

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Landwirtschaftliche Fakultät

Lehr- und Forschungsschwerpunkt
„Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“



Forschungsbericht

Nr. 176

Erstellen einer Verwandtschaftsanalyse bei *Erica*- Arten

Verfasser:

Ana Laura Mugrabi de Kuppler

Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Meckenheimer Allee 172 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2285; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, Mai 2014

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Jens Léon

Projektbearbeiter: Ana Laura Mugarabi de Kuppler
Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz
Adresse: Katzenburgweg 5, 53115 Bonn

Zitiervorschlag:

MUGRABI DE KUPPLER, ANA LAURA (2014): Erstellen einer Verwandtschaftsanalyse bei *Erica*-Arten. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, Nr. 176, 58 Seiten

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Problemstellung/Wissensstand	3
1.2	Zielsetzung.....	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Material.....	7
2.2	Methoden	17
2.2.1	Molekulare Analyse	17
2.2.2	DNA-Sequenzierung und Alignment der Sequenzen.....	19
2.2.3	Phylogenetische Analyse.....	20
2.2.4	Kongruenztest.....	20
2.2.5	Elterliche Vererbung der Zellorganellen: Mitochondrien und Chloroplasten ...	20
2.2.6	Durchflusszytometrie	21
2.2.7	Pollenlagerung.....	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Analyse der Chloroplastenregion	22
3.2	Analyse des Zellkernes	22
3.3	Kongruenztest.....	22
3.4	Elterliche Vererbung der Zellorganellen	33

3.5	Bestimmung der Genomgröße	33
3.6	Stereomikroskopische Strukturen der Blüten und Pollenkörner	36
3.7	Fluoreszenzmikroskop	38
3.8	Pollenvitalität	39
4	Diskussion	41
4.1	Europäisches und Afrikanisches Heidekraut	41
4.2	Infraspezifische Variabilität	42
4.3	Phylogenetische Beziehungen zwischen den nördlichen <i>Erica</i> -Arten	42
4.4	Kombinierte Analyse	45
4.5	Hybridisierung und Evolution von <i>Erica</i>	45
4.5.1	Genom-Analysen	46
4.5.2	Prüfung der Pollenlagerungsfähigkeit	47
4.5.3	Weiteres Vorgehen im Projekt	47
5	Literaturverzeichnis	48
6	Liste über Veröffentlichungen	54
7	Liste über Vorträge	54
8	Kurzfassung	55
9	Abstract	56

1 Einleitung

1.1 Problemstellung/Wissensstand

Im Bereich der Phylogenie und Systematik der Familie der *Ericaceae* gibt es, im Hinblick auf die klassische Einteilung von Stevens (1971), wichtige Fortschritte. Insbesondere die molekulargenetischen Methoden führten zu einer molekularen Phylogenie und damit zu neuen Erkenntnissen zur Familie sowie zu anderen taxonomischen Gruppen innerhalb der *Ericoideae* (Kron et al. 2002, Gillespie und Kron 2010). Hierbei wurde *Erica* L., die größte Gattung innerhalb der Familie, zuerst von McGuire und Kron (2005) und später, in einer intensiven Studie von Pirie et al. (2011), charakterisiert.

Erica gehört, zusammen mit den monotypischen Gattungen *Calluna* Hull. und *Daboecia* D. Don., zum Stamm der *Ericaceae*, Unterfamilie der *Ericoideae* (Stevens 1971, Kron, et al. 2002, Gillespie und Kron 2010). Sie umfasst ca. 840 Arten, die von der Ostsee, Zentral- und Westeuropa, Makaronesien, Mittelmeerraum und Naher Osten, und von Nordafrika bis Südafrika einschließlich Madagaskar und den Mascarenen Inseln vorkommen. Sie zeigen hauptsächlich eine vertikale Verteilungslinie ausgehend von Norwegen bis zum Kap der Guten Hoffnung (Oliver 1989, 1991). Die „nördliche Gruppe“ (Fagúndez et al. 2010) beinhaltet 20-23 Arten, die in Europa und im Mittelmeerbecken wachsen. Wobei von dieser Gruppe nur *Erica arborea* L. als einzige Art von der Sahara-Wüste, von Malawi im Süden, bis zum Jemen im Osten, als auch in den Tibesti-Gebirgszug im Norden des Tschad, vorkommt (Hansen 1950, Désamoré et al. 2011).

Erica L. ist eine Gruppe von verholzten beständigen Sträuchern und Halbsträuchern von 0,2-1,5 m Höhe, obwohl manche Arten wie *E. arborea* als 20 m hohe Bäume wachsen können (Hansen 1950, Oliver 1991, Stevens et al. 2004). Die Lebensräume der Eriken sind normalerweise Heide- und Moorlandschaften in der atlantischen Region oder Dickicht im Mittelmeerraum (Loidi et al. 2007). Heidelandschaften sind halbnatürliche Gebiete, die als Folge des Weidens, Abbrennens und des Holzsammlens für Feuer seit dem Mesolithikum entstanden sind (Webb 1998). Maquis sind Strauchsavannen entlang der Mittelmeerküste und

sind von Trockenheit und Feuer betroffene Landschaften. Diese Regionen haben typischerweise eine hohe Vegetationsschicht, d.h. sie haben einen hohen Gehalt an organischem Humus. Dieser Boden weist ein geringes Nährstoffpotential für die Pflanze auf (Webb 1998).

An vielen Standorten erfüllen die *Erica*-Arten wichtige soziale Dienste. Heidekraut wird für die Produktion von Besen und Bürsten, den Bau von Dächern, die Füllung von Matratzen, als Quelle von Nektar für Honig und Bienenwachs, als Brennstoff zum Heizen und Kochen, und als Essenz in Speisen und Getränken verwendet (Small und Wulff 2008). Neuere Studien weisen auf mögliche medizinische Anwendungen als Antioxidantien hin (Luis et al. 2009). Außerdem werden Arten wie *Erica andevalensis* Cabezudo und Rivera oder *Erica australis* L. als Methalophyten eingestuft oder als überlebensfähige Pflanzen in kontaminierten Böden betrachtet. Diese Eigenschaften existieren aufgrund der assoziierten Mykorrhiza im Wurzelsystem der Pflanze (Abreu et al. 2008).

Für die Landschaft spielt *Erica* ebenfalls eine wichtige Rolle. Diese Arten bilden die Heidelandschaften, die wegen ihrer natürlichen und sozialen Werte, als wichtige Ökosysteme angesehen werden (Forup et al. 2008). Manche *Erica*-Arten sind selten und werden daher als gefährdet eingestuft und in der Folge geschützt, so zum Beispiel *E. bocquetii* in der Türkei, *E. lusitanica* in Frankreich, *E. andevalensis* in Spanien oder *E. manipuliflora* in Zypern. Im Gegenteil dazu werden viele andere Arten als fremdartig, schädlich und schwierig zu bekämpfen, angesehen (Mather und Williams 1990, Sorrie 2005).

Schließlich sind Eriken als Zierpflanzen für den Gartenbau von überragender Bedeutung und erlangen diese Bedeutung auch aufgrund ihrer Trockenheits- und Kältetoleranz und ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber nährstoffarmen Böden (Small und Wulff 2008). In Deutschland werden *Erica*-Pflanzen für den einheimischen Markt als auch für den Export ins Ausland gezüchtet und produziert. Im Jahr 2012 wurden 110 Millionen *Calluna* und 10 Millionen Eriken angebaut (Sondergruppe Azerca).

Um die Markbedeutung des Eriken-Anbaues sicherzustellen ist die Züchtung von neuen Sorten mit interessanten Typen und Variationen ein wichtiges Instrument. Für eine nachhaltige Züchtung ist ein diverses Ausgangsmaterial von entscheidender Bedeutung. Allerdings ist genau dieses Ausgangsmaterial zurzeit genetisch sehr eng und basiert laut Grunewaldt (Bundesforschungsanstalt für Gartenbauliche Pflanzenzüchtung, Ahrensburg) im Wesentlichen auf spontane Mutanten und Zufallssämlinge aus den Sorten 'Glasers Rote' und 'Globularis'. Entsprechend gering ist der Unterschied zwischen den Sorten. Bemühungen, durch Mutationsinduktion die Sortenunterschiede zu vergrößern, führten nicht zu den erwünschten Ergebnissen. Erst die Einkreuzung von *Erica gracilis*-Genotypen aus Südafrika in der damaligen Bundesforschungsanstalt für Gartenbauliche Pflanzenzüchtung, Ahrensburg, brachte eine Erweiterung der Blütenfarbintensität, der Blüteverfrühung und des Pflanzenaufbaues. Neben der bedeutenden *Erica gracilis* sind zunehmend weitere *Erica*-Arten mit höherer Winterhärte im Anbau und werden züchterisch bearbeitet.

Der geringen Variabilität der heimischen *Erica*-Arten steht die große Diversität von *Erica*-Arten in Südafrika, wo ein Großteil der *Erica*-Arten beheimatet ist. Hier findet man eine große Formenmannigfaltigkeit. Diese züchterisch sehr interessanten Arten stammen nach einer Hypothese von den europäischen Arten ab und sind demzufolge später entstanden (McGurie und Kron 2005). Daher dürfte die verwandtschaftliche Beziehung innerhalb der südafrikanischen Arten für mögliche Kreuzungsversuche von großer Bedeutung sein. Dieses ist insbesondere für die Verbesserung der Art *Erica gracilis* von großer Bedeutung. Die Verbindung zwischen afrikanischen und den europäischen Arten besteht über die Art *Erica arborea*, die sowohl in Afrika als auch in Europa vorkommt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Afrikanischen Arten von der *Erica arborea* (oder einer nahen Verwandten) abstammen und dass unter den afrikanischen Gegebenheiten die große Anzahl und Mannigfaltigkeit entstand. Aufgrund dieser Hypothese wäre es für die weitere züchterische Verbesserung notwendig die exakten Abstammungen zu kennen, um die Arten hinsichtlich ihrer Kreuzungschancen und Einteilungen in Genpools zu bewerten. Eine exakte Abstammungsanalyse würde sowohl zur potentiellen Verbesserung der europäischen Zierpflanzenarten aber auch zur Verbesserung von *Erica gracilis* beitragen. Insbesondere die

feineren Abstammungsverhältnisse zwischen *Erica gracilis* und deren nahen Verwandten dürften Chancen für mögliche Kreuzungspartner aufzeigen.

Die Arbeitsgruppe Kron (McGurie und Kron 2005) hat neben umfangreichen systematischen Klassifizierungen der *Ericaceae* auch Gene identifiziert, mit denen die *Erica*-Abstammung für einige Arten dargestellt wurde. Aus diesen Arbeiten der molekularen Systematik stammen wesentliche Erkenntnisse für die neuere Einordnung bzw. Bestätigung der Einordnung der *Erica*-Arten. Allerdings sind in dieser Studie nur wenige (14) der südafrikanischen Arten (760) berücksichtigt, so dass hier zusätzliche Informationen dringend notwendig sind, um die genetische Variabilität des Zuchtmaterials zu erhöhen.

Trotz der großen wirtschaftlichen Bedeutung der *Erica*-Arten ist die Phylogenie der Familie nicht aufgeklärt (Oliver 2000, McGurie und Kron 2005). Einige Gründe dafür liegen in der hohen Anzahl an Arten. Aber auch die große morphologische Variabilität ist, mit einer möglichen hohen Rate an Homoplasie, hierfür verantwortlich (Oliver 2000).

1.2 Zielsetzung

In dieser Forschungsarbeit wurde eine phylogenetische Analyse von europäischen und südafrikanischen *Erica*-Arten durchgeführt. Dabei sind die DNA-Regionen aus dem Zellkern (ITS) und aus den Chloroplasten (*trnL-trnL-trnF*, und 5'*trnK-matK*-intron und *matK*-Gen) als molekulare Marker untersucht worden. In der Literatur wurden die nördlichen *Erica*-Arten als paraphyletisch und basal zu den südafrikanischen Arten beschrieben (McGuire und Kron 2005, Pirie et al. 2011). Diese Studie beabsichtigt i) die Monophylie der untersuchten Eriken zu erklären ii) die Aufklärung der evolutiven Beziehungen innerhalb dieser Arten zu erläutern iii) dem Vergleich der zwei DNA-Typen (Nuklear und Chloroplast) bezüglich deren Kongruenz zu testen. In der Diskussion werden mögliche Gründe für die Inkongruenz der Bäume behandelt. Aufgrund der Hypothese, dass manche Arten einen möglichen hybriden Ursprung haben könnten, wird die elterliche Vererbung der Organellen,

das heißt Mitochondrien und Chloroplasten, untersucht. Dies geschah durch die Analyse eines künstlichen Hybriden und der entsprechenden Elternteile.

Die relative Genomgröße soll via Durchflusszytometrie mit DAPI für selektierte Proben kalkuliert werden, um festzustellen, ob Ploidieänderungen in einer Kreuzungsplanung berücksichtigt werden müssen.

