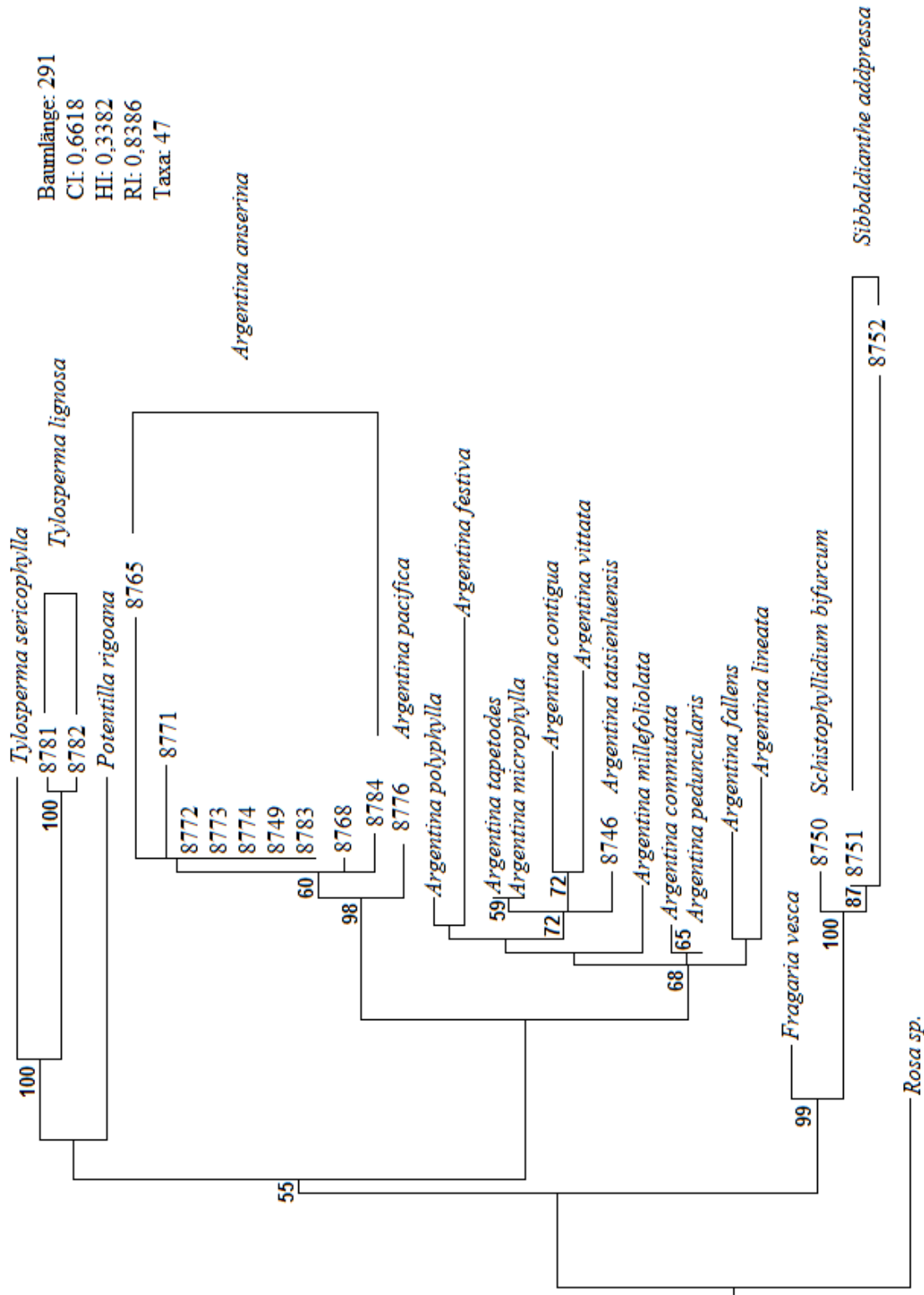


Abbildung 13: Maximum parsimony Stammbaum Marker tmL Intron

Baumlänge: 58
 CI: 0,9706
 HI: 0,0294
 RI: 0,9939
 Taxa: 47

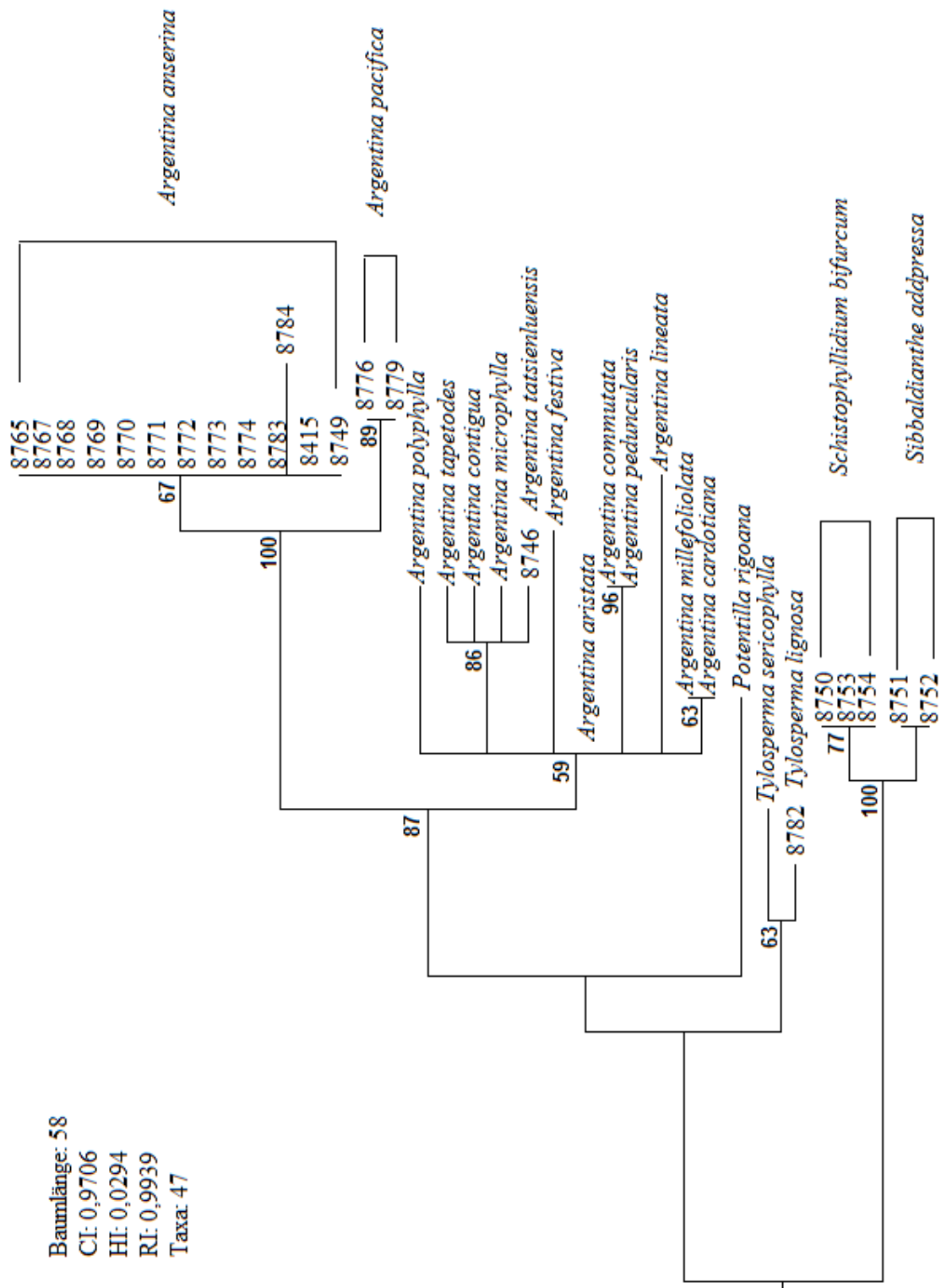


Abbildung 14: Maximum parsimony Stammbaum trnV-atpB IGS

Baumlänge: 742
 CI: 0,7551
 HI: 0,2449
 RI: 0,9151
 Taxa: 47

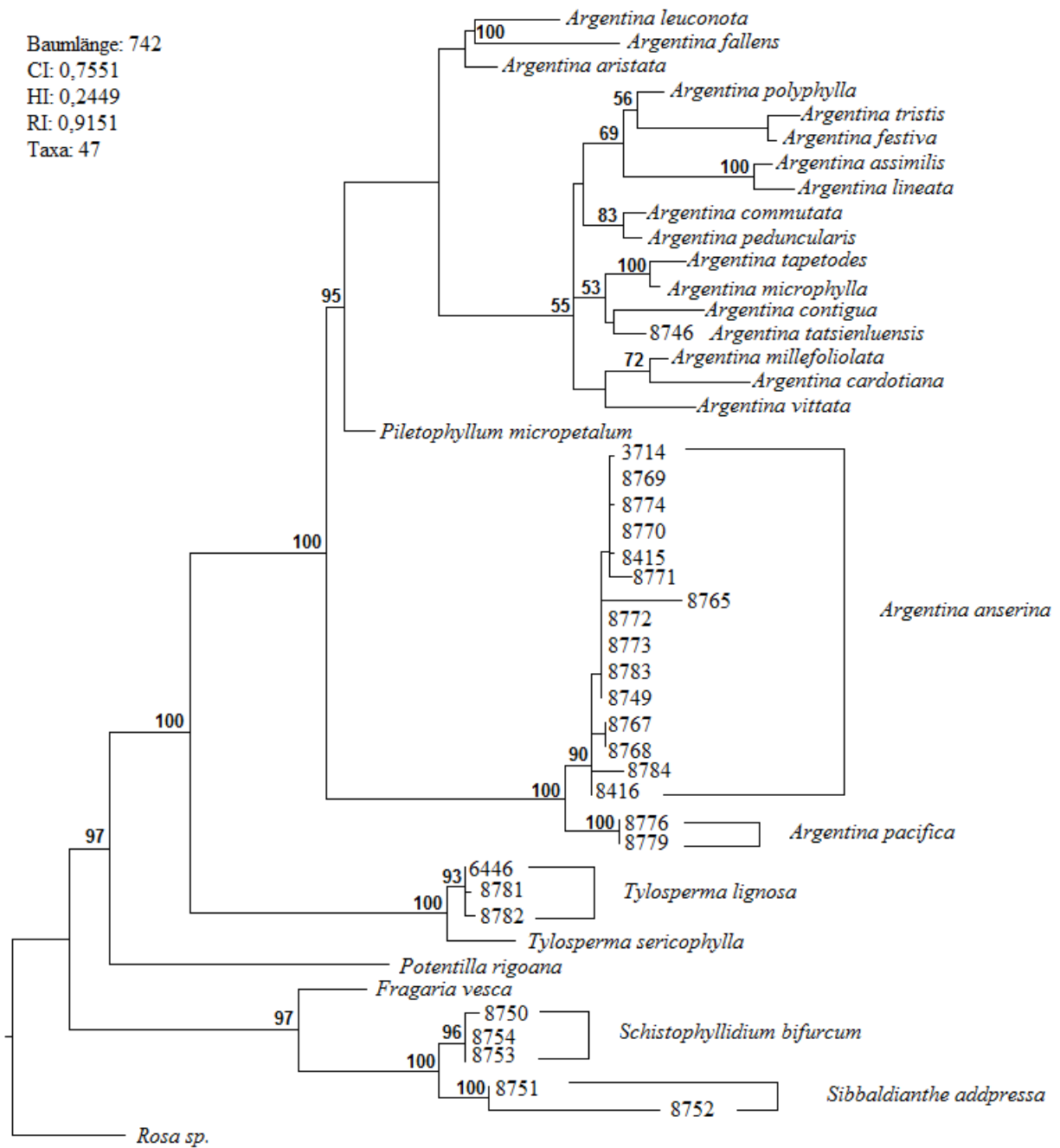


Abbildung 15: Maximum parsimony Gesamtstammbaum aller 5 Marker

6.4.1. Zahl der verwendeten Marker pro Probe

Tabelle 9: Anzahl Marker pro Probe

Materialnr.	Taxon	psba- trnH	trnS- ycf9 IGS	trnL- trnF IGS	trnL Intron	trnV- atpB IGS	Anzahl gesamt
Ptl 2706	<i>Argentina leuconota</i>	x		x			2
Ptl 3714	<i>Argentina anserina</i>	x		x			2
Ptl 6407	<i>Pyletophyllum micropetalum</i>	x		x			2
Ptl 6446	<i>Tylosperma lignosa</i>	x		x			2
Ptl 8273	<i>Potentilla rigoana</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8415	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x		4
Ptl 8416	<i>Argentina anserina</i>	x	x				2
Ptl 8726	<i>Agrimonia procera</i>	x	x	x			3
Ptl 8727	<i>Rosa sp.</i>	x	x	x		x	4
Ptl 8728	<i>Fragaria vesca</i>	x		x		x	3
Ptl 8731	<i>Argentina polyphylla</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8732	<i>Argentina tapetodes</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8734	<i>Argentina contigua</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8735	<i>Argentina tristis</i>	x	x	x			3
Ptl 8736	<i>Argentina festiva</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8737	<i>Argentina assimilis</i>	x	x	x	x		4
Ptl 8738	<i>Argentina aristata</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8739	<i>Argentina commutata</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8740	<i>Argentina fallens</i>	x		x		x	3
Ptl 8742	<i>Argentina lineata</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8743	<i>Argentina peduncularis</i>			x	x	x	3
Ptl 8744	<i>Argentina microphylla</i>	x		x	x	x	4
Ptl 8745	<i>Argentina millefoliolata</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8746	<i>Argentina tatsienluensis</i>		x	x	x	x	4
Ptl 8747	<i>Argentina cardotiana</i>	x		x	x	x	4
Ptl 8748	<i>Argentina vittata</i>	x	x	x		x	4
Ptl 8749	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8750	<i>Schistophyllidium bifurcum</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8751	<i>Sibbaldianthe addpressa</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8752	<i>Sibbaldianthe addpressa</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8753	<i>Argentina bifurca</i>	x	x	x	x		4
Ptl 8754	<i>Argentina bifurca</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8755	<i>Argentina tugitakensis</i>	x					1
Ptl 8756	<i>Argentina stenophylla</i>	x		x			2
Ptl 8757	<i>Argentina stenophylla</i>						0
Ptl 8758	<i>Argentina tatsienluensis</i>			x			1
Ptl 8759	<i>Argentina tatsienluensis</i>	x				x	2
Ptl 8760	<i>Argentina tatsienluensis</i>	x		x			2
Ptl 8761	<i>Argentina sericophylla</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8762	<i>Argentina peduncularis</i>						0
Ptl 8763	<i>Argentina peduncularis</i>			x			1
Ptl 8764	<i>Argentina papuana</i>						0
Ptl 8765	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8766	<i>Argentina anserina</i>	x		x			2
Ptl 8767	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x		4
Ptl 8768	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8769	<i>Argentina anserina</i>			x	x		2
Ptl 8770	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x		4
Ptl 8771	<i>Argentina anserina</i>	x		x	x	x	4
Ptl 8772	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8773	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x	x	5

Ptl 8774	<i>Argentina anserina</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8775	<i>Argentina anserina</i>			x			1
Ptl 8776	<i>Argentina pacifica</i>	x	x	x	x	x	5
Ptl 8778	<i>Argentina pacifica</i>			x			1
Ptl 8779	<i>Argentina pacifica</i>		x	x	x		3
Ptl 8780	<i>Argentina lignosa</i>			x			1

x = erfolgreich sequenzierte PCR- Amplifikate

6.4.2. Beschreibung der Auflösung der Genbäume und der verwandtschaftlichen Beziehungen

In allen fünf Genbäumen sind vier phylogenetische Gruppen erkennbar, die sich so auch im Gesamtstammbaum finden und durch Bootstrapwerte zwischen 55 und 100 gestützt werden. Die in diese Gruppen fallenden Taxa sind in Tabelle 10 angeführt.