Diese Arbeit beabsichtigt die Beschaffung grundlegender Information der Gattung *Erica*, um wichtige Aspekte ihrer Biologie, ihres Ursprung sowie phylogenetische Beziehung der Arten besser zu verstehen. Somit werden auch die Kreuzungen zwischen den Arten für die Entwicklung neuer *Erica*-Sorten durch die Pflanzenzüchter unterstützt. Insbesondere die Abstammung kann wertvolle Hinweise für eine Priorisierung von geplanten Kreuzungskombinationen geben. Die Frage, ob bei den interessanten Kreuzungspartnern möglicherweise eine Polyploidisierung stattgefunden hat, führt zu weiteren Hinweisen für eine erfolgreiche Kreuzungsplanung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Rahmen dieser Studie war es geplant eine große Anzahl an *Erica*-Arten in die phylogenetischen Untersuchungen einzubringen. Es gelang Material von insgesamt 244 *Erica*-Pflanzen zu erhalten, welches in die Analyse der molekularen Phylogenie einbezogen werden konnte. Hierbei handelt es sich um 20 „nördliche“ (Mittelmeer und Europa) *Erica*-Arten und -Unterarten, drei Arten aus Zentral-Afrika, und 160 südafrikanische Arten (Tabelle 1 und 2). Zusätzlich wurden *Calluna vulgaris* und *Daboecia cantabrica* als „Außengruppe“ der Gattung *Erica* ausgewählt (Tabelle 3). Tabelle 1, 2 und 3 beschreiben Name, Ursprung und Voucher der jeweiligen Proben.

Die Pflanzenproben kommen aus folgenden Sammlungen: Dr. Jaime Fagúndez aus der Universität Santiago de Compostela, Spanien.

- i) Bundesgarten-Belvedere in Wien, Österreich.
- ii) Botanischer Garten von der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland.
- iii) Botanischer Garten Kirstenbosch, Südafrika. Die Pflanzenproben (Voucher) sind im SANT-Herbarium gelagert und sie sind durch das GBIF (Global Biodiversity Information Facility) zugreiflich.

Für einen Test zur Festlegung der Organellenvererbung, d.h. Chloroplasten und Mitochondrien, wurde eine Kreuzung aus dem Privatbesitz des Pflanzzüchters Kurt Kramer aus Deutschland geprüft (Tabelle 4).

Tabelle 1. Untersuchte *Erica*-Arten aus Europa und dem Mittelmeerraum

Species	Collection Place / Altitude [m] / Year	Voucher Specimens SANT herbarium / Collector
<i>Erica andevalensis</i> Cabezudo & Rivera	Huelva, Spain/1999	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	León, Spain/640 m/2009	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Jaén, Spain//730 m/2009	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Vizcaya, Spain/2004	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Dalmatia, Croatia/2007	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Ciudad Real, Spain/640 m/2010	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Ciudad Real, Spain/730 m/2010	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Thasos, Greece/2007	Carni
<i>Erica arborea</i> L.	La Gomera, Spain/1999	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Madeira, Portugal/2004	Fagúndez
<i>Erica arborea</i> L.	Turkey	AAD 17714
<i>Erica arborea</i> L.	Tenerife, Spain/2010	Kuppler
<i>Erica australis</i> L.	León, Spain/1130 m/2009	Fagúndez
<i>Erica australis</i> L.	Jaén, Spain/740 m/2009	Fagúndez
<i>Erica carnea</i> L.	Italy/2006	Andrés
<i>Erica carnea</i> L.	BBG	
<i>Erica ciliaris</i> L.	A Coruña, Spain/290 m/2009	Fagúndez

Table 1-1Fortsetzung

Species	Collection Place / Altitude [m] / Year	Voucher Specimens SANT herbarium / Collector
<i>Erica ciliaris</i> L.	Lugo, Spain/415 m/2009	Fagúndez
<i>Erica ciliaris</i> L.	A Coruña, Spain/280 m/2009	Fagúndez
<i>Erica ciliaris</i> L.	Cádiz, Spain/2002	Fagúndez, Reyes
<i>Erica cinerea</i> L.	Lugo, Spain/465 m/2009	Fagúndez
<i>Erica cinerea</i> L.	A Coruña, Spain/280 m/2009	Fagúndez
<i>Erica cinerea</i> L.	A Coruña, Spain/280 m/2009	Fagúndez
<i>Erica cinerea</i> L.	Connemara, Ireland/40 m/2009	Fagúndez
<i>Erica cinerea</i> L.	Connemara, Ireland/110 m/2009	Fagúndez
<i>Erica erigena</i> R. Ross	A Coruña, Spain/290 m/2009	Fagúndez
<i>Erica erigena</i> R. Ross	A Coruña, Spain/280 m/2009	Fagúndez
<i>Erica erigena</i> R. Ross	Connemara, Ireland/40 m/2009	Fagúndez
<i>Erica lusitanica</i> subsp. <i>cantabrica</i> Rudolph.	Oviedo, Spain/2004	Fagúndez
<i>Erica lusitanica</i> subsp. <i>cantabrica</i> Rudolph.	Guipuzkoa, Spain/2004	Fagúndez
<i>Erica lusitanica</i> subsp. <i>lusitanica</i> Rudolph.	Ciudad Real, Spain/2000	Fagúndez
<i>Erica lusitanica</i> subsp. <i>lusitanica</i> Rudolph.	Huelva, Spain/1999	Fagúndez, Reyes
<i>Erica mackayana</i> Bab.	Lugo, Spain/465 m/2009	Fagúndez
<i>Erica mackayana</i> Bab.	A Coruña/280 m/2009	Fagúndez
<i>Erica mackayana</i> Bab.	Connemara, Ireland/70 m/2009	Fagúndez
<i>Erica mackayana</i> Bab.	Connemara, Ireland/70 m/2009	Fagúndez
<i>Erica mackayana</i> Bab.	Connemara, Ireland/70 m/2009	Fagúndez
<i>Erica maderensis</i> (Benth.) Bornm.	Madeira, Portugal/1850 m/2004	Fagúndez
<i>Erica maderensis</i> (Benth.) Bornm.	Madeira, Portugal/1800 m/2004	Fagúndez
<i>Erica manipuliiflora</i> Salisb.	Dalmacia, Croatia/2007	Fagúndez
<i>Erica manipuliiflora</i> Salisb.	Cyprus/230 m/2009	Fagúndez
<i>Erica manipuliiflora</i> Salisb.	Mar Roukos, Lebanon/2010	Fagúndez, Bou-Daguer
<i>Erica manipuliiflora</i> Salisb.	BGV	
<i>Erica multiflora</i> L.	Sicily, Italy/95 m/2009	Fagúndez
<i>Erica multiflora</i> L.	Sicily, Italy/640 m/2009	Fagúndez
<i>Erica multiflora</i> L.	Valencia, Spain/2000	Fagúndez

Table 1-2Fortsetzung

Species	Collection Place / Altitude [m] / Year	Voucher Specimens SANT herbarium / Collector
<i>Erica platycodon</i> (Webb & Berthel.) S.Rivas-Martínez subsp. <i>maderincola</i> (D.C. McClin.) S. Rivas-Martínez et al.	Madeira, Portugal/750 m/2004	Fagúndez
<i>Erica platycodon</i> (Webb & Berthel.) S.Rivas-Martínez subsp. <i>maderincola</i> (D.C. McClin.) S. Rivas-Martínez et al.	Madeira, Portugal/1850 m/2004	Fagúndez
<i>Erica platycodon</i> (Webb & Berthel.) S.Rivas-Martínez subsp. <i>platycodon</i>	Tenerife, Spain/1999	Fagúndez
<i>E. scoparia</i> L. subsp. <i>azorica</i> (Hochst.) D. A. Webb	Açores, Portugal/2009	Pene
<i>E. scoparia</i> L. subsp. <i>azorica</i> (Hochst.) D.A. Webb	Açores, Portugal/2009	Pene
<i>Erica scoparia</i> L. subsp. <i>scoparia</i>	Cádiz, Spain/2002	Fagúndez, Reyes
<i>Erica scoparia</i> L. subsp. <i>scoparia</i>	Ciudad Real, Spain/730 m/2010	Fagúndez
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>sicula</i>	Sicily, Italy/160 m/2009	Fagúndez
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>sicula</i>	Sicily, Italy/250 m/2009	Fagúndez
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>sicula</i>	Sicily, Italy/240 m/2009	Fagúndez
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>libanotica</i>	Kyrenia, Cyprus/630 m/2009	Fagúndez
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>libanotica</i>	Kyrenia, Cyprus/390 m/2009	Fagúndez
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>libanotica</i>	Kyrenia, Cyprus/420 m/2009	Fagúndez
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>libanotica</i>	Nahr Ibrahim, Lebanon/2010	Fagúndez, Bou-Daguer
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>libanotica</i>	Aaqoura, Lebanon/1440 m/2010	Fagúndez, Douaihy

Table 1-3Fortsetzung

Species	Collection Place / Altitude [m] / Year	Voucher Specimens SANT herbarium / Collector
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>libanotica</i>	Nahr Ibrahim, Lebanon/2010	Fagúndez, Bou-Daguer
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>cyrenaica</i>	Libya	Guichard
<i>Erica sicula</i> Gussone subsp. <i>libanotica</i>	Antalya, Turkey/1992	Turland
<i>Erica spiculifolia</i> Salisb.	Serbia/2000 m/2005	Lazarevic
<i>Erica spiculifolia</i> Salisb.	Romania/2005	Bitá-Nicolae
<i>Erica spiculifolia</i> Salisb.	BGV	
<i>Erica terminalis</i> Salisb.	Valencia, Spain/2002	Izco
<i>Erica terminalis</i> Salisb.	Málaga, Spain/2002	Fagúndez
<i>Erica tetralix</i> L.	A Coruña, Spain/290 m/2009	Fagúndez
<i>Erica tetralix</i> L.	Connemara, Ireland/40 m/2009	Fagúndez
<i>Erica tetralix</i> L.	Connemara, Ireland/70 m/2009	Fagúndez
<i>Erica tetralix</i> L.	Connemara, Ireland/70 m/2009	Fagúndez
<i>Erica tetralix</i> L.	Connemara, Ireland/110 m/2009	Fagúndez
<i>Erica tetralix</i> L.	Ciudad Real, Spain/2000	Fagúndez
<i>Erica umbellata</i> L.	Lugo, Spain/465 m/2009	Fagúndez
<i>Erica umbellata</i> L.	Toledo, Spain/700 m/2000	Fagúndez, Zuazua
<i>Erica vagans</i> L.	A Coruña, Spain/280 m/2009	Fagúndez
<i>Erica vagans</i> L.	León, Spain/2010	Fagúndez
<i>Erica</i> × <i>stuartii</i> M. T. Masters	Connemara, Ireland/70m/2009	Fagúndez

BGV: Belvederegarten Vienna

Tabelle 2. Untersuchte *Erica*-Arten aus Zentralafrika und Südafrika.

Species	Source / Voucher Specimens SANTSANT herbarium
<i>Erica abietina subsp abietina</i> L.	KBG/156/94
<i>Erica acuta</i> Andr.	KBG/1402/82
<i>Erica albens</i> L.	KBG/790/07
<i>Erica amoena</i> Wendl.	KBG/488/94
<i>Erica aneimensa</i> Dulfer	KBG/974/86
<i>Erica annectens</i> Guth. & Bol.	KBG/479/90
<i>Erica banksii</i> Andr.	KBG/174/79
<i>Erica bauera</i> Andr.	GBZS/40
<i>Erica baueri</i> Andr.	KBG/335/05
<i>Erica bergiana</i> L.	BGV/83
<i>Erica blanchiana</i> L. Bolus	KBG/398/88
<i>Erica blandfordia</i> Andr.	KBG/192/04
<i>Erica blenna</i> Salisb.	KBG/487/03
<i>Erica bolusiae</i> Salter	KBG/1466/84
<i>Erica brachialis</i> Salisb.	KBG/517/85
<i>Erica caffra</i> L.	GBZS/42
<i>Erica calycina</i> L.	GBZS/30
<i>Erica cameronii</i> L. Bolus	KBG/125/72
<i>Erica canescens</i>	KBG/701/05
<i>Erica capitata</i> L.	KBG/1467/84
<i>Erica caterviflora</i> Salisb.	KBG/159/95
<i>Erica cerinthoides</i> L.	BBG/16917
<i>Erica chamissonis</i> Klotzsch ex Benth.	KBG/227/04
<i>Erica clavisepala</i> Guth. & Bol.	KBG/395/88
<i>Erica coarctata</i> Wendl.	KBG/611/86
<i>Erica coccinea</i> L.	KBG/211/75
<i>Erica conica</i> Lodd.	BGV/92
<i>Erica conspicua</i> Soland.	KBG/283/72
<i>Erica corifolia</i> L.	KBG/100/04
<i>Erica cruenta</i> Soland.	BGV/93
<i>Erica cubica</i> L.	KBG/342/84
<i>Erica curviflora</i> L.	BGB/22593
<i>Erica curvirostris</i>	KBG/177/98

Table 2-1 Fortsetzung

Species	Source / Voucher Specimens SANT herbarium
<i>Erica chrysocodon</i> Guth. & Bol.	KBG/41/82
<i>Erica cyanthiformis</i> Salisb.	BGV/95a
<i>Erica cyanthiformis</i> Salisb.	BGV/95d
<i>Erica cyrilliflora</i> Salisb.	KBG/141/07
<i>Erica deflexa</i> Sincl.	KBG/697/83
<i>Erica demissa</i> Klotzsch ex Benth.	KBG/241/89
<i>Erica densifolia</i> Willd.	KBG/157/09
<i>Erica denticulata</i> L.	KBG/AH 1009
<i>Erica diaphana</i> Spreng.	KBG/348/04
<i>Erica dichrus</i> Spreng.	GBZS/39
<i>Erica discolor</i> Andr.	KBG/411/03
<i>Erica dodii</i> Guth. & Bol.	KBG/794/07
<i>Erica doliiformis</i> Salisb.	BBG/22592
<i>Erica duthieae</i> L. Bolus	KBG/163/07
<i>Erica elimensis</i> L. Bolus	BGV/99
<i>Erica empetrina</i> L.	KBG138/95
<i>Erica erasmia</i>	KBG/426/03
<i>Erica eugenea</i> Dulfer	KBG/131/94
<i>Erica fairii</i> H. Bolus	KBG62/71
<i>Erica fascicularis</i> L.	BGV/101
<i>Erica fasciculate</i> Thunb.	GBZS/27
<i>Erica ferrea</i> Berg.	KBG/457/82
<i>Erica fimbriata</i> Andr.	KBG/792/07
<i>Erica foliacea</i> Andr.	KBG/720/82
<i>Erica fontana</i> L. Bolus	KBG/61/77
<i>Erica formosa</i> Thunb.	BGV/102
<i>Erica fourcadei</i> L. Bolus	KBG/290/07
<i>Erica georgica</i> Guth. & Bol.	BBG/22594
<i>Erica gibbosa</i> Klotzsch ex Benth.	BGV/104
<i>Erica glabella</i> subsp. <i>glabella</i>	KBG/624/75
<i>Erica glandulosa</i> Thunb.	BGV106
<i>Erica glauca</i> var. <i>glauca</i> Andr.	KBG/94/04
<i>Erica glomiflora</i> Salisb.	KBG/795/07