Dabei fallen alle in die Berechnung der Genbäume miteinbezogenen *Argentina*- Arten (Gruppe IV) in einen eigenen Klade, deutlich abgegrenzt von *Potentilla rigoana* und den Vertretern der Gruppe I.

Als weitere Übereinstimmung in der Auflösung der fünf Genbäume ist die Position der Gruppe I mit ihren vier Vertretern um *Fragaria vesca* zu nennen. Diese liegt deutlich abgegrenzt, als Schwesterngruppe der übrigen drei Gruppen und am nächsten zur Außengruppe *Rosa sp.*

Die Position von *Potentilla rigoana*, die der Gruppe II zugeteilt wurde, deckt sich in vier Genbäumen, sowie im Gesamtstammbaum „zwischen“ Gruppe I und Gruppe III. Einzig der Genbaum des Markers trnL Intron zeigt eine nähere Verwandtschaft von *Tylosperma* mit der Gruppe I.

Piletophyllum micropetalum findet sich im Genbaum psbA-trnH IGS mit einem Bootstrapwert von 72 zwischen den einzelnen *Argentina*- Arten in Gruppe IV, während die Position im Genbaum trnL-trnF IGS nicht so eindeutig ausfällt und zwischen Gruppe III und Gruppe IV liegt, jedoch durch keinen Bootstrapwert gestützt wird.

Die Gruppe III mit *Tylosperma* kommt in vier Genbäumen sowie im Gesamtstammbaum, durch Bootstrap Werte von mindestens 65 gestützt, zwischen *Potentilla rigoana* und der Gruppe IV zu liegen. Der Genbaum trnL-trnF IGS zeigt *Tylosperma* in einer anderen Position, die aber durch keinen Bootstrap Wert gestützt wird- zwischen *Potentilla rigoana* und der Gruppe I.

Tabelle 10: Gruppenübersicht phylogenetisch zugeordneter Taxa

Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
<i>Fragaria vesca</i> <i>Schistophyllidium bifurcum</i> <i>Sibbaldianthe addpressa</i>	<i>Potentilla rigoana</i>	<i>Tylosperma lignosa</i> <i>T. sericophylla</i>	<i>A. anserina</i> <i>A. polyphylla</i> <i>A. tapetodes</i> <i>A. contigua</i> <i>A. tristis</i> <i>A. festiva</i> <i>A. assimilis</i> <i>A. aristata</i> <i>A. commutata</i> <i>A. fallens</i> <i>A. lineata</i> <i>A. peduncularis</i> <i>A. microphylla</i> <i>A. millefoliolata</i> <i>A. tatsienluensis</i> <i>A. cardotiana</i> <i>A. vittata</i> <i>A. tugitakensis</i> <i>A. stenophylla</i> <i>A. peduncularis</i> <i>A. papuana</i> <i>A. pacifica</i> <i>A. leuconota</i> <i>Piletophyllum micropetalum</i>

7. Diskussion

7.1. Methodendiskussion

7.1.1. Diskussion der Extraktionsmethoden

Wie in Abbildung 5 ersichtlich, gab es hinsichtlich der Bandenintensität kaum einen Unterschied zwischen den zwei unterschiedlichen Extraktionsmethoden, daher wurde der überwiegende Teil des Materials mittels „Macherey- Nagel- Kit“ extrahiert.

Diese Extraktionsmethode bietet im Vergleich zur CTAB- Methode neben der erheblichen Zeitersparnis, den Vorteil der hohen Produktreinheit aufgrund der Bindung der DNS an die Matrix der verwendeten Säulchen, während bei der CTAB- Methode die Reinigungsschritte durch manuelles „Abpipettieren“ erfolgen, wodurch zwar mehr DNS vorliegt, diese jedoch einen höheren Verunreinigungsgrad aufweist, der die darauffolgenden Arbeitsschritte stören kann. Bei Außerachtlassung der Personalkosten, wäre aus ökonomischer Sicht die CTAB- Extraktion der Extraktion mittels Macherey- Nagel- Kit vorzuziehen.

7.1.2. Diskussion der unterschiedlichen Magnesiumkonzentration und PCR-Programme

Sowohl die Variation der Magnesiumkonzentration als auch das doppelte PCR- Programm dienen der Effektivitätssteigerung der Polymerase.

Magnesium als Cofaktor der Polymerase ist essentiell für deren Funktion. Möglicherweise wird dieses durch Begleitstoffe, wie zum Beispiel Gerbstoffe, der DNS- Extrakte komplexiert und so verbraucht.

Beim doppelten PCR- Programm wird in einem zweiten Durchgang nochmals Polymerase zugesetzt, um den Anteil an durch Hitze zerstörter Polymerase auszugleichen. Vor allem im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung bei 98°C, kann die Polymerase kaputt gehen.

Insgesamt betrachtet, war für das Herbarmaterial im Vergleich zu dem mit Silikagel getrockneten Material deutlich mehr Polymerase notwendig, um genügend Amplifikat für die nachfolgende Sequenzierung zu erhalten. Der Grund dafür liegt wohl in dem unterschiedlich hohen Ausgangsgehalt an DNS, abhängig vom Alter des Materials.