Table 2-2 Fortsetzung

Species	Source / Voucher Specimens SANT herbarium
<i>Erica gracilis</i> Wendl.	BGV/107
<i>Erica grandiflora</i> L.	BGV/108
<i>Erica grata</i> Guth. & Bol.	GBZS/23
<i>Erica haemastoma</i> Wendl.	KBG/460/82
<i>Erica haematocodon</i> Salter	KBG/526/87
<i>Erica halicacaba</i>	KBG/136/07
<i>Erica hebecalyx</i> Benth.	BGV/110
<i>Erica heleogena</i> Salter	KBG/140/07
<i>Erica heliophila</i> Guth. & Bol.	GBZS/25
<i>Erica hirtiflora</i> Curtis	BGV/112
<i>Erica humifusa</i> Hibbert ex Salisb.	KBG/813/07
<i>Erica imbricate</i> L.	KBG/194/04
<i>Erica inflata</i> Thunb.	KBG/45/09
<i>Erica infundibuliformis</i> Andr.	KBG/183/07
<i>Erica insolitanthera</i> H. A. Baker	KBG/242/94
<i>Erica kingaensis</i> Engl. <i>subsp. Bequaertii</i> (De Wild.) R. Ross	Rwenzori, Congo/3000 m /1997
<i>Erica laeta</i> Bartl.	GBZS/33
<i>Erica leptopus</i> var. <i>leptopus</i> Benth.	KBG/714/83
<i>Erica leucantha</i> Link	KBG/864/89
<i>Erica leucotrachela</i> H. A. Baker	KBG/988/77
<i>Erica longifolia</i> Ait.	BGV/114
<i>Erica lowryensis</i> H. Bolus	KBG/482/03
<i>Erica lutea</i> Berg.	KBG/158/95
<i>Erica mammosa</i> L.	GBZS/32
<i>Erica margaritaceae</i> Soland.	BGV120
<i>Erica massonii</i> L.	KBG/47/98
<i>Erica melanthera</i> L.	KBG/290/94
<i>Erica modesta</i> Salisb.	KBG/462/87
<i>Erica mollis</i> Andr.	GBZS/21
<i>Erica monadelphica</i> Andr.	KBG610/83
<i>Erica multumbellifera</i>	KBG/405/98
<i>Erica nabea</i> Guth. & Bol.	KBG/564/06

Table 2-3 Fortsetzung

Species	Source / Voucher Specimens SANT herbarium
<i>Erica nana</i> Salisb.	KBG/115/74
<i>Erica nevillei</i> L. Bolus	KBG/86/04
<i>Erica oatesii</i> Rolfe	KBG/823/89
<i>Erica oblongiflora</i> Benth.	KBG/4/84
<i>Erica oreotragus</i> E. G. H. Oliv.	KBG/796/07
<i>Erica ostiaria</i> Compton	KBG/147/79
<i>Erica pageana</i> L. Bolus	GBZS/26
<i>Erica parilis</i> Salisb.	KBG/97/04
<i>Erica parvula</i> Guth. & Bol.	KBG/544/88
<i>Erica patersonia</i> Andr.	BBG/112675
<i>Erica patersonii</i> L. Bolus	KBG/4/89
<i>Erica peltata</i> Andr.	KBG/348/09
<i>Erica penicilliformis</i> Salisb.	KBG340/06
<i>Erica perspicua</i> Wendl.	BGV/123
<i>Erica peziza</i> Lodd.	KBG/169/79
<i>Erica physodes</i> L.	KBGAH2311
<i>Erica pillansii</i> H. Bolus	BGV/124
<i>Erica pubescens</i> L.	BGV/125
<i>Erica pyxidiflora</i> Salisb.	KBG/130/07
<i>Erica quadrangularis</i> Salisb.	KBG/164/07
<i>Erica quadrisulcata</i> L. Bolus	KBG/543/87
<i>Erica recta</i> H. Bolus	KBG/211/73
<i>Erica regia</i> subsp. <i>regia</i> Bartl.	KBG/1613/70
<i>Erica retorta</i> Montin	KBG/336/84
<i>Erica rossii</i> L. J. Dorr	Rwenzori, Congo/3000 m/1997
<i>Erica rubens</i> Thunb.	BGV/126
<i>Erica scabriuscula</i> Lodd.	KBG/428/03
<i>Erica serpifolia</i> Andr.	GBZS/20
<i>Erica sessiliflora</i> L.	BGV/129
<i>Erica shannonii</i> Lodd.	KBG/607/83
<i>Erica sitiens</i> Klotzsch	KBG/49/05
<i>Erica sonderiana</i> Guth. & Bol.	KBG/804/07
<i>Erica sparrmanii</i> L.	KBG/180/92

Table 2-4 Fortsetzung

Species	Source / Voucher Specimens SANTSANT herbarium
<i>Erica sparsa</i> Lodd.	BGV/130
<i>Erica spectabilis</i> Klotzsch ex Benth.	KBG/193/84
<i>Erica stokoei</i> L. Bolus	KBG/62/83
<i>Erica strigilifolia</i> Salisb.	KBG/249/89
<i>Erica stylaris</i> Spreng.	KBG/721/83
<i>Erica subdivaricata</i> Berg.	KBG/655/84
<i>Erica taxifolia</i> Bauer	KBG/58/82
<i>Erica tenuis</i> Salisb.	KBG/446/90
<i>Erica toringbergensis</i> H. A. Baker	KBG/45/92
<i>Erica totta</i> Bartl.	KBG/156/95
<i>Erica tragulifera</i> Salisb.	KBG/349/04
<i>Erica transparens</i> Berg.	KBG/801/07
<i>Erica transparens</i> Berg.	BGV/135
<i>Erica triflora</i> L.	BGV/136
<i>Erica trimera subsp. trimera</i> (Engl.) H.J.Beentje	Rwenzori, Congo/3500 m/1997
<i>Erica tumida</i> Ker-Gawl.	KBG/98/04
<i>Erica turgida</i> Salisb.	BGV/134
<i>Erica uberiflora</i> E. G. H. Oliv. ex. <i>Simocheilus multiflorus</i> Klotzsch	KBG/250/89
<i>Erica urna-viridis</i> H. Bolus	KBG/192/93
<i>Erica uysii</i> H. A. Baker	KBG/2/84
<i>Erica vallis-aranearum</i> E. G. H. Oliv.	KBG/545/84
<i>Erica ventricosa</i> Thunb.	GBZS/34
<i>Erica verecunda</i> Salisb.	KBG/230/06
<i>Erica versicolor</i> Andr.	KBG/197/08
<i>Erica verticilata</i> Berg.	BBG/17637
<i>Erica vestita</i> Thunb.	KBG/176/05
<i>Erica viridescens</i> Lodd.	GBZS/28
<i>Erica viridiflora</i> Andr.	KBG/505/02
<i>Erica viscaria</i> Ait.	KBG/91/04
<i>Erica walkeriana</i> Sweet	BGV/140
<i>Erica winteri</i> H. A. Baker	KBG/343/84
<i>Erica zwartbergensis</i>	KBG/361/09

BBG: Bonn Botanical Garden ; BGV: Belvederegarten Vienna; BZS: Gartenbauzentrum Straelen; KBG: Kirstenbosch South Africa
GBZ: Gartenbauzentrum Starelen

Tabelle 3. Außengruppe.

Species	Ursprung/Höhe[m]	Voucher-Exemplar
<i>Calluna Vulgaris</i> (L.) Hull	Pontevedra, Spanien/900	3223 J. Fagúndez
<i>Daboecia cantabrica</i> (Huds.) K. Koch	Pontevedra, Spanien/900	3224 J. Fagúndez

Tabelle 4. Untersuchte Pflanzen für die Organellen-Vererbungsanalyse

Pflanzenprobe	Ursprung
<i>Erica arborea</i> (Mutterpflanze)	K. Kramer, Deutschland
<i>Erica carnea</i> (Vaterpflanze)	K. Kramer, Deutschland
<i>E. ×oldenburgensis</i> (Hybrid)	K. Kramer, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Molekulare Analyse

Pflanzenproben aus Herbarien sowie frisches Pflanzenmaterial (Blätter und Sprosstiele) wurden in Silica Gel Orange (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelagert. 20 mg getrocknete Blätter wurden in ein 2 ml Gefäß gegeben und einschließlich für 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Danach sind die Proben mittels des Qiagen Tissuelyser (Retsch GmbH & Co., Haan, Deutschland) gemahlen worden.

Die DNA aus den Chloroplasten, Zellkern und Mitochondrien der Pflanzenproben wurde mit Hilfe des DNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die extrahierte DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Die DNA-Regionen wurden mittels Standard-PCR-Methoden amplifiziert. Alle PCR-Amplifikationen hatten ein Endvolumen von 50 µl. Die Lösung hatte folgende Zusammensetzung: 1x Go Taq® reaction buffergreen (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), je 200 µM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Promega GmbH, Mannheim,

Deutschland), je 0.40 µM Forward-Primer sowie Reverse-Primer und 1.5 U/µl Go Taq® DNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland). Für die Negativkontrollen wurden dementsprechende Gefäße ohne DNA eingesetzt.

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler Tgradient Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland), unter Verwendung von Standard-Bedingungen je nach Anlagerungstemperatur der Primer.

Alle PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1% Agarosegel (Bio Budget technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) mit 1x TAE-Puffer getrennt. Die Gele wurden danach in einer 1.5: 5 1xTAE-Ethidiumbromid-Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) gefärbt.

Chloroplast: DNA-Marker-Region *trnL-trnL-trnF*

PCR-Amplifikation und Sequenzierung der zwei Regionen im Chloroplast: *trnL*-Intron und *trnL-trnF*-Spacer zusammen mit universal Primer-Paar trnTc und trnTf (Taberlet et al. 1991).

Chloroplast: DNA-Marker-Regionen 5' *trnK-matK*-Intron und *matK*-Gen

DNA-Regionen 5' *trnK-matK* Intron und ein Teil des *matK*-Gens wurden amplifiziert und sequenziert. Dabei wurden zwei verschiedene Primer-Paare i) Forward-Primer matk6 (Shaw et al. 2005) und ein neues Reverse-Primer matk79 (actcctgaaagataagcga), welches für diese Studie konzipiert wurde, und ii) Primer matK1F und matK1600R (McGuire und Kron 2005) verwendet. Der Reverse-Primer matk79 amplifiziert eine überlappende Region zwischen dem Gen und dem Intron, um beide Regionen in eine Linie einordnen zu können.

Zellkern: nukleare ribosomale DNA-Region

Die molekulare Bestimmung der ITS-Region der Pflanzenproben wurde mittels eines Primersets: ITS17se und ITS26se (Sun et al. 1994) durchgeführt. Die Primer wurden sowohl für die PCR als auch für die Sequenzierung verwendet. Polymorphismen wurden dabei nicht beobachtet und somit erfolgte keine Klonierung.

Mitochondrien: Marker-Region *cox3*

Die mitochondriale Marker-Region *cox3* wurde analysiert via Standard-PCR. Die PCR-Reaktion und die Sequenzierung wurden durchgeführt mittels eines Primerpaares (Duminil et al. 2002).

2.2.2 DNA-Sequenzierung und Alignment der Sequenzen

PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mit ExoSAP-IT® (USB/Affymetrix Inc., High Wycombe, England) aufgereinigt. Die Sequenzierung wurde bei Macrogen Inc. (Seoul, Korea) und Sequiserve GmbH (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt. Die letzte editierte auch die Sequenzen des Hybrids *Erica x stuartii* für die Festlegung der beiden nuklearen elterlichen Sequenzinformationen.

Unbearbeitete DNA-Sequenzen aus dem Nukleus- und Chloroplasten-Genom wurden analysiert und ausgerichtet mit der Software Geneious 5.0.4 (Drummond 2010) und von Hand korrigiert, um mit den entsprechenden überlappenden Sequenzen Contigs zu erstellen. Nur Sequenzen ohne Polymorphismen wurden verwendet. Schließlich wurden die editierten Matrizen für die Kalkulation der phylogenetischen Bäume eingesetzt.

2.2.3 Phylogenetische Analyse

Die aus unterschiedlichen Regionen stammenden DNA-Matrizen wurden für die Berechnung der Bäume verwendet. Alle untersuchten DNA-Regionen aus den Chloroplasten wurden in einer großen Matrix integriert und anschließend hieraus ein Baum berechnet. Die Matrix aus der ITS-Information wurde hiervon getrennt ausgewertet.

Die Phylogenie wurde mittels Maximum-Parsimony-Analyse mit der Software PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) errechnet. Der strenge Konsensbaum wurde mittels Ratchet-Algorithmus (Nixon, 1999) bei Prap2 (Müller, 2004) berechnet. Der Baum wurde gestützt auf das „bootstrapping“ (Felsenstein, 1985) und die „decayvalues“ kalkuliert mit PRAP2 und PAUP* 4.0b10. Als Außengruppe der phylogenetischen Bäume wurden die Gattungen *Daboecia cantabrica* und *Calluna vulgaris* implementiert. Die endgültigen Bäume wurden mit der Software TreeGraph2 (Stöver und Müller 2010) erstellt.

2.2.4 Kongruenztest

Die zwei entstandenen Matrizen aus der DNA-Information der Chloroplasten und der Zellkerne wurden auf Kongruenz getestet mit dem Incongruence Length Difference Test (ILD) (Faris, Kallersjo, Kluge, & Bult, 1995). Die Wahrscheinlichkeitsschwelle (p -Wert), um die Null-Hypothese abzulehnen, war bei $p > 0,05$ festgelegt. Der Test wurde in Paup* (Swofford, 2002) kalkuliert.

2.2.5 Elterliche Vererbung der Zellorganellen: Mitochondrien und Chloroplasten

Die resultierten DNA-Sequenzen der Regionen *cox3*, *trnL-trnL-trnF* und *matK*-Gen wurden manuell überprüft. Dies ermöglichte die Bestimmung der Anordnung der DNA-Basen des Hybriden mit dem entsprechenden Elternteil.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Zellkerne wurden aus ca. 1,5 cm langen Sprossen bei Verwendung von CyStain UV Precise P Kit (Partec, Deutschland) extrahiert. Die Proben wurden durch 50 µm Filter (CellTrics disposable filter, Partec, Deutschland) filtriert. Einschließlich wurden die Proben gefärbt und bis zur Messung im Dunkeln, gelagert.

Die Messung wurde am Institut für Molekulare Medizin und experimentelle Immunologie (Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. Es wurde ein BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences, Deutschland) mit einem Violet 405 nm Laser und einem 450/40 nm Filter verwendet.

2.2.7 Pollenlagerung

Pollenkörner aus den Antheren von *E. bauera*, *E. ventricosa* und *E. cerinthoides* wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen in Silicagel bei 5°C gelagert. Die Tubes wurden bis zu maximal 6 Monaten bei -20°C eingefroren. Die Messung der Pollenzellen wurde alle 4-5 Wochen durchgeführt. Dabei wurden die Pollenkörner mit einer fluoreszierenden Lösung aus FDA (Fluorescein-di-Acetat) (Sigma-Aldrich, USA) und Saccharose angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop Leica Leitz DMRB (Wetzlar, Deutschland) mit einer Digitalkamera Hitachi HV-20A (Japan) sind die lebenden fluoreszierenden Zellen bei einer Wellenlänge von 450 bis 490 nm zu sehen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Chloroplastenregion

Die Chloroplasten-Matrix enthält insgesamt 2738 Charaktere. Diese sind alle ungeordnet und mit gleicher Gewichtung. 1898 Charaktere sind konstant. 351 Charaktere sind variabel und nicht informativ. 489 Charaktere sind informativ. Der Konsensus-Baum aus 1723 Bäumen ist in Abbildung 1 dargestellt.

3.2 Analyse des Zellkernes

Die ITS-Matrix enthält insgesamt 945 Charaktere. Diese sind alle ungeordnet und mit gleicher Gewichtung. 522 Charaktere sind konstant. 142 Charaktere sind variabel und nicht informativ. 281 Charaktere sind informativ. Der Konsensus-Baum aus 86 Bäumen ist in Abbildung 2 dargestellt.

3.3 Kongruenztest

Der ILD-Test ergab eine niedrige Wahrscheinlichkeit mit $p=0,01$ und somit wurde die Null-Hypothese nicht abgelehnt. Das lässt darauf schließen, dass die gesamte Topologie, d.h. sowohl die nukleäre als auch die chloroplastische Topologie der Bäume, signifikant inkongruent ist. Das bedeutet, dass die beobachtete Information nicht fusioniert werden kann.

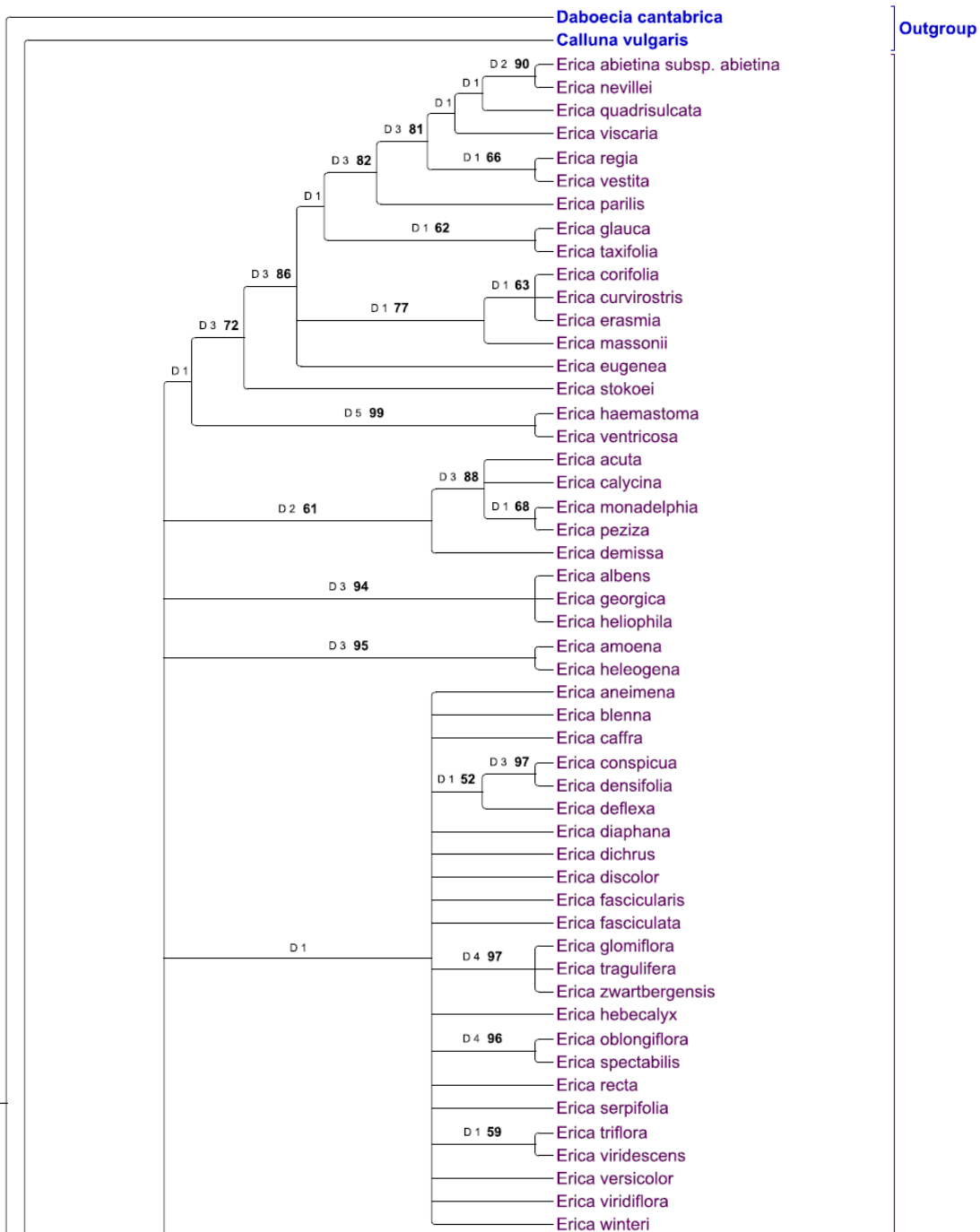


Abbildung 1. Streng-Konsensus-Baum der Chloroplasten-DNA-Region aus 1723 Bäumen.
 Länge=1446, CI=0,704, RI=0,871

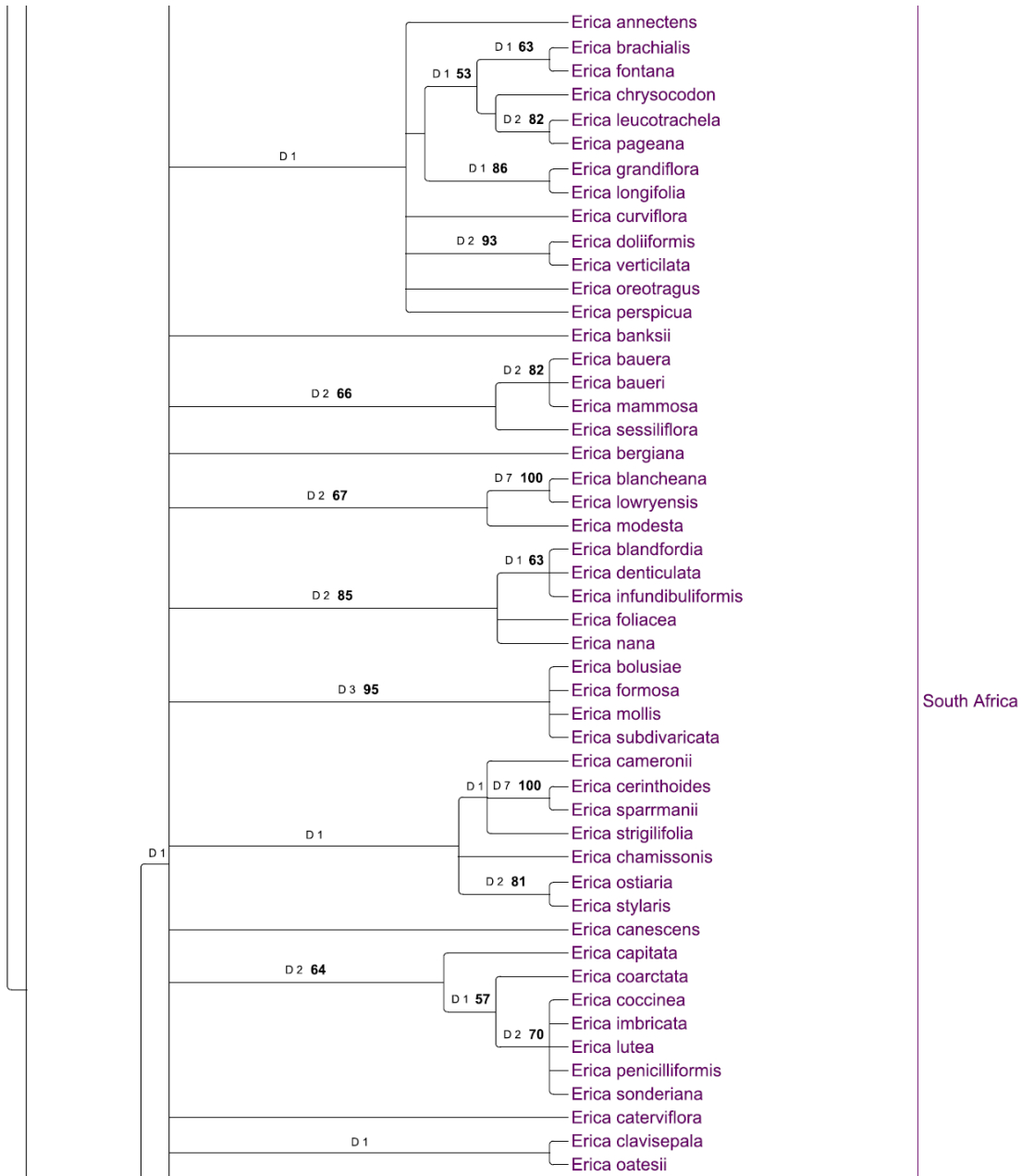


Abbildung 2. Streng-Konsensus-Baum der Chloroplasten-DNA-Region aus 1723 Bäumen.
Länge=1446, CI=0,704, RI=0,871