7.2. Diskussion des Amplifikationserfolgs

- Unterschiede nach Markern

Von den acht anfänglich eingesetzten Markern wurden drei (trnC-ycf6 IGS; trnC-ycf6 IGS primer intern; trnK-rps16;) aufgrund unzureichenden PCR- Amplifikationserfolgs ausgeschlossen. Die Versuche wurden mindestens zweimal unter optimierten Versuchsbedingungen wiederholt, sofern sie nicht das gewünschte Ergebnis lieferten.

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, wurden einzig bei den Markern trnC-ycf6 IGS und trnK-rps16 forward- als auch die reverse- Primer modifiziert. Im Vergleich dazu brachten die etablierten und nicht modifizierten Primerpaare der Marker psbA-trnH IGS und trnL-trnF IGS das beste Amplifikationsergebnis. Für eine definitive Aussage bedarf es weiterer Versuche und Variation der Primermodifikation, da auch Marker, bei denen entweder forward- oder reverse- Primer modifiziert wurden, eine relativ hohe Anzahl an Amplifikaten brachten.

Aber auch andere Faktoren, wie die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNS während der PCR, könnten sich negativ auf den Amplifikationserfolg ausgewirkt haben.

Zwischen der Länge der Marker und dem Amplifikationserfolg gab es keinen deutlichen Zusammenhang, auffällig ist die relativ hohe Ausbeute an DNS, die mit dem längsten Marker trnV-atpB IGS erzielt wurde.

Tabelle 11 Amplifikationserfolg aller acht Marker in Prozent

Marker	Länge* (Bp)	Amplifikationserfolg %
psbA-trnH IGS	378	29
trnL-trnF IGS	459	28
trnS-ycf9 IGS	494	27
trnL intron	458	23
trnV-atpB IGS	1292	23
trnK-rps 16 IGS	845	19
trnC-ycf 6 IGS intern	120	12
trnC-ycf 6 IGS	821	7

* bezogen auf *Fragaria chiloensis* (NCBI Akzessionsnummer.: JN884816)

- Unterschiede nach dem Alter und der Quelle des Materials

Abbildung 9 zeigt, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter des Materials und dessen Amplifikationserfolg besteht, sehr wohl aber wenn man dieses in Vergleich zur Quelle der einzelnen Individuen setzt.

So spielt das Alter des Materials aus dem Naturhistorischen Museum Wien eine entscheidende Rolle, wohingegen es bei dem Material aus dem Herbarium Görlitz keinen Zusammenhang gibt. (vgl. Tabelle 12)

Das Material aus dem Herbarium Görlitz lag bereits in Form der DNS vor, es wurde durch Juraj Paule nach der CTAB-Methode extrahiert. Im Gegensatz dazu wurde das Material aus dem NHM Wien im Zuge meiner Arbeit mittels Macherey- Nagel- Kit extrahiert.

Aufgrund der unterschiedlichen Extraktionsmethoden, ist es schwierig, den Amplifikationserfolg der verwendeten Individuen zu vergleichen, da die DNS- Extraktion dieser nicht unter denselben Bedingungen abgelaufen ist.

Tabelle 12: Amplifikationserfolg – Vergleich nach Alter, Quelle und Extraktionsmethode

Material- Nummer	Alter	Quelle	Extraktion	psbA- trnH	trnC- ycf6	trnC- ycf6	trnS- ycf9	trnL- trnF	trnL- intron	trnK- rps16	trnV- atpB	Marker gesamt
Pt18731	1905	H.Görlitz	CTAB	x	x	x	x	x	x	x	x	8
Pt18732	2000	H.Görlitz	CTAB	x	x	x	x	x	x	x	x	8
Pt18733	2000	H.Görlitz	CTAB									0
Pt18734	2000	H.Görlitz	CTAB	x	x		x	x	x		x	7
Pt18735	1997	H.Görlitz	CTAB	x			x	x		x	x	5
Pt18736	1990	H.Görlitz	CTAB	x			x	x	x		x	5
Pt18737	1990	H.Görlitz	CTAB	x			x	x	x		x	5
Pt18738	1997	H.Görlitz	CTAB	x	x		x	x	x	x	x	7
Pt18739		H.Görlitz	CTAB	x	x		x	x	x	x	x	7
Pt18740	1905	H.Görlitz	CTAB	x	x		x	x	x	x	x	7
Pt18741	1974	H.Görlitz	CTAB									0
Pt18742	1990	H.Görlitz	CTAB	x		x	x	x	x		x	6
Pt18743	2005	H.Görlitz	CTAB	x	x	x	x	x	x	x	x	8
Pt18744	1994	H.Görlitz	CTAB	x	x		x	x	x	x	x	7
Pt18745	2004	H.Görlitz	CTAB	x	x	x	x	x	x	x	x	8
Pt18746	1905	H.Görlitz	CTAB	x	x	x	x	x	x	x	x	8
Pt18747	1992	H.Görlitz	CTAB	x	x		x	x	x		x	6
Pt18748	1992	H.Görlitz	CTAB	x	x		x	x			x	5
Pt18749	1996	H.Görlitz	CTAB	x		x	x	x	x	x	x	7
Pt18750	2002	H.Görlitz	CTAB	x			x	x	x	x	x	6
Pt18751	1996	H.Görlitz	CTAB	x			x	x	x	x	x	6
Pt18752	2000	H.Görlitz	CTAB	x			x	x	x	x	x	6
Pt18753	2003	H.Görlitz	CTAB	x			x	x	x	x	x	6
Pt18754	2001	H.Görlitz	CTAB	x			x	x	x	x	x	6
Pt18755	1986	NHM Wien	M.N.-Kit	x			x					2
Pt18756	1910	NHM Wien	M.N.-Kit	x			x	x				3
Pt18757	1915	NHM Wien	M.N.-Kit				x					1
Pt18758	1934	NHM Wien	M.N.-Kit				x	x				2
Pt18759	1934	NHM Wien	M.N.-Kit	x			x				x	3
Pt18760	1922	NHM Wien	M.N.-Kit	x			x	x				3
Pt18761	1966	NHM Wien	M.N.-Kit	x			x	x	x	x	x	6
Pt18762	1954	NHM Wien	M.N.-Kit					x				1
Pt18763		NHM Wien	M.N.-Kit					x				1
Pt18764	1974	NHM Wien	M.N.-Kit			x*						1

7.3. Diskussion der Eignung der Marker

7.3.1. Variabilität im Vergleich

Insgesamt betrachtet, zeigen die Marker psbA-trnH IGS und trnL-trnF IGS im Vergleich zu der Länge der alignierten Bereiche eine deutlich höhere Variabilität (nur Punktmutationen berücksichtigt) als trnV-atpB IGS mit dem längsten alignierten Bereich.

Die höhere Anzahl an verwendeten Taxa im Alignment der Marker psbA-trnH IGS und trnL-trnF IGS trägt sicherlich auch zu der vergleichsweise hohen Variabilität bei.

Tabelle 13: Variabilität der einzelnen Marker berechnet anhand der Zahl an Punktmutationen

Sequenzabschnitt	Punktmutationen (parsimonisch informativ)	nicht-alignierbare Bereiche (Bp)	Länge (Bp) abzüglich nicht-alignierbarer Bereiche	Variabilität %
psbA-trnH IGS	46	223	337	13,6
trnL-trnF IGS	67	190	453	14,8
trnS-ycf 9 IGS	65	23	553	11,8
trnL Intron	35	0	710	4,9
trnV-atpB IGS	78	64	1345	5,8

7.4. Diskussion der Phylogenie

Im Vergleich zu früheren Arbeiten (Dobeš & Paule 2010; *Argentina leuconota* und *Argentina anserina*) wurden erstmals 26 *Argentina*- Arten in einer stammesgeschichtlichen Analyse berücksichtigt.

Der Gesamtstammbaum in Abbildung 15 zeigt deutlich, dass alle 26 *Argentina*- Arten in einen Klade fallen und somit *Argentina* als eigene Gattung im Sinne einer monophyletischen Gruppe bezeichnet werden kann.

Die Gattung *Argentina* bildet entwicklungsgeschichtlich betrachtet eine Schwesternlinie der Gattung *Potentilla*. In diese Schwesternlinie fallen auch *Tylosperma lignosa* und *Tylosperma sericophylla*, die in fast allen Genbäumen als auch im Gesamtstammbaum durch hohe Bootstrapwerte (mindestens 63) gestützt, einen deutlich von den *Argentina*- Arten abgegrenzten Ast bildet.

Tylosperma wird von J. Soják aufgrund morphologischer Charakteristika als eigene Gattung innerhalb des Subtribus *Potentillinae* von *Argentina* abgegrenzt [6].

Diese Abgrenzung wird durch die Ergebnisse auf DNS- molekularer Ebene unterstützt.

Neben *Tylosperma lignosa*, findet sich auch *Piletophyllum micropetalum* in der Schwesterngruppe von *Potentilla rigoana*. Dies entspricht wiederum der morphologischen Einteilung J. Sojáks, wonach *Piletophyllum* in die Subtribus *Potentillinae* fällt und nicht, wie von anderen Autoren (siehe Abschnitt 1.2.) angegeben, in die Subtribus *Fragariinae* [6]. In die Subtribus *Fragariinae* würden die Vertreter der Gruppe I fallen.

Im Gesamtstammbaum ist ersichtlich, dass *P. micropetalum* in die Gruppe der *Argentina*-Arten fällt. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Abtrennung von *Piletophyllum* als eigenständige Gattung, wie J. Soják [6] dies auf Basis morphologischer Charakteristika vorgenommen hat. Würde man dies, basierend auf den nun vorliegenden DNS-molekularen Befunden, tun, so würde *Piletophyllum* eine paraphyletische Stellung zur Gattung *Argentina* einnehmen. Das Ziel phylogenetischer Untersuchungen ist es jedoch, monophyletische Gruppen zu finden. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass sich die phylogenetische Stellung von *Piletophyllum* auf nur zwei Marker, die für die Gattung sequenziert werden konnten, stützt.

Abbildung 16 zeigt den Artbaum mit den entsprechenden Herkunftsstaaten der einzelnen Taxa. Dieser soll veranschaulichen, dass die analysierten Taxa auf Basis von DNS- molekularen Befunden zwar klassifiziert werden können, sich jedoch geographisch nicht trennen lassen.