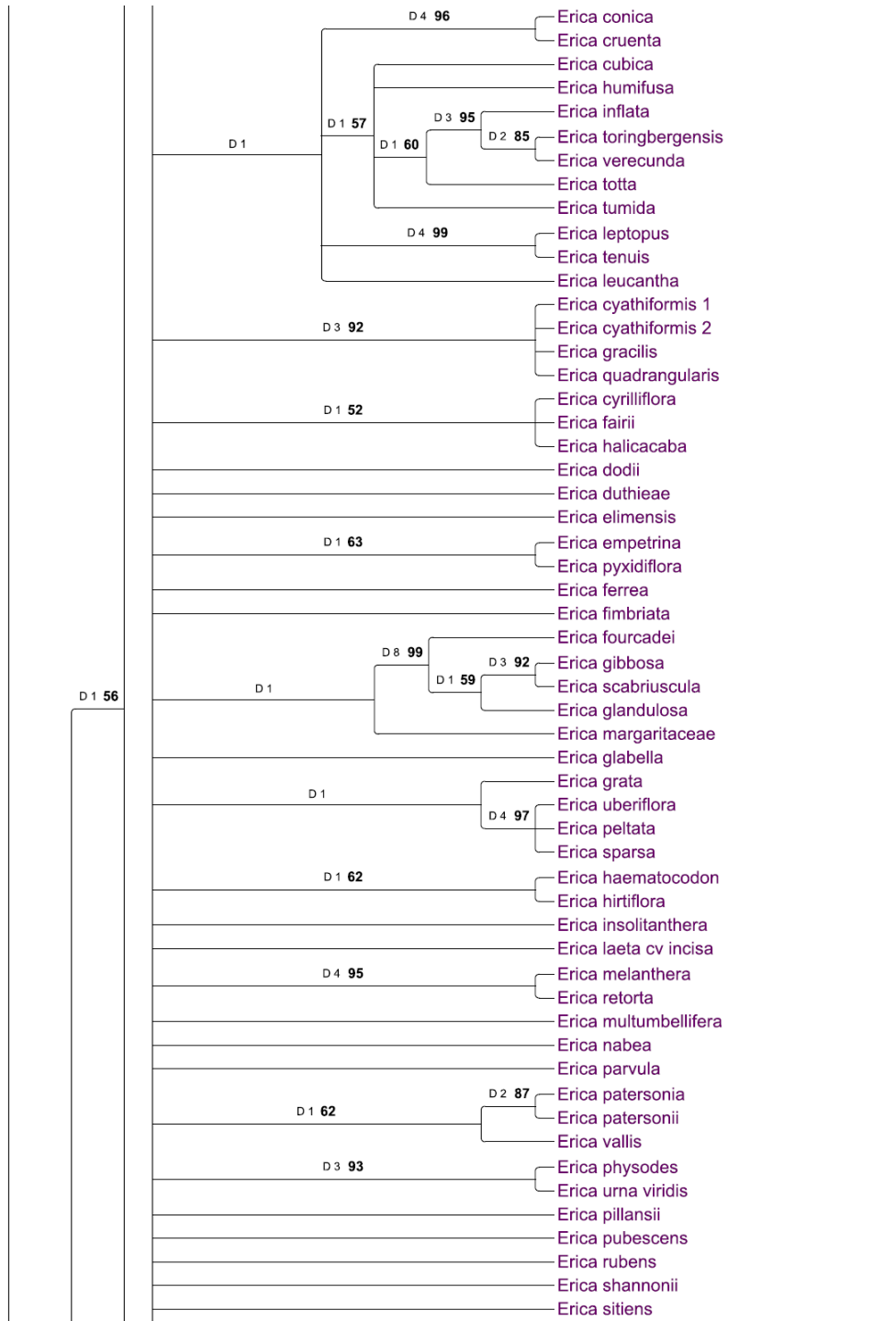


Abbildung 3. Streng-Konsensus-Baum der Chloroplasten-DNA-Region aus 1723 Bäumen.
 Länge=1446, CI=0,704, RI=0,871

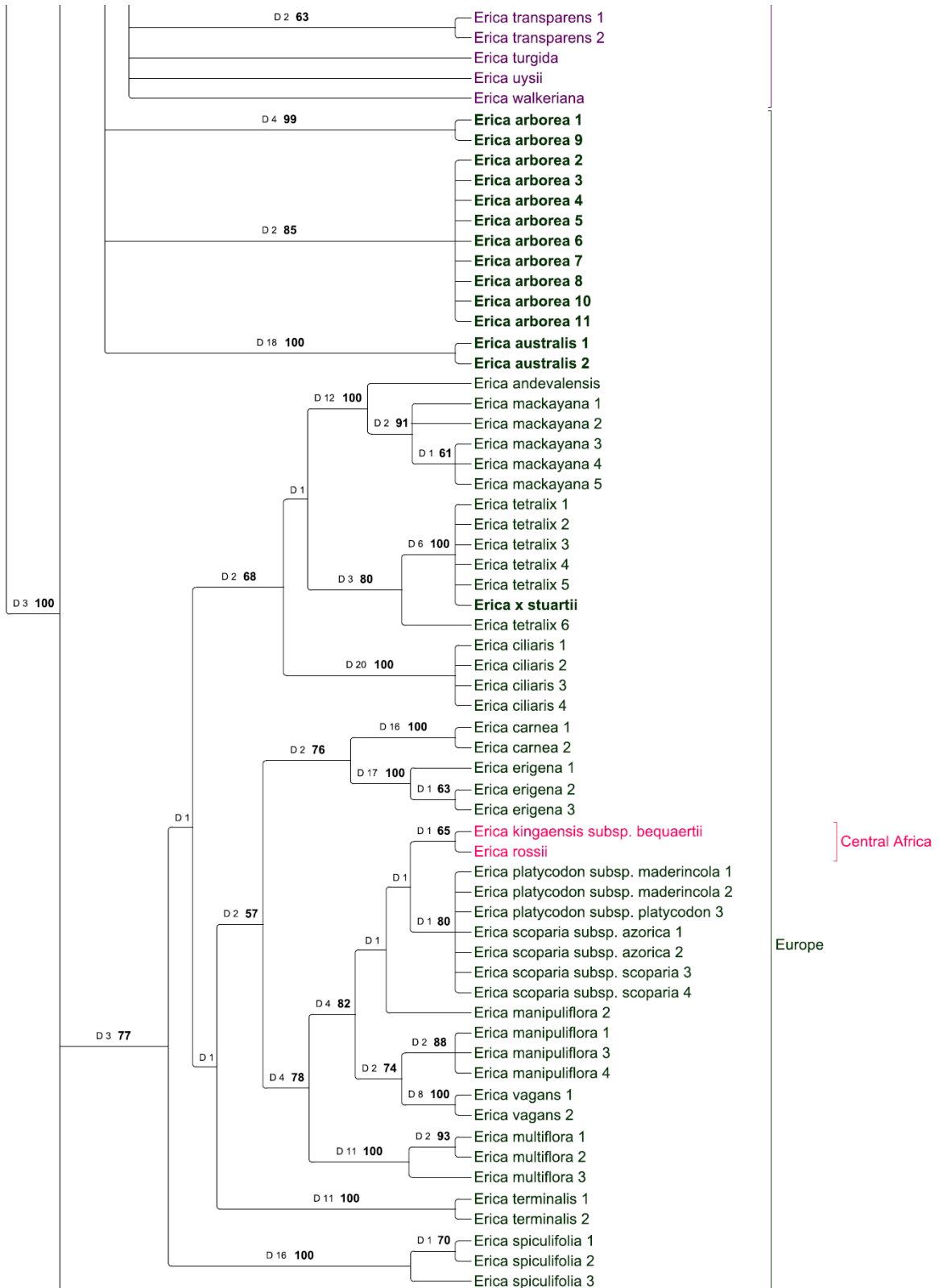


Abbildung 4. Streng-Konsensus-Baum der Chloroplasten-DNA-Region aus 1723 Bäumen.
Länge=1446, CI=0,704, RI=0,871

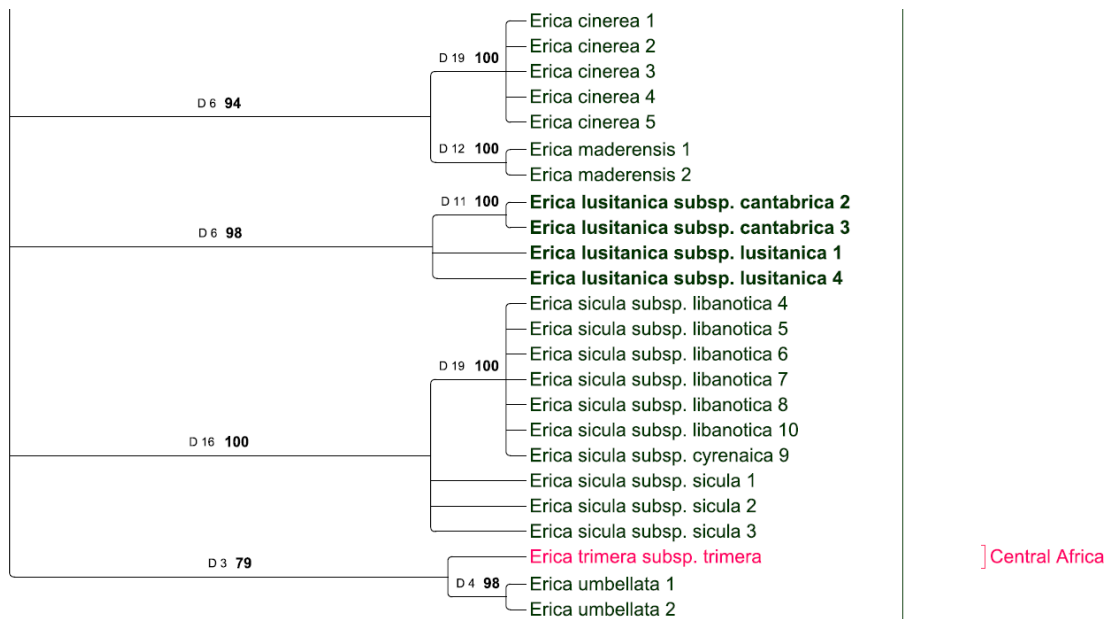


Abbildung 5. Streng-Konsensus-Baum der Chloroplasten-DNA-Region aus 1723 Bäumen.

Länge=1446, CI=0,704, RI=0,871

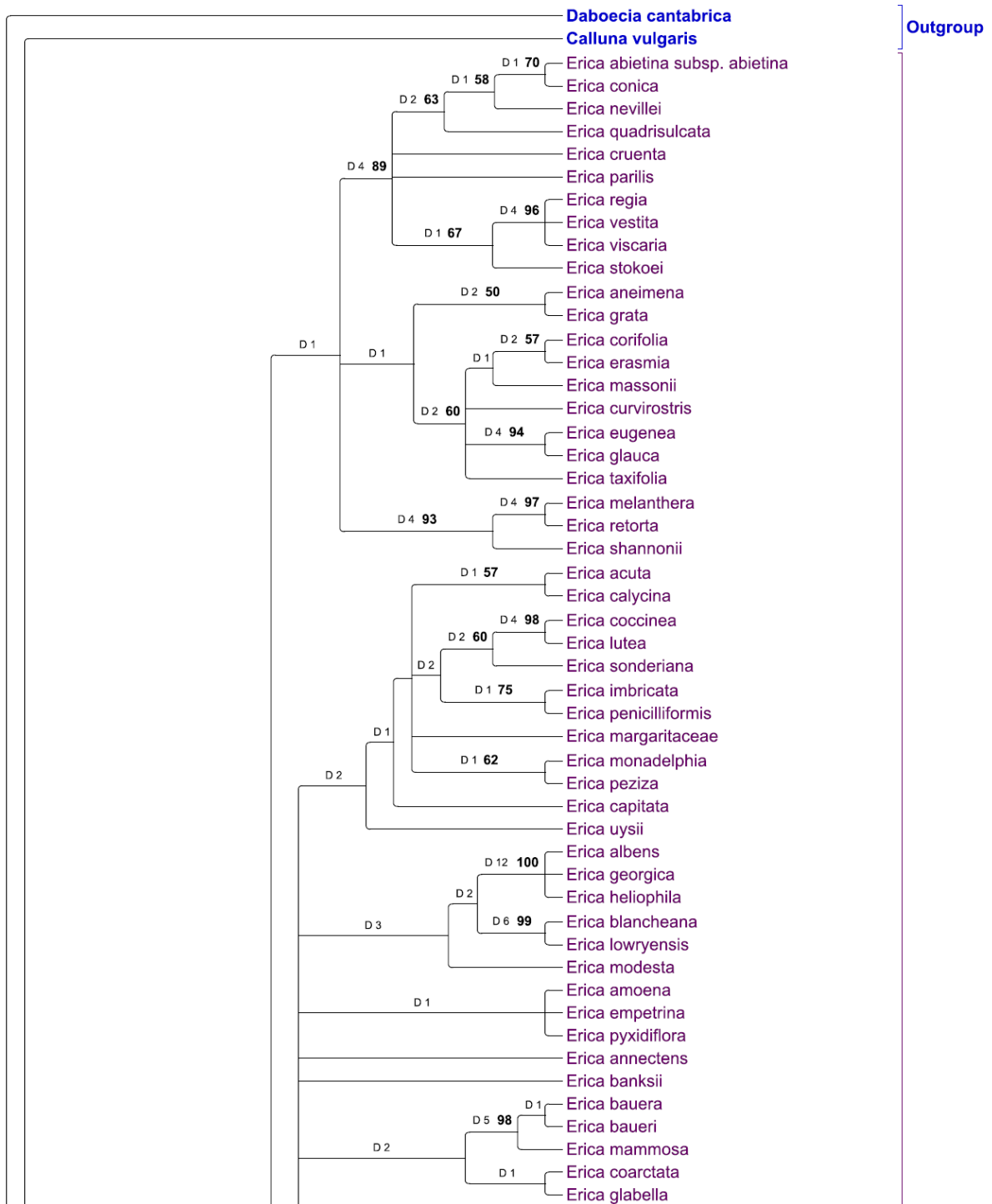


Abbildung 6. Streng-Konsensus-Baum aus 86 Bäumen der ITS-Region. Länge=1278, CI=0,479, RI=0,846

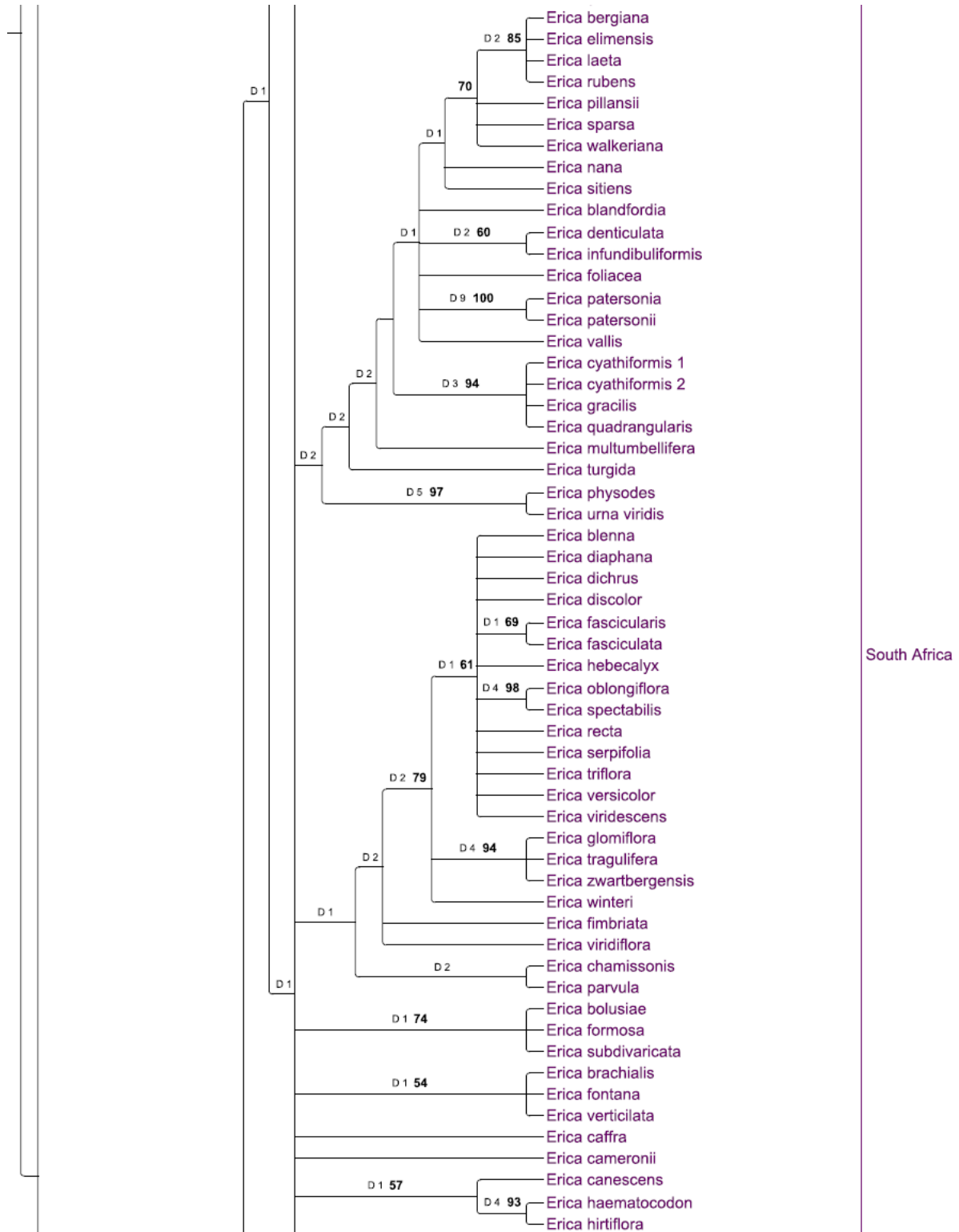


Abbildung 7. Streng-Konsensus-Baum aus 86 Bäumen der ITS-Region. Länge=1278, CI=0,479, RI=0,846

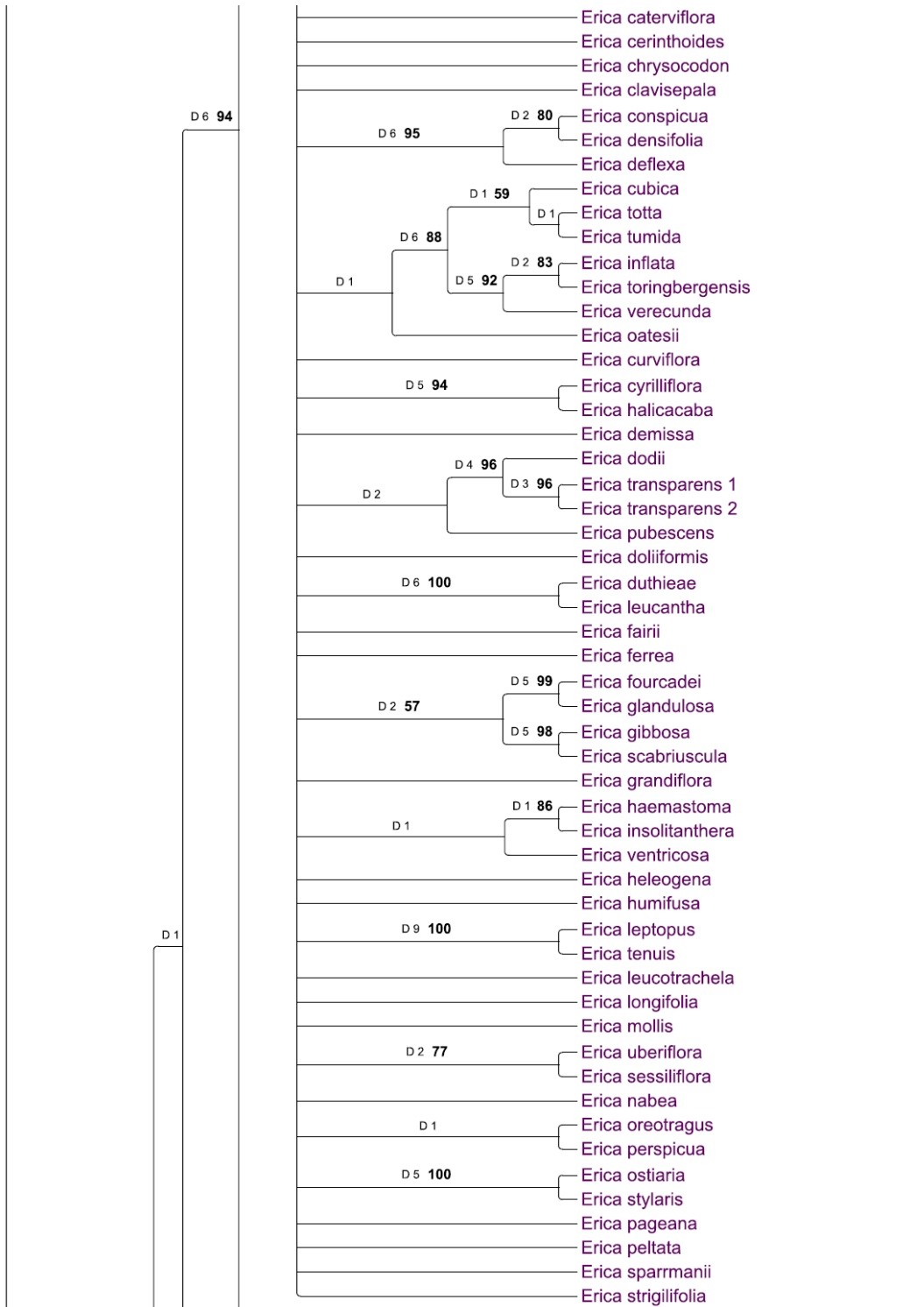


Abbildung 8. Streng-Konsensus-Baum aus 86 Bäumen der ITS-Region. Länge=1278,
CI=0,479, RI=0,846

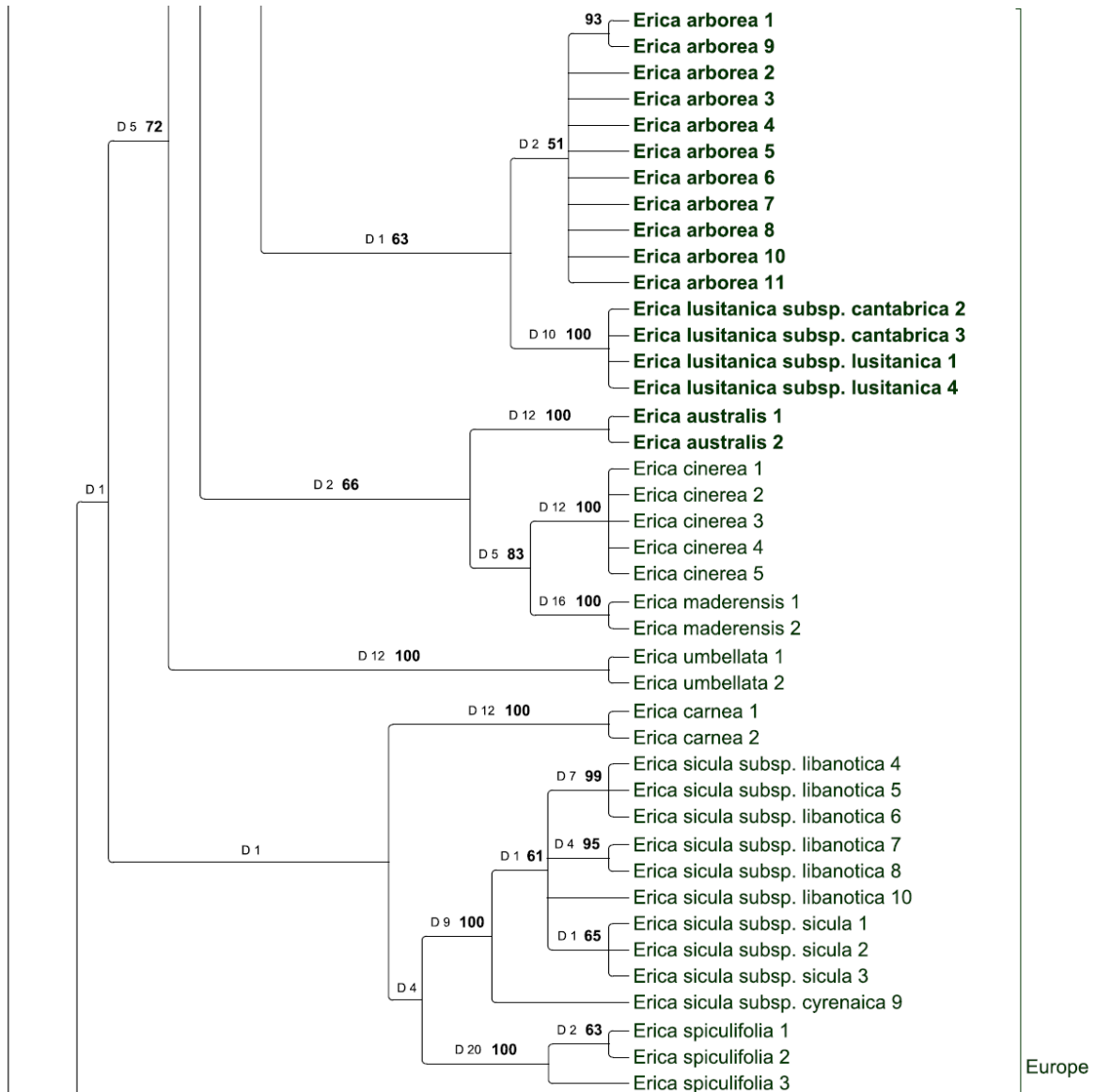


Abbildung 9. Streng-Konsensus-Baum aus 86 Bäumen der ITS-Region. Länge=1278, CI=0,479, RI=0,846

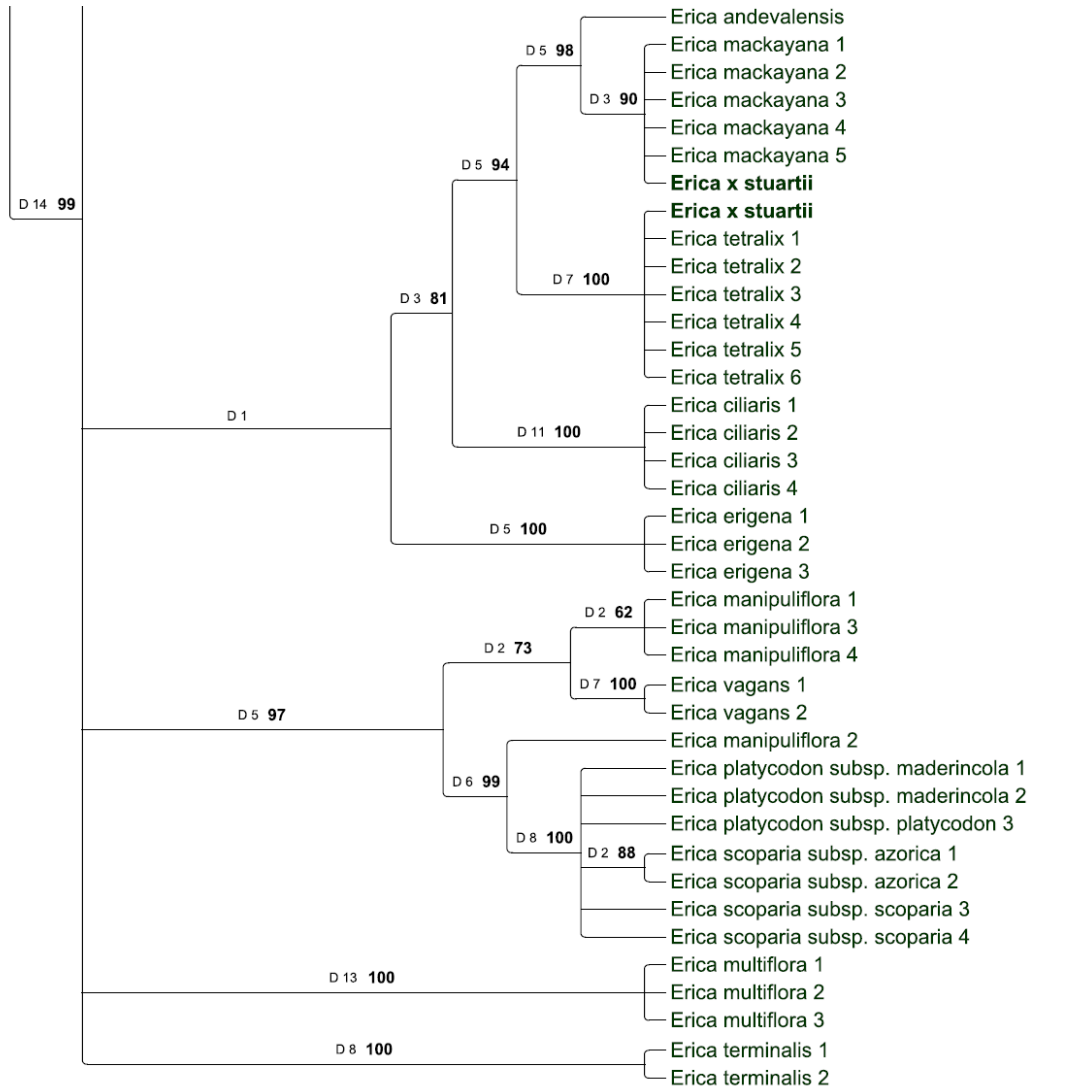


Abbildung 10. Streng-Konsensus-Baum aus 86 Bäumen der ITS-Region. Länge=1278, CI=0,479, RI=0,846

3.4 Elterliche Vererbung der Zellorganellen

Die Analyse des künstlichen Hybrides *E. × oldenburgensis* und dessen Eltern (*Erica arborea* als Mutterpflanze und *Erica carnea* als Vaterpflanze) ergab eine deutliche maternale Vererbung für beide Organellen. Sowohl Chloroplasten- als auch Mitochondrien-Sequenzen waren identisch mit denen der Mutterpflanze *Erica arborea*, und zeigten deutliche Unterschiede zu den Sequenzen der Vaterpflanze *Erica carnea*.