Baumlänge: 742

CI: 0,7551

HI: 0,2449

RI: 0,9151

Taxa: 47

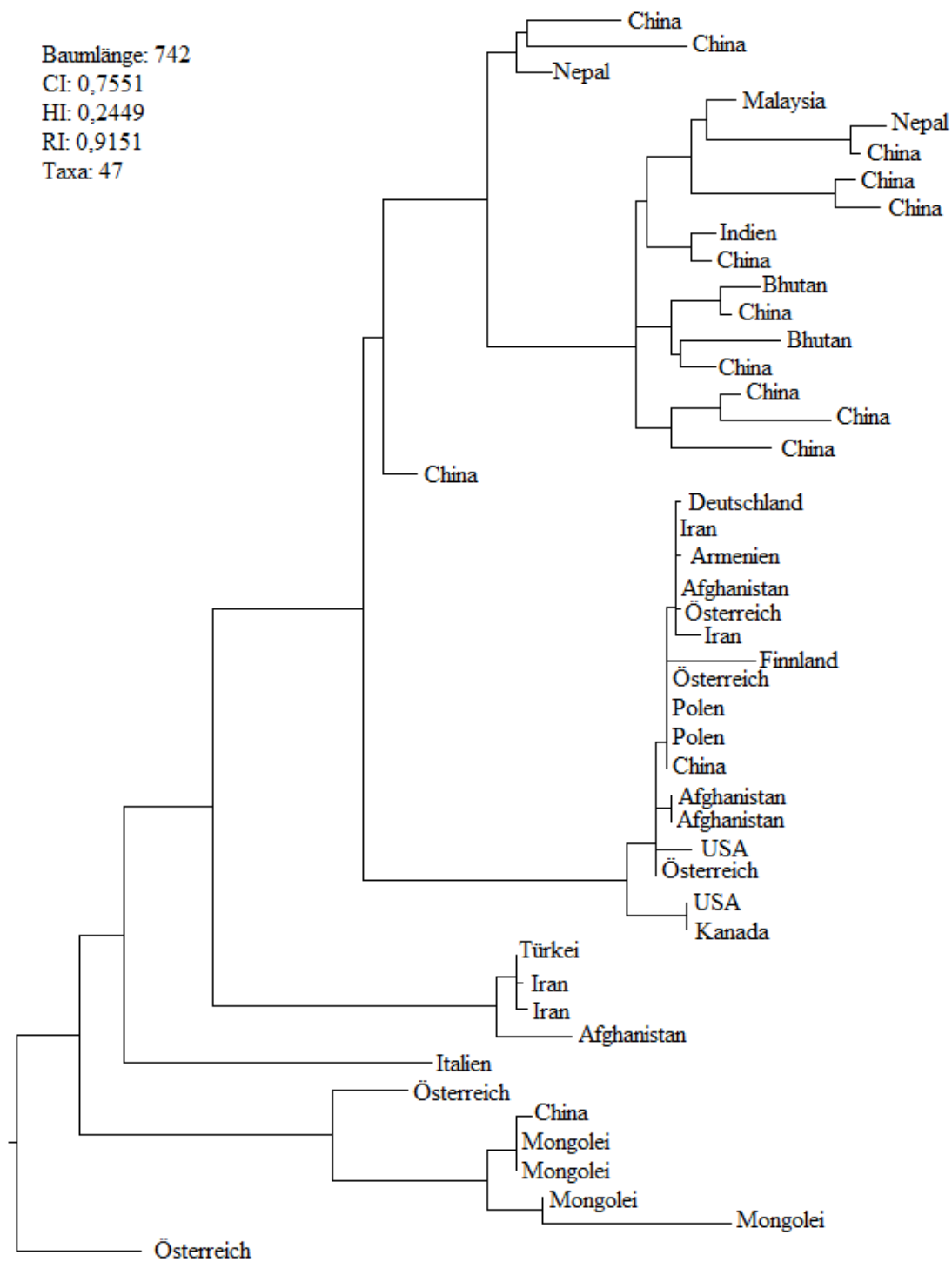


Abbildung 16 : Gesamtstammbaum geographische Herkunft

8. Zusammenfassung

Argentina wurde erstmals Mitte des 18. Jahrhunderts auf Basis morphologischer Charakteristika als eigene Gattung beschrieben, die Abgrenzung wurde jedoch kontrovers diskutiert, bis die Abgrenzung 2003 DNS- molekulare Daten unterstützten. Eine Gliederung der Gattung blieb bisher aus.

Die Erstellung einer Artphylogenie der Gattung *Argentina* war Inhalt meiner Diplomarbeit.

Dazu wurde eine 32 Arten, davon 26 der Gattung *Argentina*, umfassende Analyse, hauptsächlich von wissenschaftlichem Herbarmaterial, durchgeführt. Der überwiegende Teil der untersuchten Individuen stammte aus dem asiatischen Raum.

Acht Primer, die variable Plastiden- Regionen sowohl zwischen Genen (IGS) als auch innerhalb eines Gens (Intron) begrenzen, wurden für die Amplifikation von je 59 Individuen ausgewählt.

Die Sequenzierung selektierter Amplifikate und nachfolgende Bearbeitung dieser Daten lieferte ein 3398 Basenpaare langes Alignment, das für die phylogenetische Analyse herangezogen wurde.

Es resultierten fünf einzelne Genbäume der Marker psbA-trnH IGS, trnS-ycf9 IGS, trnL-trnF IGS, trnL Intron und trnV-atpB IGS.

In allen fünf als Phylogramm errechneten Genbäumen zeigt sich deutlich, dass *Argentina* inklusive *Piletophyllum* und *Tylosperma* eine von *Potentilla* isolierte und abgegrenzte Entwicklungslinie bilden, was bereits die Arbeit von Dobeš & Paule (2010) zeigte, wobei sich der damalige Befund auf eine deutlich geringere Anzahl von *Argentina*- Arten stützte.

Die Abgrenzung von *Tylosperma* als eigene Gattung, so wie J. Soják dies auf morphologischen Merkmalen begründet, kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu, unterstützen meine Daten die Abgrenzung von *Piletophyllum* als eigene Gattung nicht. Akzeptiert man *Piletophyllum* als eigene Gattung, so würde diese, basierend auf den DNS- molekularen Daten, eine paraphyletische Stellung zu *Argentina* einnehmen. Ziel phylogenetischer Analysen ist es aber, monophyletische Gruppen zu finden. Somit ist betreffend *Piletophyllum* nur einer Zuordnung zur Subtribus der *Potentillinae* zu bestätigen, nicht aber deren Abgrenzung als eigene Gattung.

Eine der Zielsetzungen meiner Arbeit, die Erstellung der Phylogenie der Arten von *Argentina* wurde erreicht. Alle fünf Genbäume zeigen, dass es sich bei *Argentina*, im Sinne einer monophyletischen Gruppe, um eine eigenständige Gattung handelt.

Die hohe Übereinstimmung in der Topologie der Genbäume und der daraus resultierende Artbaum sind ein starker Hinweis für die Findung der tatsächlichen evolutionären Geschichte der Gattung *Argentina*.

9. Summary

Argentina was first declared as a separate species in the middle of the 18th century on the basis of its morphologic character. Its distinction though was controversially discussed until 2003, when DNA molecular data endorsed its restriction.

Never the less the subdivision of this species is still missing.

Hence the topic of my diploma thesis was creating an arthphylogeny of the species *Argentina*.

Therefore an analysis including 32 types from mainly scientific herbal material, with 26 *Argentina* species among these, was performed.

Most of the assessed individuals were obtained from the Asian regions.

Eight primers, which restricted the variable surrounding of plastids among the genes (IGS) as well as within the genes (Intron), were chosen for the amplification of each of the 59 individuals. The sequencing of the selected amplified object and the subsequent editing of the specific data delivered an alignment containing altogether 3398 base pairs, which was used for the phylogenetic analysis. As a result five single gene trees of the markers psbA-trnH IGS, trnS-ycf9 IGS, trnL-trnF IGS, trnL Intron und trnV-atpB IGS were obtained.

In each of the five gene trees, which were depicted in form of a phylogram, it was significantly recognised that *Argentina* including *Piletophyllum* and *Tylosperma* represented a line of development which was isolated and restricted from *Potentilla*. These results have already been published in the work of Dobeš & Paule (2010). The findings of that time were even able to be declared although a far less smaller range of *Argentina*-species was included.

The distinction of *Tylosperma* as an own species, as J. Soják also justifies due to their morphologic character, can be confirmed with the results of this diploma work.

On the contrary, the data of this work does not provide a distinction of *Piletophyllum* into a separate species. Since, if *Piletophyllum* was accepted as a distinctive species, it would, on the basis of the DNA molecular data, take in a paraphyletic position towards *Argentina*. However, the aim of phylogenetic analysis is the detection of monophyletic groups. So in concerns of the *Piletophyllum*, solely the assignment into the subtribe of *Potentillinae* is to be confirmed, but the distinction into a separate species is not possible.

One of my targets, which was the creation of the phylogeny of the type of *Argentina*, was reached. All of the five gene trees deliver evidence of *Argentina*, in the sense of a monophyletic group, being a species of their own.

The strong accordance of the gene tree's topology with its resulted species tree delivers significant hints for the final finding of the actual evolutionary history of the Argentina species.

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer- Charakterisierung	15
Tabelle 2: PCR- Mastermixzusammensetzung	16
Tabelle 3: PCR- Programme	17
Tabelle 4: Cycle Sequencing Programm	19
Tabelle 5: Cyle Sequencing- Mastermixzusammensetzung	19
Tabelle 6: maximale Längen pro Marker, angegeben in Basenpaaren	25
Tabelle 7: Punktmutationen- Anzahl pro Sequenzabschnitt	26
Tabelle 8: Indels- Anzahl pro Sequenzabschnitt	27
Tabelle 9: Anzahl Marker pro Probe	34
Tabelle 10: Gruppenübersicht phylogenetisch zugeordneter Taxa	36
Tabelle 11: Amplifikationserfolg aller acht Marker in Prozent	38
Tabelle 12: Amplifikationserfolg – Vergleich von Alter, Quelle und Extraktionsmethode	40
Tabelle 13: Variabilität der einzelnen Marker berechnet anhand der Zahl an Punktmutationen	42

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der Nebenblätter von <i>Potentilla</i> und <i>Argentina</i> [7]	4
Abbildung 2: Stammbaum der Gattung Potentilleae basierend auf Plastidensequenzen [8]	5
Abbildung 3: Griffelposition der Potentilleae nach Wolf [10]	8
Abbildung 4: DNS- Leiter mit DNS- Fragmentlängen in Basenpaaren (Bp)	18
Abbildung 5: Vergleich der Extraktionsmethoden CTAB vs. Macherey- Nagel- Kit	22
Abbildung 6: Test unterschiedlicher Magnesiumkonzentrationen	23
Abbildung 7: Vergleich des PCR- Programms	23
Abbildung 8: Amplifikationserfolg der Marker in Prozent	24
Abbildung 9: Amplifikationserfolg im Vergleich zum Alter des Probenmaterials	24
Abbildung 10: Maximum parsimony Stammbaum Marker psbA-trnH IGS	28
Abbildung 11: Maximum parsimony Stammbaum Marker trnS-ycf 9 IGS	29
Abbildung 12: Maximum parsimony Stammbaum Marker trnL-trnF IGS	30
Abbildung 13: Maximum parsimony Stammbaum Marker trnL Intron	31
Abbildung 14: Maximum parsimony Stammbaum Marker trnV-atpB IGS	32
Abbildung 15: Maximum parsimony Gesamtstammbaum aller 5 Marker	33
Abbildung 16: Gesamtstammbaum geographische Herkunft	44

12. Quellenverzeichnis

1. Heywood, V.H., Blütenpflanzen der Welt, Birkhäuser Verlag (1982).
2. Graf, J. et al, Tafelwerk zur Pflanzensystematik- Einführung in das natürliche System der Blütenpflanzen mit neuartiger Bildmethode, J.F. Lehmanns Verlag München (1975).
3. Kurrto et al, Atlas Florae Europaeae Vol. 13, Distribution of vascular plants in Europe. Rosaceae (*Spiraea* to *Fragaria*, excl. *Rubus*). Helsinki, The Committee for Mapping the Flora of Europe & Societas Biologica Fennica Vanamo, p. 152–270 (2004).
4. Campbell, N. A. et al, Biologie, 8. Auflage, Pearson Studium (2009).
5. Dobeš C. et al, Die Verbreitung von Apomixis in der Rosaceen- Tribus Potentilleae: Stammesgeschichte, Biogeographie und Taxonomie, 16. Treffen der Österreichischen Botanikerinnen und Botaniker 25. – 27. 9. 2014 in Graz, ppt
6. Soják, J., Notes on Potentilla XXI. A new division of the tribe Potentilleae (Rosaceae) and notes on generic delimitations, Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie, 127 (3): p. 349–358 (2008).
7. Soják, J., Argentina Hill, a genus distinct from Potentilla (Rosaceae), Thaiszia, J. Bot. 20: p. 91–97 (2010).
8. Dobeš, C. and Paule J., A comprehensive chloroplast DNA- based phylogeny of the genus Potentilla (Rosaceae): Implications for its geographic origin, phylogeography and generic circumscription, Molecular Phylogenetics and Evolution, 56: p. 156–175 (2010).
9. Knoop, V. und K. Müller, Gene und Stammbäume- Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik, 1. Auflage, Elsevier GmbH, München (2006).
10. Wolf, T., Dr., Monographie der Gattung Potentilla (1908).
11. Brenner, S., Ausarbeitung der Monographie „Herba Anserinae“ sowie Ergänzungen zu den Monographien „Flos Croci“ und „Herba Herniariae“ für das Österreichische Arzneibuch (ÖAB). Diplomarbeit, Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften, (2011).
12. Madaus G., Lehrbuch der Biologischen Heilmittel Band 3, Verlag Georg Thieme Leipzig (1938).
13. Tomczyk, M. und K. P. Latte, Potentilla- A review of its phytochemical and pharmacological profile, Journal of Ethnopharmacology 122: p. 184–204 (2009).

14. Wichtl, M., Teedrogen und Phytopharmaka- Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2009).
15. Doyle, J.J. and J.L. Doyle, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, v. 19: p.11–15 (1987).
16. Kress, W. J. et al, Use of DNA barcodes to identify flowering plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102: p. 8369–8374 (2005).
17. Taberlet, P. et al, Universal primers for amplification of three non- coding regions of chloroplast DNA, *Plant Molecular Biology* 17: p. 1105–1109 (1991).
18. Calonje M. et al, Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction, *Plant Systematics and Evolution*, Springer Berlin, Volume 282, Issue 3–4, p: 257–280 (2009).
19. Shaw, J., et al., The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis, *American Journal of Botany*, 92 (1): p. 142–166 (2005).
20. Gehrke, B. et al, Molecular phylogenetics of *Alchemilla*, *Aphanes* and *Lachemilla* (Rosaceae) inferred from plastid and nuclear intron and spacer DNA sequences, with comments on generic classification, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: p. 1030–1044 (2008).
21. Ikeda, H. and H. Ohba, A systematic revision of *Potentilla* L. section *Leptostylae* (Rosaceae) in the Himalaya and adjacent regions, *The Himalayan Plants*, Vol. 3, University of Tokyo Press (1999).
22. Powell, W. et al, Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome, *Current Biology*, 5: p. 1023–1029 (1995).

13. Anhang

13.1. verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte

- Extraktion: Zusammensetzung der Reagentien

TE- Puffer	CTAB- Puffer	10 x TBE- Puffer
10mM TRIS	0,5M TRIS- HCl (pH 8)	TRIS
1mM EDTA	0,5M EDTA (pH 8)	Borsäure
	1,4M NaCl	0,3M EDTA (pH 8)
	2% N-Cetyl-N,N-trimethyl- ammoniumbromid	Wasser ad 1l

- PCR: Mastermix- Komponenten

H2O ultrarein 15ml, Sigma
Reaction Buffer 5x Phire®, Finnzymes
DNA Polymerase Phire® Hot Start II F-122L, Finnzymes
dNTP Mix 25mM each F-560XL, Finnzymes
DMSO 100% F-515, Finnzymes

- Elektrophorese

	kleine Kammer 150 cm²	große Kammer 575 cm²
Agarose [g]	0,4	1,2
0,5 x TBE- Puffer [ml]	80	200
SYBR® Safe DNA Gel Strain (LifeTechnologies) [µl]	8	20
Spannung (Volt / cm)	100 (5V / cm)	150 (4V / cm)
Laufzeit [min]	45	60
Elektrophoresekammer	Owl Separation Sytem, Inc, New York; Thermo scientific	PEQLAB Biotechnologie
Loading buffer	Bromphenolblau, Wasser, Glycerol; Farbstoff in Wasser lösen, danach Glycerol zufügen und vor Gebrauch gut mischen;	
Geldokumentation: Kamera Argus X1 Biostep		

13.2. Material: geographische Herkunft, Sammelhistorie

Agrimonia procera L. Österreich, Wien, Arzneigarten Pharmakognosie; 06.05.2014 Lena Märki & Jelena Martinovic (*Agrimonia procera* L.); **Ptl8726**

Argentina adinophylla (Merr. & L. M. Perry) Soják Papua- Neuguinea, Mt Albert Edward, 8°23'S/147°24'E; 1974 Craven 2690 (*Potentilla adinophylla*) [PR]; **Ptl8741**

Argentina anserina (L.) Rydb. [USA], [Kalifornien], San Luis Obispo County, Border of Oso Flaco Lake; 13.05.1950 D. S. 144 (*Potentilla anserina* [L.]) [W 1955-3923]; **Ptl8775** Polen, Dolega near Szczurowa (200m) ATPOL square: EF 55, 50°07'N/20°42'E; ruderal place; 26.07.2009 J. Zelazny (*Potentilla anserina* [L.]) [W 2012-12139]; **Ptl8773** [Russland], Tyrnyauz, [Republik Kabardino-Balkarien], regio montis Elbrus, in valle fluminis Baksan, prope loco Itkol dicto, 2100-2000; 20.06.1980 V. Vasák (*Potentilla anserina* L.) [W 1986-03447]; **Ptl8766** Armenien, Shirak, Amasia district, at lake Arpilich, NW of village Paghakn, 41°04'06"N/43°39'08"E, 2033; meadows and shore of lake; 31.08.2005 Marine Oganessian, Hasmik Ter-Voskanyan, Ernst Vitek 05-2163 (*Potentilla anserina* L.) [W 2006-14520]; **Ptl8774** "Persia [Iran], Esfahan, Kuh-e Karkas (Kuh-i Kargiz), inter Tar et stationem "Radar", 33°27'N/51°48'E, 2750; in prato humido; 27.05.1974 [K. H. Rechinger] 46622 (*Potentilla anserina* [L.]) [W 1981-05393]; **Ptl8771** Afghanistan, Bamian, Band-i-Amir, 9500; Marshy ground by lakeshore common.; 27.05.1971 C. Grey- Wilson and T. F. Hewer 953 (*Potentilla anserina* [L.]) [W 1973-12737]; **Ptl8770** [Iran], Bachtari country, Kuhreng: Between the dam and Cheshmeh Kuhreng, 32°27'N/50°05'E, 2400; on small islands in the river; 31.05.1959 Per Wendelbo 949 (*Potentilla anserina* [L.]) [W 1965-15636]; **Ptl8769** China, Qinghai, Heimahe am Qinghai Hu; Ruderalstellen im Ort; 16.06.1996 A. Gebauer (*Argentina anserina* L.) [GLM 163495]; **Ptl8749** [Finnland], Alandia, par. Sottunga, Norholmsviken; in litore maris; 26.06.1970 Asel Nordström 66814 (*Potentilla anserina* ssp. *euanserina* L. bzw. Hyl.) [W 1971-11105]; **Ptl8765** [USA], Michigan, Chippewa County. DeTour Village, on St. Mary's River, N of Lake Huron. Property of Interlake Steamship Company, Spring Bay Rd., 46,016333°N/-83,925111°W, 182; 19.06.2008 Michael A. Vincent & Mary W. Vincent 14036 (*Potentilla anserina* [L.]) [W 2010-06553]; **Ptl8784** [Polen], Slask Dolny Silesia Inferior, Radlowka, prope Lwowek Slaski, palat dolnoslaskie; In prato uliginoso in valle rivi remota, a vico in orientem; 14.06.2008 Edward koziol, Halina Charytonowicz 1735 (*Potentilla anserina* [L.]) [W 2010-02139]; **Ptl8783** Afghanistan, Ghazni, Okak, NE altoplanitiei Dasht-e Nawar (Naour), 33°50'N/67°55'E, 3000; 04.07.1962 [K. H. Rechinger] 17774 II (*Potentilla anserina* L.) [W 1968-16300]; **Ptl8768** Afghanistan, Ghazni, Okak, NE

altoplanitiei Dasht-e Nawar (Naour), 33°50'N/67°55'E, 3000; 04.07.1962 [K. H. Rechinger] 17774 I (*Potentilla anserina* L.) [W 1968-16299]; **Ptl8767** Österreich, Nordtirol, Pitztal, an der Bundesstraße in Außerwald; Straßenrand; 13.07.2010 Christoph Dobeš (*Potentilla anserina* [Rydb.]) [W 2012-05610]; **Ptl8772** Österreich, Wien, Neuwaldegg, 1,385 km NNW des Heuberggipfels und 0,1 km W des Hanslteichs, S des Dornbachs, 48,23805555556°/16,27055555556°, 290; 21.08.2011 Christoph Dobeš (*Argentina anserina* (L.) Rydb.); **Ptl8416** Österreich, Wien, Neuwaldegg, 1,385 km NNW des Heuberggipfels und 0,1 km W des Hanslteichs, S des Dornbachs, 48,23805555556°/16,27055555556°, 290; 15.04.2012 Christoph Dobeš (*Argentina anserina* (L.) Rydb.) [WUP 2012-03009]; **Ptl8415** Deutschland, Niedersachsen, Emsland, 4 km NW von Meppen, Naturschutzgebiet Borkener Paradies, 52,7198°/7,23826666667°, 13; 10.05.2008 Christoph Dobeš ex cult. (*Potentilla anserina* L.) [HEID 805506, 805505]; **Ptl3714**