3.5 Bestimmung der Genomgröße

Die Untersuchungen zur Durchflusszytometrie an 18 verschiedenen Pflanzen der Gattung *Erica* wurden auf Grund des Umfangs des Probenmaterials vorab in zwei Gruppen geteilt (Abbildung 3 A und B). *Erica laeta* wurde als Referenz der Messungen benutzt und zweimal gemessen. Die relativen Fluoreszenz Einheiten (RFU) stellen die Bestimmung der gesamten Genomgröße dar. Die Höhepunkte in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus bei *Erica cinerea* weist, mit ca. 30 RFU, auf eine geringere DNA-Menge auf. *Erica bauera* zeigt mit ca. 180 RFU die größte DNA-Menge. Mit Ausnahme von *Erica bauera*, die einen höheren Ploidiegrad aufweist, ist der Ploidiegrad der Proben annähernd gleich.

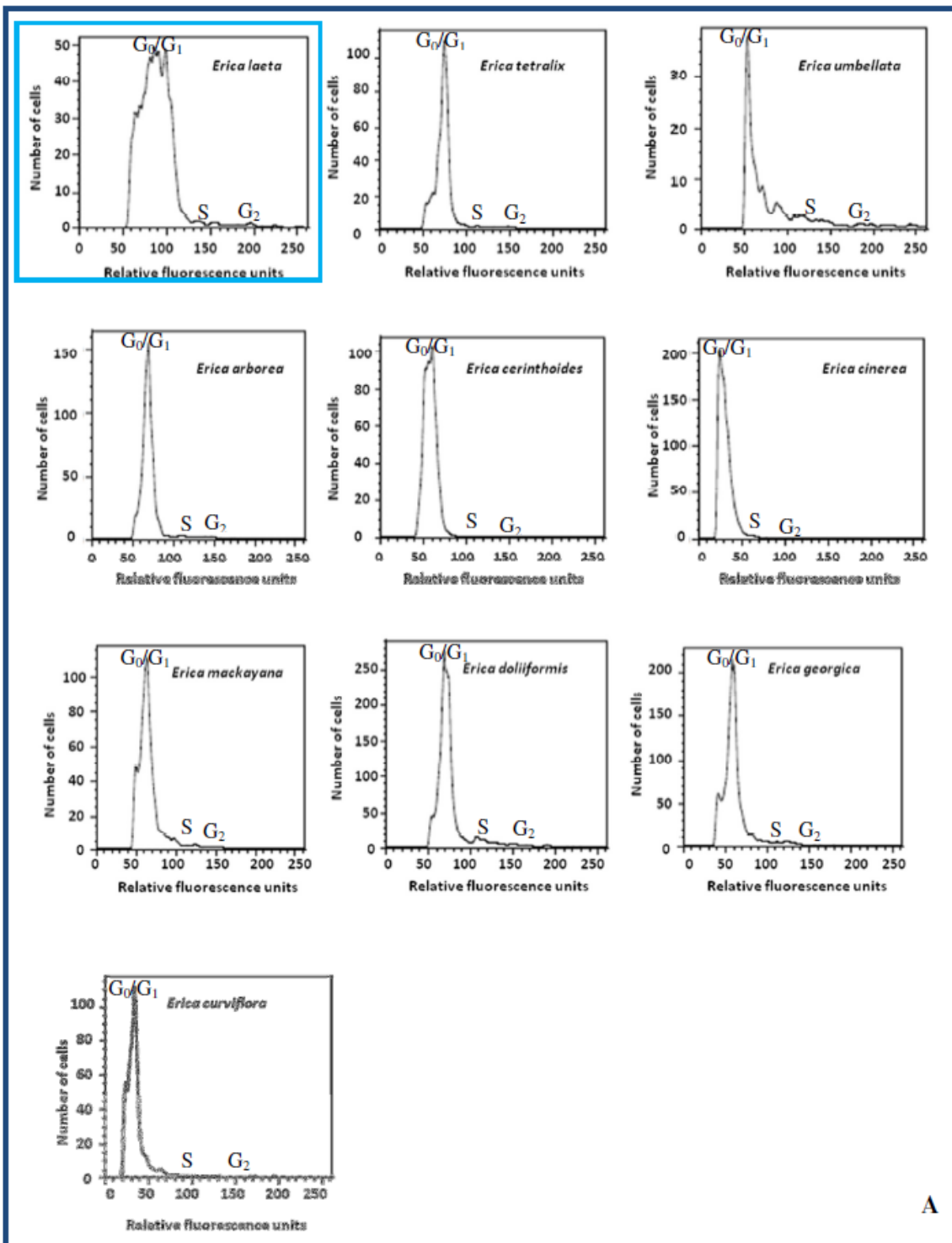


Abbildung 3A. Histogramme der Durchflusszytometrie-Messung der Genomanalyse aus 10 *Erica*-Pflanzen (A). Der Zellkern wurde mit DPI gefärbt. Die Höhepunkte zeigen die relative Quantifizierung des gesamten Genoms in relative Fluoreszenz Einheiten (RFU) im Laufe des Zellzyklus G₀/G₁, S und G₂.

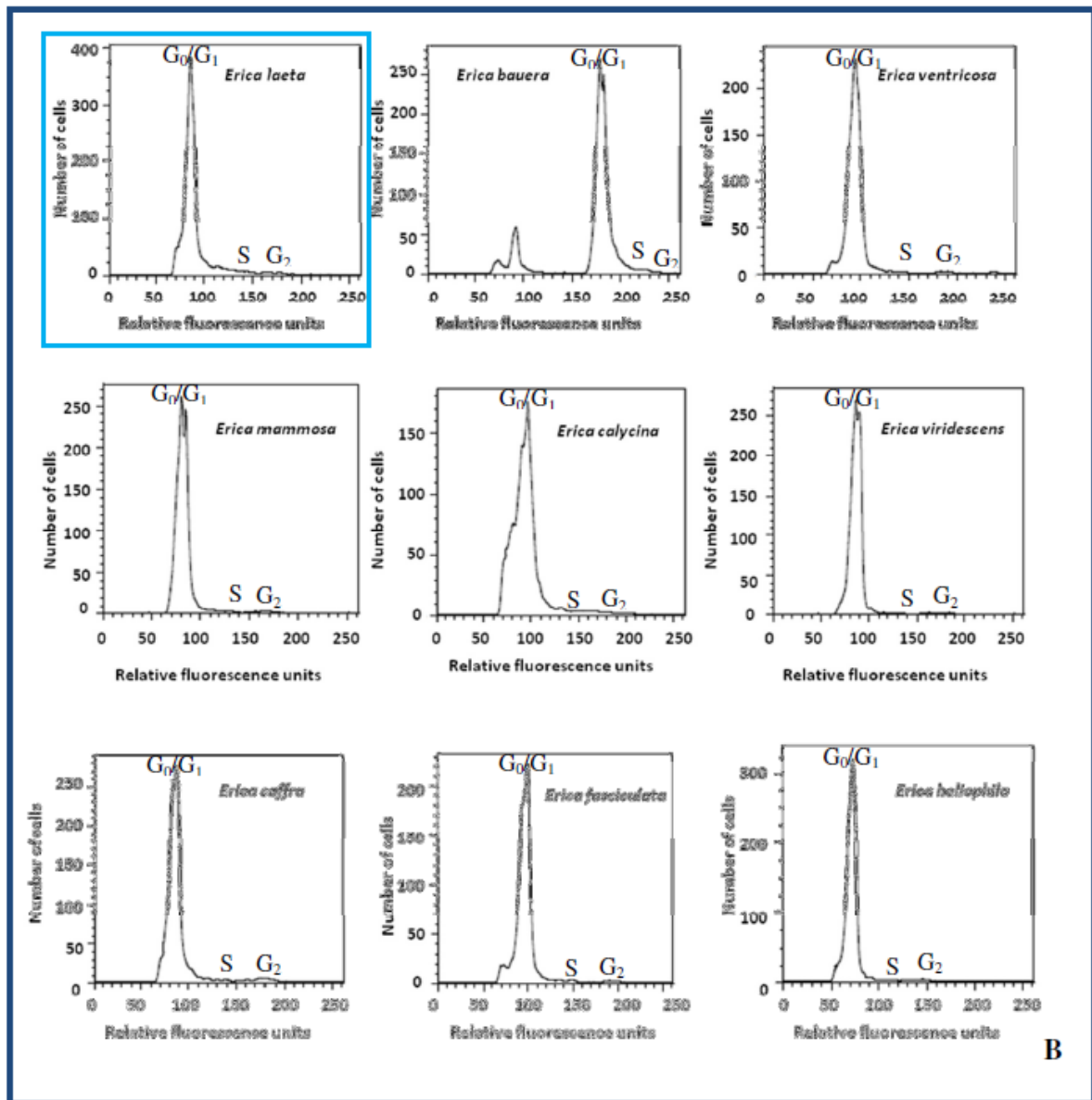


Abbildung 3 B. Histogramme der Durchflusszytometrie-Messung der Genom-analyse aus 9 *Erica*-Pflanzen (B). Der Zellkern wurde mit DPI gefärbt. Die Höhepunkte zeigen die relative Quantifizierung des gesamten Genoms in relative Fluoreszenz Einheiten (RFU) im Laufe des Zellzyklus G_0/G_1 , S und G_2 .

3.6 Stereomikroskopische Strukturen der Blüten und Pollenkörner

Vor der Entnahme der Pollenkörner wurden die Pflanzenproben unter dem Stereomikroskop beobachtet. Strukturen der hermaphroditen Blüten von *E. ventricosa* THUNBERG 1785 und *E. bauera* ANDREWS 1812 können in Abbildung 4 und 5 gesehen werden.

Die Proben wurden in Eppendorf-Gefäßen bei 5°C gelagert. Alle 4-5 Wochen wurden die Proben auf ihre Keimfähigkeit untersucht. Die lebensfähigen Zellen im Tetradenverband sind anfärbbar (Abbildung 6 und 7).

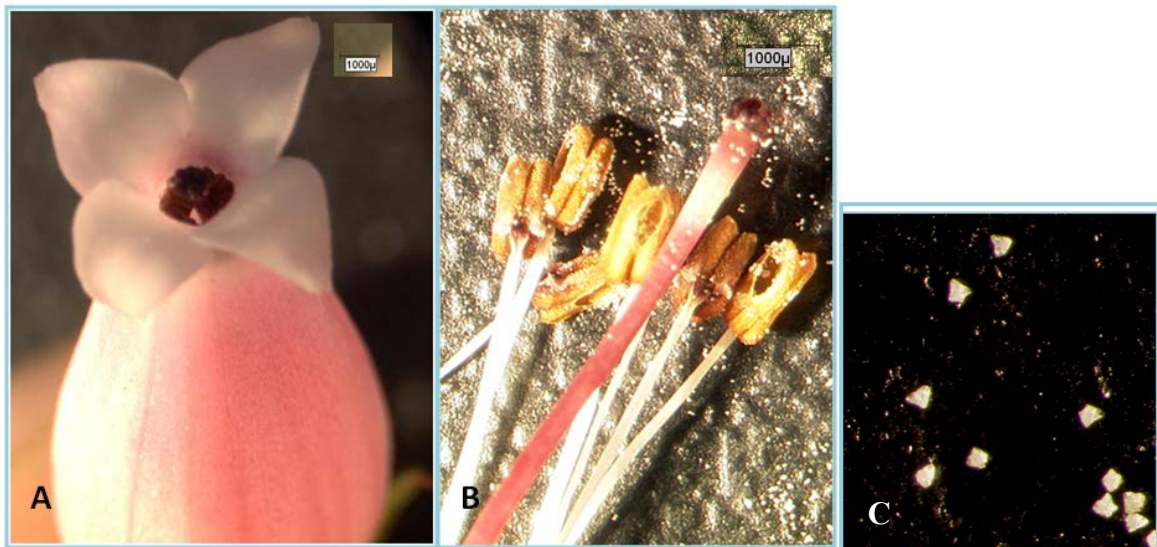


Abbildung 4. *Erica ventricosa* **A**: Die Korolla ist tubular mit bläulich rosa gefärbten Blütenblättern; **B**: Narbe und Staubblätter mit Antheren; **C**: Pollenkörner.