Argentina aristata (Soják) Soják Nepal, Yak Kharka, 4000; 29.07.1997 Bürgel s.n. (*Potentilla aristata*) [PR]; **Ptl8738**

Argentina assimilis (Soják) Soják China, Yunnan, in collibus supra opp. Likiang; 26.07.1990 J. Soják s.n. (*Potentilla assimilis*) [PR]; **Ptl8737**

Argentina cardotiana (Hand. -Mazz.) Soják China, Xizang, Serkyimla pass; 24.07.1992 R. Businský 33043 (*Potentilla cardotiana*) [PR]; **Ptl8747**

Argentina commutata (Lehm.) Soják India, Kashmir; Šrtek s.n. (*Potentilla commutata*) [PR]; **Ptl8739**

Argentina contigua (Soják) Soják Bhutan, Tongsa, Thanpe La E side; 2000 G. & S. Miehe (*Potentilla contigua*) [PR]; **Ptl8734**

Argentina fallens (Cardot) Soják China, Yunnan, in m. Yulong-shan prope opp. Likiang; 12.06.1905 J. Soják s.n. (*Potentilla fallens*) [PR]; **Ptl8740**

Argentina festiva (Soják) Soják China, Yunnan, in m. Yulong-shan prope opp. Likiang; 20.07.1990 J. Soják s.n. (*Potentilla festiva*) [PR]; **Ptl8736**

Argentina hooglandii (Kalkman) Soják Papua-Neuguinea, Western Highlands, W von Laiagam, 2940; Waldrand; 12.02.1974 A. Gilli 462 (*Potentilla hooglandii* Kalkman) [W 1979-08216]; **Ptl8785**

Argentina interrupta (T. T. Yü & C. L. Li) Soják China, Xizang, Upper Phung Chu (Arun) catchment, S tributary of Karma Chu (Makalu E glacier), 27°57'N/87°12'E, 3851; 13.08.2005 G. & S. Miehe 05-057-07 (*Potentilla interrupta*) [PR]; **Ptl8733**

- Argentina leuconota* (D. Don) Soják China, Hong Shan, 28,66666666666667°/98,7333333333333° 4000; 30.07.2008 Juraj Paule ex cult. (*Potentilla leuconota* D. Don) [HEID 806374]; **Ptl2706**
- Argentina lineata* (Trevir.) Soják China, Yunnan, supra opp. Likiang; 26.07.1990 J. Soják s.n. (*Potentilla lineata*) [PR]; **Ptl8742**
- Argentina microphylla* (D. Don) Soják China, Xizang, Gyamda Chu, NE tributary, Pasum Tso NE, 30°03'N/93°59'E, 4780; 31.08.1994 G. Miehe & U. Wündisch 94-242-7 (*Potentilla microphylla*) [PR]; **Ptl8744**
- Argentina millefoliolata* (Soják) Soják China, Yunnan, Yulong Shan, N of Lijiang, 27°02'N/100°11'E, 3985; 10.06.2004 G. Miehe, Sonan Co, L. Opgenoorth 04-007-07 (*Potentilla millefoliolata*) [PR]; **Ptl8745**
- Argentina pacifica* (Howell) Rydb. USA, California, Humboldt Co, Moonstone, Moonstone beach, on a mouth of Little River, NE-side of the river, 41°02'N/124°07'E; dunes and salt marsh, alt. sea level [0]; 04.06.1987 Juha Pykälä & D. H. Norris (*Potentilla pacifica* Howell) [W 1995-01833]; **Ptl8776** Canada, Graham Island, near Richardson Ranch at Tlell; common in sedge meadow back from sea beach and on flats by Tlell River; 10.06.1957 J. A. Calder, D. B. O. Savile, R. L. Taylor 21367 (*Potentilla pacifica* Howell) [W 1969-10684]; **Ptl8779** [USA], [Alaska], Naknek muddy beach of Naknek River; submerged in tidal water of river when tide in.; 20.07.1952 W. B. Schofield 2266 (*Potentilla pacifica* Howell) [W 1963-23661]; **Ptl877** [USA], [Nordamerika], Labrador, Smokey [mountain], Indian Harbour; 22.08.1939 Carl G. Wenner (*Potentilla pacifica* Howell) [W 1960-18126]; **Ptl8777**
- Argentina papuana* (Focke) Soják [Papua-Neuguinea], Western Highlands, Südhang des Mt. Wilhelm, 3400; Grasfläche; 01.02.1974 A. Gilli 335 (*Potentilla papuana* Focke) [W 1979-08215]; **Ptl8764**
- Argentina peduncularis* (D. Don) Soják Nepal, Loc. Lamjung Himal, 15000; on open slopes; 13.07.1954 Stainton, Sykes & Williams 6314 (*Potentilla peduncularis* D. Don var. obscura Hook.f.) [W 1958-14008]; **Ptl8762** China, Xizang, Upper Phung Chu (Arun) catchment, Upper Karma Chu, Thangsum, 28°02'N/87°11'E, 4420; 07.08.2005 G. & S. Miehe 05-040-01 (*Potentilla peduncularis*) [PR]; **Ptl8743** [Indien], Sikkim, Regio. temp, 14000; Coll. J. D. H. [Hook] (*Potentilla peduncularis* Don) [W]; **Ptl8763**
- Argentina polyphylla* (Wall. ex Lehm.) Soják Malaysia, Sabah, Ranau, Mt Kinabalu National Park, along summit trail at point where first set of ropes appear on granite face to aid

- climbers to summit; Leptospermum-gymnosperm forest; 18.05.1996 J. L. Panero, S. L. Johnson & G. Simmons (*Potentilla polyphylla* var. *hindabaluensis*) [MA 587856]; **Ptl8731**
- Argentina stenophylla*** (Franch.) Soják [China], Yunnan, In tergi inter vicos Haba et Dugwantsun ad austro-orient pagi Dschungdien ("Chungtien"), 4050; regione frigide temperata, locis humosis. Substr. schisto argilloso; 22.06.1915 Dr. Heinr. Frh. v. Handel-Mazzetti 6878 (*Potentilla stenophylla* (Fr.) Wiels) [W 1925-8952]; **Ptl8757** [China], Yunnan, on the eastern flank of the Lichiang Range, 27°20'N, 13000-12000 ft; open alpine pasture; 06.1910 George Forrest 5884 (*Potentilla stenophylla* (Franch) Diels) [W 1924-561]; **Ptl8756**
- Argentina tapetodes*** (Soják) Soják Bhutan; 2000 G. & S. Miehe (*Potentilla tapetodes*) [PR]; **Ptl8732**
- Argentina tatsienluensis*** (Th. Wolf) Soják [China], Sikang, Kangting (Tachienlu) distr.: Yülingkong: Gomba La, 3600; in prato alpino; 22.07.1934 Harry Smith 10668 (*Potentilla tatsienluensis* Th. Wolf) [W 1940-5313]; **Ptl8758** China, Sichuan, Luhuo (Zhaggo), 31°44,2'N/100°44,7'E; 03.07.1905 J. Štěpánek s.n. (*Potentilla tatsienluensis*) [PR]; **Ptl8746** [China], Sze-ch'uan, 3600; in prato herboso; 09.07.1922 Harry Smith 2563 (*Potentilla tatsienluensis* Th. Wolf) [W 1940-5314]; **Ptl8760** [China], Sikang, Kangting (Tachienlu) distr.: Tapaoshan, 4000; in prato alpino; 04.10.1934 Harry Smith 12757 (*Potentilla tatsienluensis* Th. Wolf) [W 1940-5315]; **Ptl8759**
- Argentina tristis*** (Soják) Soják Nepal, Yak Kharka, 4000; 26.07.1997 Bürgel s.n. (*Potentilla tristis*) [PR]; **Ptl8735**
- Argentina tugitakensis*** (Masam.) Soják [China], [Taiwan], Ilan County, Mt. Nanhuta; 04.11.1986 Sheng-You Lu (*Potentilla tugitakensis* Masamune) [W 2010-11225]; **Ptl8755**
- Argentina vittata*** (Soják) Soják China, Xizang, Rawu; 10.07.1992 R. Businský 33028 (*Potentilla vittata*) [PR]; **Ptl8748**
- Fragaria vesca*** L. Österreich, Wien, Arzneigarten Pharmakognosie; 06.05.2014 Lena Märki & Jelena Martinovic (*Fragaria vesca* L.); **Ptl8728**
- Piletophyllum micropetalum*** (D. Don) Soják China, Yunnan, Likang (Lijiang), 26,8797222222°/100,22027777778°, 2400; 01.01.1990 J. Soják (*Piletophyllum micropetalum* D. Don); **Ptl6407**
- Potentilla rigoana*** Th. Wolf Italien, Basilikata, Monte Sirino, knapp N des Lago Laudemio, 15,839°/40,14916666667°, 1520; 06.06.2011 Julia Rossa, Andrea Lückl & Christoph Dobeš (*Potentilla rigoana* Th. Wolf) [WUP 2012-02401]; **Ptl8273**

Rosa sp. L. Österreich, Wien, Arzneigarten Pharmakognosie; 06.05.2014 Lena Märki & Jelena Martinovic (*Rosa* sp. L.); **Ptl8727**

Schistophyllidium bifurcum subsp. *orientale* (L.) Juz. ex Soják China, Qinghai, Chakazhen SW, Chaka, 36°47'N/99°04'E, 3100; Artemisia-Steppe; 24.08.2002 A. Gebauer (*Schistophyllidium bifurcum* subsp. *orientale* (L.) Juz. ex Soják) [GLM 163497]; **Ptl8750** Mongolia, Great Gobi B Special Protected Area; desert steppe; 23.08.2003 K. Wesche 288 (*Potentilla bifurca* L.) [GLM 159598]; **Ptl8753** Mongolia, Gobi, Gobi Gurvan Saikhan, S Gobi Aimak, bed of temporary river, 43,67914°N/103,79787°E, 2173; Iris-Carex stand; 06.07.2001 K. Wesche 1610 (*Potentilla bifurca* L.) [GLM 159574]; **Ptl8754**

Sibbaldianthe addpressa (Bge.) Juz. Mongolia, Gobi Altai, S-Gobi Aimag, Sevrel Uul summit area, 43°36'N/102°03'E, 2550-2630 m; montane steppe formations and pastures; 08.04.1996 G. & S. Miehe 96-068-01 (*Sibbaldianthe addpressa* (Bge.) Juz.) [GLM 163518]; **Ptl8751** Mongolia, Gobi Gurvan Saikhan, S Gobi Aimak, Dzuun Saikhan, southern summit, 43°29'N/104°03'E, 2820; rocks and open scree; 09.06.2000 K. Wesche 416 (*Sibbaldianthe addpressa* (Bge.) Juz.) [GLM 159608]; **Ptl8752**

Tylosperma lignosa (Willd. ex Schlechtend.) Botsch Türkei, Tunceli, Sultan Baba Da., (ca. 40 km Luftlinie N Tunceli), 39,3167°/39,483, 1700; 20.08.1982 F. Sorger, Buchner (*Tylosperma lignosa* (Willd. ex Schlechtend.) Botsch) [W 1990-6892]; **Ptl6446** (Willd. in D. F. K. Schltld.) Botsch. [Iran], Kazvin, In monte Hesarband prope Darbandak, 2300; Gauba Sabeti 468 (*Potentilla lignosa* Willd.) [W 1968-12960]; **Ptl8781** (Willd. in D. F. K. Schltld.) Botsch. [Iran], Teheran, Karadj Tal, Cessara, Kuh Sephosalar [schwer lesbar]; 04.07.1968 Terme 13017E (*Potentilla lignosa* Willd.) [W 1969-3275]; **Ptl8782** (Willd. in D. F. K. Schltld.) Botsch. Türkei, Tunceli, Sultan Baba Da., (ca. 40 km Luftlinie N Tunceli), 2900-1700 m; Eichenbuschwald, Schutt- u. Felsfluren; 20.08.1982 (*Potentilla lignosa* Willd.) [W 1990-06892]; **Ptl8780**

Tylosperma sericophylla (R. Parker) Soják Afghanistan, Logar, Dobanday bassin Kafardara riv, 2800; gorges: rochers calcaires, ombragés; 13.09.1966 P. Lalande R518-E 16 (*Potentilla sericophylla* Parker) [W 1968-13533]; **Ptl8761**

[illegible]

[illegible]

121-121

TAATT---TAATAATATTTA-----ATTC---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---AATAAAATTT-----AAAAAGAGAAATTACAAATATTTT
-----T-A-TTA-----ATTAA---AATATAGAGAAATTACAAGCATTTT
-----TTAATATTA-----ATTAA---AATATAGAGAAATTACAAGCATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
NN
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
NN
TATTAAAAATTAATTAAAAAGTAGAGAAATTTTAATTA-----AAAGTAGAGAAATTACAAATATTT
NN
NN
NN
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
-----AAAAATTA-----AATA---AAAATAGAGAAATTCCAAATATTTT
NN
-----T-A-TTA-----ATAAATC---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
NN
-----TTA-----ATTT---AAATAT---AAATATTT
NN
TAATT---ATTTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
-----T-A-TTA-----ATTA---AAATTAG---AAATATTT
-----T-A-TTA-----ATTA---AAATTCG---AAATATTT

AAAAAT---AATTAATGTTA-----ATTT---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATT---TAATAATATTA-----ATTC---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
-A-----T-A-TTA-----ATTT---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
TAATG---TTAATTAAAAATAGAGAAATTACAAATATTTTAAATATAAAATTACAAATATTTT
TATTT---AAATAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT

NN

TAATT---TAATTAAAAATTA-----ATTA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
-----ATAAATA---AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
A-----ATAAAATA-----AAAATAGAGAAATTTCAAATATTTT
A-----ATAAATA-----AAAATAGAGAAATTTCAAATATTTT
-----AATA-----AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT
-----AATA-----AAAATAGAGAAATTACAAATATTTT

[illegible]

Argentina_festiva JP6_Pt18736
Argentina_assimilis JP7_Pt18737
Argentina_aristata JP8_Pt18738
Argentina_commutata JP9_Pt18739
Argentina_fallens JP10_Pt18740
Argentina_lineata JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis JP13_Pt18743
Argentina_microphylla JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana JP17_Pt18747
Argentina_vittata JP18_Pt18748
Argentina_anserina JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addressa JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addressa JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum JP24_Pt18754

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes JP2_Pt18732
Argentina_contigua JP4_Pt18734
Argentina_tristis JP5_Pt18735
Argentina_festiva JP6_Pt18736
Argentina_assimilis JP7_Pt18737
Argentina_aristata JP8_Pt18738
Argentina_commutata JP9_Pt18739
Argentina_fallens JP10_Pt18740
Argentina_lineata JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis JP13_Pt18743
Argentina_microphylla JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana JP17_Pt18747
Argentina_vittata JP18_Pt18748
Argentina_anserina JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addressa JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addressa JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum JP24_Pt18754

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728

CGCCCATTTT-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATGAACCCCC---
CGCCCATTTT-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATGAACCCCCCCC

CGCCCATTTT-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATGAACCCCC---
CGCCCATTTT-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATGAACCCCCCCC
CGCCCATTTT-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATGAACCCCC---
CGCCCATTTT-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATGAAGCCCCCCCC

NN

ACGCCATTTT-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAATATAAATAAACCCCC---
ATACCATTTA-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATATAAATAATAA
ATACCATTTACCATTTTATCATTACTTCTAAAAAGAGATAACAACATAAATAAACCCCTTT
ATACCATTTA-----TCATTACTTCTAAAAAGAGATAACAACATAAATAAACCCCTTT
ATACCATTTA-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATATAAATAATAA
ATACCATTTA-----TCATTACTTGTAAGAGAGATAACAACATAAATATAAATAATAA

241-300
--TCTTTT-T---TT---ACTAA-----AATTGAATAGTAC-----TA
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
CCCTTTTTTT---TT---ATTAA-----TATGAATAGTACT-----TAA
TATTTAAATT---TTTTAATAAAA-----AAAAAATAGTAC-----TA
TATTTAAATT---TTTTAATAAAA-----AAAAAGA---GTAC-----TA
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
NN
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--CTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--CTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
NN
--CCCTTTT---TT---TTTT---ATTAAATAGAGTACT-----TTA
NN
NN
NN
--TTTTTTTT---TT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
CTTTTTTTTT---TTTT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--TTTNTTTTTCATTTTTTAATAAAAAAATAGTACTAAATATTAATTTAATTTTA
NN
TATTTTAATC---TA-----AAAAA---ATAG-----TA
--TTTTTTTT---TTT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
--TTTTTTTT---TTT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
NN
--CTTTTTTT---TTTTTTATT-----TAA-TAGTTTA-----TA
NN
CCCTTTTTTT---TATTTAATATGAC-----TT
--TTTTTTTT---TTATTTAAT-----TTAA-----
C-TTTTTTTT---TTATTTAATAGTTTATATAGTACTTAAATATTTTAAATAGTT-TATTA
-----ATTAAAT-TAAT-----TT
--CTTTT---TT---AATAA-----AATTTAATAGTAC-----TT
--TCTTTT-T---TT---ACTAA-----AATTGAATAGTAC-----TA
C-TTCTTTT---TTTTTTATTAAATAGTTTAAATATAAATAGTTTA-----TATTA
--TTTTTT-----AATAA-----AATTTAATAGTAC-----TA
C-TTTTTT-----TATTTAATATTAC-----TT
-----ATTAATAT-GTAC-----TG
NN
-----ATTAATAT-GTAC-----TG
-----ATTAATAT-GTAC-----TG
--TTTTTTTT---TTT---ATTAA-----TTGGTAGAGTACT-----TTA
-ATATAAATAAAACCCTT--TTATTTTAACTTAAAAATAGTACT-----
TATTTTAAATC---TT-----AAAAA---GTAC-----TA
TATTTTAAATC---TT-----AAAAA---GTAC-----TA
-ATATAAATAAAACCCTT--TTATTTTAACTTAAAAATAGTACTCAAATTTAATCTTA
-ATATAAATAAAACCCTT--TTATTTTAACTTAAAAATAGTACT-----

301-360
AATTATT--AATTT-----TATTT-AATTTTAA---TTATCAT-AATATTAATAT-
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
TATTAAT--AATTTA-A---TAATAT-TTTTTTTTTTT--TTATTTT-TATATATATATT
AAATATT--AATTTA-A---TTATCG-TAATATTAATA--TTTTATT-AATATT--TATA
AAATATT--AATTTA-A---TTATCG-TAATATTAATA--TTTTATT-AATATT-----
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
RATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
NN
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
NN
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TACGATTAA---TATCGT-----ATA
NN
NN
NN
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA---TATTTTT-AATATTT--ATA
AATTAGCGTAATTTTCATCTTTTATTACTATTATTTTTTTAGTATATCTAAATAGTATA
NN
CTAAA---A-----AATACTA-----ATTT-AAT-----

Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addpressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addpressa_JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum_JP24_Pt18754

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addpressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addpressa_JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum_JP24_Pt18754

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781

GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA----TATTTTT--AATATTT--ATA
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA----TATTTTT--AATATTT--ATA
NN
TAGTACTTAAATATT-A---ATTACT-TAATAT-----TA-AATATTTTTTTA
NN
AAATATT--AATTT-----TATTT-AATTCTCG-----TAATATT-AATATTTTTAT-
TAGTACTTAAATATT-A---ATTTTA-TTAAAT--TATCGTAATATT-AATAAATTTTTA
TAGTATTTAAATATT-A---ATTTTA-TTAAAT--TATCGTAATATT-AATAAATTTTTA
AATTA-----TCGTAATATTAATAT-----TTTATT-AATACTTTTTTT-
AAATATT--AATTT-----TATTT-ATTAATCG-----TAATATT-AATATTT-----
AACTATT--AATTT-----TATTT-AATTTTAA-----TTATCGT-AATATTAATAT-
TAATAGTTTAATATT-A---CTTAAA-TATAATAGTACTTACATATT-AATAT-TTTTTA
AAATATT--AATTT-----TATTT-AATAATCGT-----AATCGT-----AAT
AAATATT--AATTT-----TATTT-AATTCTCG-----TAATATT-AATATTTTTTTA
TATTAAT--AT-TAT-----TTAATTATATTGATAT-----TTTATT-AATACTTTTTTT
NN
TATTAAT--AT-TAT-----TTAATTATATTGATAT-----TTTATT-AATACTTTTTTT
TATTAAT--AT-TAT-----TTANTTATATTGATAT-----TTTATT-AATACTTTTTTT
GATTACT--AATTTA-A---TTATCG-TAAGATTAA----TATTTTT--AATATTT--ATA
-----AAAAT-----AATAATTT-----AATTATAGCA
AAATAAT--AATTTA-A---TTATAG-CAATATTA-----CGCT-AATTT-----
AAATAAT--AATTTA-A---TTATAG-CAATATTA-----CGCT-AATTT-----
AA--AA--TAGTACT-----AAAAT--AATAATTT-----AATTATAGCA
-----AAAAT--AATAATTT-----AATTATAGCA

361-420
-----TTTATAGTA----AAGGAGCAATACTAAACTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
TTTATATT--TTATATTTTATAGTA----AAGGAGCAATACTAAACTTCTTGATATAACAAG
GTAT-----TATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
-----TATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
NN
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
NN
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
NN
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
NN
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTA-TATAGTAAA----ATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
NN
-----TAGAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
NN
TTAAAAATTATAGTAA-ATAGTAG--AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
NN
-----TAAAAATTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
TTAAAAATTATAGTAATATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
TTACAAATTTATAGTAATATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
ATTAAA-----AATTATAGTA----AAGGAGCAATACTAAATTTCTTGATATCAAG
-----ATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
-----TTTATAATA--AAGGAGCAATACTAAACTTCTTGATATAACAAG
CTAAAAATTATAGTAA-ATAGTA--AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
ATTAA-----TATTTATAGTA----AAGGAGCRACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
TTAAAAATTTAAAAATTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
ATTCAA-----ATTATAGTA----AAGGAGCAATACTTAACTTCTTGATATAACAAG
NN
ATTCAA-----ATTATAGTA----AAGGAGCAATACTTAACTTCTTGATATAACAAG
ATTCAA-----ATTATAGTA----AAGGAGCAATACTTAACTTCTTGATATAACAAG
GTAAAA-----GATATTTATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
ATATTACGCTAATT--TATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
-----TATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
-----TATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
ATATTACGCTAATT--TATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG
ATATTACGCTAATT--TATAGTA----AAGGAGCAACACCAAACCTTCTTGATATAACAAG

421-480
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTAAAAAATTTTCACAAACTCATATATACTAAGACCAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACCAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACCAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
NN
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
AAATTTAGTATTGCTCCTTTACTTTCAAACCTTTCACGAACCTCATATATACTAAGACTAA
NN
NN
NN
NN

Argentina_leuconota_Ptl2706
Argentina_anserina_Ptl3714
Piletophyllum_micropetalum_Ptl6407
Tylosperma_lignosa_Ptl6446
Tylosperma_sericophylla_Ptl8761
Argentina_anserina_Ptl8765
Argentina_anserina_Ptl8767
Argentina_anserina_Ptl8768
Argentina_anserina_Ptl8769
Argentina_anserina_Ptl8770
Argentina_anserina_Ptl8771

[illegible]

Argentina_leuconota_Ptl2706
Argentina_anserina_Ptl3714
Piletophyllum_micropetalum_Ptl6407
Tylosperma_lignosa_Ptl6446
Tylosperma_sericophylla_Ptl8761

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addressa_JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum_JP24_Pt18754

[illegible]

65

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Pileotophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748

[illegible]

GTCTATTATCTGTAATATATATAATTATATAACAGATGCC¹TGATCCAGCAAGCATGCC
TTGTATATATCTATATATATATA-----ATACAGATGCATGAGACAGCAAGCATGCC
TTGTATATATCTATATATATATA-----ATACAGATGCATGAGACAGCAAGCATGCC
TTGTATATATCTATATATATATA-----ATACAGATGCATGAGACAGCAAGCATGCC
TTGTATATATCTATATATATATA-----ATACAGATGCATGAGACAGCAAGCATGCC

[illegible][illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria vesca_Pt18728

[illegible]

Argentina_leuconota_Ptl2706
Argentina_anserina_Ptl3714
Piletophyllum_micropetalum_Ptl6407
Tylosperma_lignosa_Ptl6446
Tylosperma_sericophylla_Ptl8761
Argentina_anserina_Ptl8765
Argentina_anserina_Ptl8767
Argentina_anserina_Ptl8768
Argentina_anserina_Ptl8769
Argentina_anserina_Ptl8770
Argentina_anserina_Ptl8771
Argentina_anserina_Ptl8772
Argentina_anserina_Ptl8773
Argentina_anserina_Ptl8774
Argentina_pacifica_Ptl8776
Argentina_pacifica_Ptl8779
Tylosperma_lignosa_Ptl8781

[illegible]

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible]

TTTTGAAGATACAAGAAATTCACCAGGCGCTTGGATATTACTTTG-----
TTTTGAAGATACAAGAAATTCACCAGGCGCTTGGATATTACTTTG-----
TTTTGAAGATACAAGAAATTCACCAGGCGCTTGGATATTACTTTG-----
TTTTGAAGATACAAGAAATTCACCAGGCGCTTGGATATTACTTTG-----
TTTTGAAGATACAAGAAATTCACCAGGCGCTTGGATATTACTTTG-----

Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllum_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addresssa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addresssa_JP22_Pt18752
Schistophyllum_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllum_bifurcum_JP24_Pt18754

[illegible]

1621-1680

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_micropphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addpressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addpressa_JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum_JP24_Pt18754

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria vesca_Pt18728

[illegible]

[illegible][illegible][illegible]

Argentina_leuconota_Ptl2706
Argentina_anserina_Ptl3714
Piletophyllum_micropetalum_Ptl6407
Tylosperma_lignosa_Ptl6446
Tylosperma_sericophylla_Ptl8761

NN
NN
NN
NN
AAATCGTGCAGTT-AGAAATCGTGAGGNN

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllum_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addpressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addpressa_JP22_Pt18752
Schistophyllum_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllum_bifurcum_JP24_Pt18754

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Pileotophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748

[illegible]

[illegible][illegible][illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_communita_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addpressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addpressa_JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum_JP24_Pt18754

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria vesca_Pt18728

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria-vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addressa_JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum_JP24_Pt18754

[illegible][illegible]

Argentina_leuconota_Ptl2706
Argentina_anserina_Ptl3714
Piletophyllum_micropetalum_Ptl6407
Tylosperma_lignosa_Ptl6446
Tylosperma_seriscopphylla_Ptl8761
Argentina_anserina_Ptl8765
Argentina_anserina_Ptl8767
Argentina_anserina_Ptl8768
Argentina_anserina_Ptl8769
Argentina_anserina_Ptl8770
Argentina_anserina_Ptl8771

[illegible]

Argentina_leuconota_Ptl2706
Argentina_anserina_Ptl3714
Piletophyllum_micropetalum_Ptl6407
Tylosperma_lignosa_Ptl6446
Tylosperma_sericophylla_Ptl8761

NN
NN
NN
NN
NN
CTTTCACTTCGAATCCA-AACAATGCGATTGGGGGTAGTACACAAAGATTTAAGTGC

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllum_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addpressa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addpressa_JP22_Pt18752
Schistophyllum_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllum_bifurcum_JP24_Pt18754

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Pileotophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_microphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748

[illegible]

[illegible][illegible][illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735

[illegible]

Argentina_leuconota_Pt12706
Argentina_anserina_Pt13714
Piletophyllum_micropetalum_Pt16407
Tylosperma_lignosa_Pt16446
Tylosperma_sericophylla_Pt18761
Argentina_anserina_Pt18765
Argentina_anserina_Pt18767
Argentina_anserina_Pt18768
Argentina_anserina_Pt18769
Argentina_anserina_Pt18770
Argentina_anserina_Pt18771
Argentina_anserina_Pt18772
Argentina_anserina_Pt18773
Argentina_anserina_Pt18774
Argentina_pacifica_Pt18776
Argentina_pacifica_Pt18779
Tylosperma_lignosa_Pt18781
Tylosperma_lignosa_Pt18782
Argentina_anserina_Pt18783
Argentina_anserina_Pt18784
Potentilla_rigoana_Pt18273
Rosa_sp_Pt18727
Fragaria_vesca_Pt18728
Argentina_anserina_Pt18415
Argentina_anserina_Pt18416
Argentina_polyphylla_JP1_Pt18731
Argentina_tapetodes_JP2_Pt18732
Argentina_contigua_JP4_Pt18734
Argentina_tristis_JP5_Pt18735
Argentina_festiva_JP6_Pt18736
Argentina_assimilis_JP7_Pt18737
Argentina_aristata_JP8_Pt18738
Argentina_commutata_JP9_Pt18739
Argentina_fallens_JP10_Pt18740
Argentina_lineata_JP12_Pt18742
Argentina_peduncularis_JP13_Pt18743
Argentina_micropphylla_JP14_Pt18744
Argentina_millefoliolata_JP15_Pt18745
Argentina_tatsienluensis_JP16_Pt18746
Argentina_cardotiana_JP17_Pt18747
Argentina_vittata_JP18_Pt18748
Argentina_anserina_JP19_Pt18749
Schistophyllidium_bifurcum_JP20_Pt18750
Sibbaldianthe_addresssa_JP21_Pt18751
Sibbaldianthe_addresssa_JP22_Pt18752
Schistophyllidium_bifurcum_JP23_Pt18753
Schistophyllidium_bifurcum_JP24_Pt18754

[illegible]

14. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jelena Martinovic

Geburtsdatum: 11.04.1988

Geburtsort: Wien

Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

10.2007- dato Studium der Pharmazie an der Universität Wien

09.1998-06.2006 Gymnasium GRG Wenzgasse 7, 1130 Wien
abgeschlossen mit Reifeprüfung am 23.06.2006

09.1994-06.1998 Volksschule Hietzinger Hauptstraße 166, 1130 Wien

Berufserfahrung

10.2010-02.2013 Tutorium LV „Quantitative pharmazeutische Analytik“,
Department für pharmazeutische Chemie, Universität Wien

Fremdsprachen: Kroatisch, Italienisch, Englisch