Abbildung 5. *Erica bauera* **A**: Die Korolla ist tubular mit bläss rosa gefärbten Blütenblättern;
B/C: Narbe und Staubblätter mit Antheren; **D**: Pollenkörner.

3.7 Fluoreszenzmikroskop

Pollenproben wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und deren Vitalität bewertet. Abbildungen 6 und 7 zeigen lebende und tote Polleneinheiten von *Erica ventricosa* und *Erica bauera* in verschiedenen Lagerungsperioden. Lebende Zellen werden, nach der Reaktion mit Fluorescein Diacetat (FDA) im UV-Licht hell grün gefärbt.

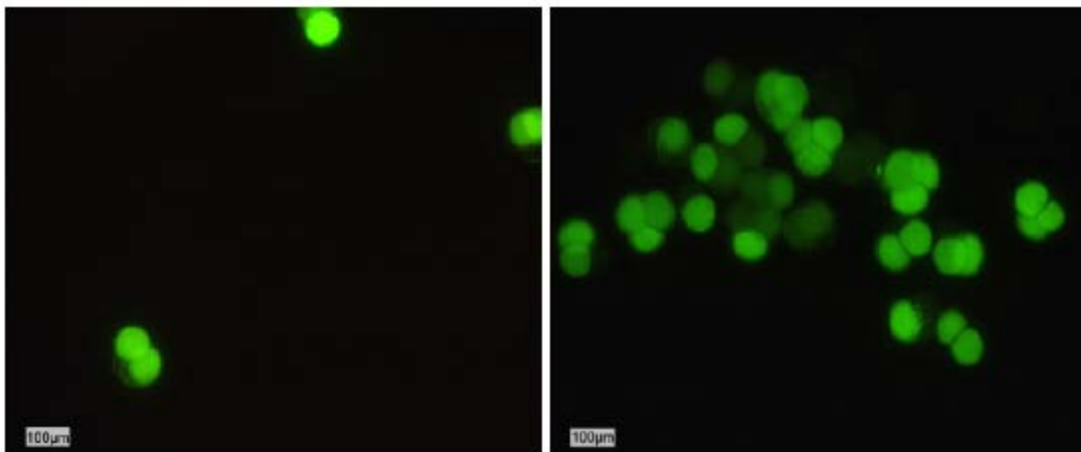


Abbildung 6. Polleneinheiten von *Erica ventricosa* bei Tag=0 unter dem Fluoreszenzmikroskop. Lebende Zellen sind hellgrün gefärbt.

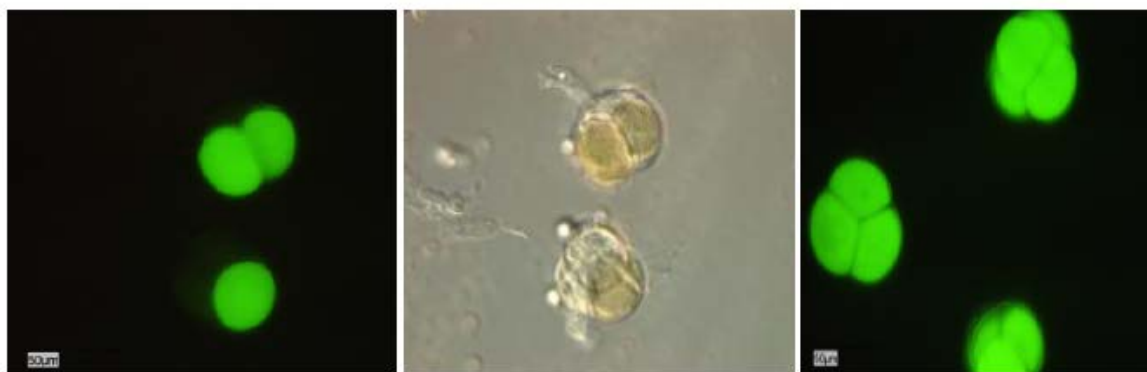


Abbildung 7. Polleneinheiten von *Erica bauera* bei Tag=0 unter dem Fluoreszenzmikroskop. Lebende Zellen sind hellgrün gefärbt.

3.8 Pollenvitalität

Der Anteil der Pollenzellen innerhalb des Tetradenverbands für *Erica ventricosa* und *Erica bauera* während der Inkubationszeit mit der FDA-Lösung wird in den Abbildungen 8 A und B gezeigt. Der Anteil an Polleneinheiten ohne lebende Zellen wird in den Abbildungen 9 A und B dargestellt. Pollenkörner von beiden Pflanzen-Arten zeigen nach der Lagerperiode mindestens eine lebende Zelle. Dies stellt ca. 20 bis 50% der gesamten beobachteten Polleneinheiten dar. Die Anzahl der nicht lebenden Polleneinheiten nimmt am Ende der Lagerperiode zwischen 50 und 80% zu. Die Polleneinheiten mit vier lebenden Zellen sinken um 15 bis 40%.

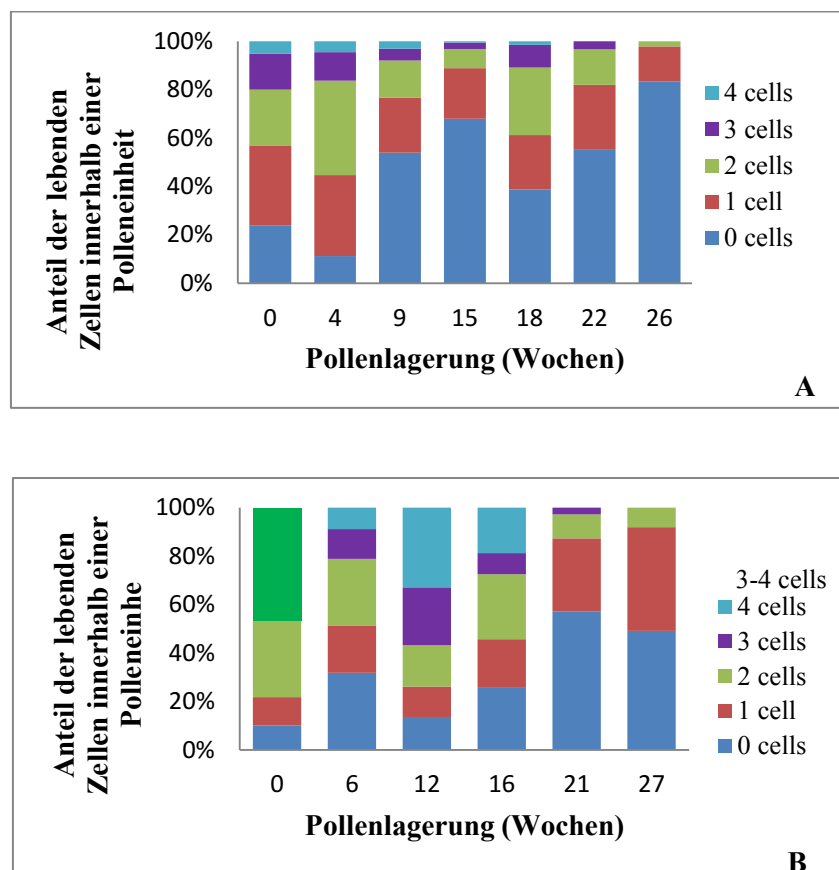


Abbildung 8. Pollenvitalität von Blüten (n=3) von **A** *Erica ventricosa* und **B** *Erica bauera* nach der Lagerungsperiode bei -20°C. Durchschnittliche Anzahl von lebenden Zellen innerhalb einer Polleneinheit.

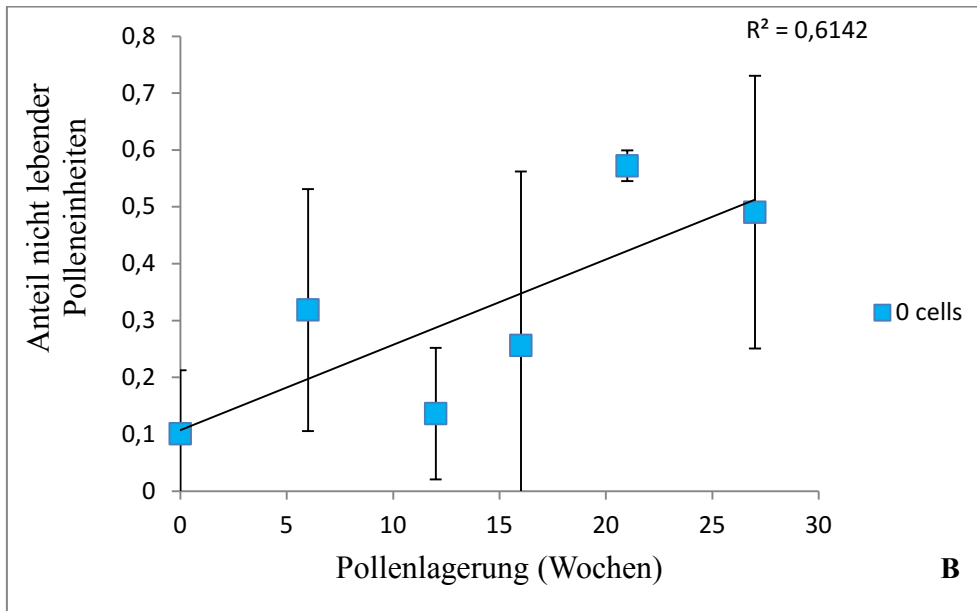
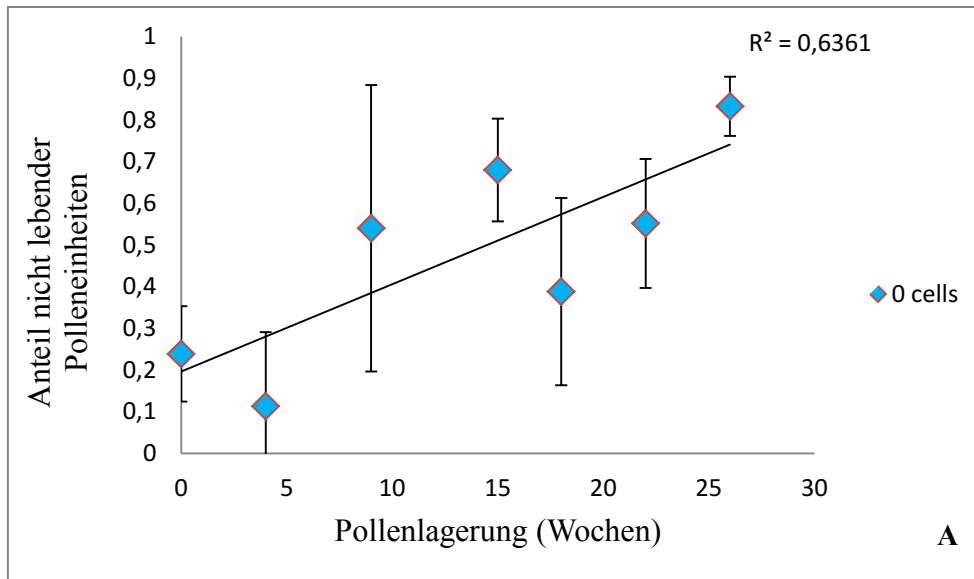


Abbildung 9. Pollenvitalität von Blüten (n=3) von **A** *Erica ventricosa* und **B** *Erica bauera* nach der Lagerungsperiode bei -20°C . Anteil von nicht lebenden Polleneinheiten.

4 Diskussion

4.1 Europäisches und Afrikanisches Heidekraut

McGuire und Kron (2005) präsentierten die erste phylogenetische Analyse von europäischen und südafrikanischen *Erica*-Arten. Dabei wurde deren Ursprung als auch deren Taxa bestätigt (McGuire und Kron 2005). Kürzlich veröffentlichten Pirie et al. (2011) eine vergleichbare Studie mit einer viel höheren Artenvielfalt, in der ca.45% der gesamten *Erica*-Arten aus Europa, Südafrika, Zentralafrika, Madagaskar und den Maskarenen enthalten sind. Diese Studie bestätigt die Monophylie des afrikanischen Stamms inklusive *Erica arborea* mit einer basalen Polytomie. Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit dem europäischen Ursprung dieser Gattung und mit der Monophylie des südafrikanischen Stamms. Unsere Arbeit betrachtete im Chloroplasten-Baum auch drei zentralafrikanische Arten. *E. trimera* ergibt sich zusammen mit *E. umbellata* als Schwester des südafrikanischen Stamms, aber *E. rossii* und *E. kingaensis* sind mit dem *scoparia-vagans*-Stamm innerhalb der europäischen Arten fusioniert. Dies suggeriert, dass Migrationen in beide Richtungen in verschiedenen Zeiten aufgetreten sein können, wie sie z.B. für *E. arborea* beschrieben wurden (Désamoré et al. 2011). Allerdings unterstützten unsere Ergebnisse die Hypothese einer einzigen Migrationsbewegung in die Kapstadt-Region.

Die südafrikanischen Arten *Erica canaliculata*, *Erica subulata*, *Erica ducalis*, *Erica lateralis* und *Erica stricta* erscheinen in der Topologie des Zellkernbaumes zusammen mit den europäischen Arten. Dies könnte allerdings auch auf nicht auszuschließende Fehler in der Bezeichnung der betreffenden Individuen beruhen. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.2 Intraspezifische Variabilität

Die Monophylie der studierten Arten wird von den resultierten Bäumen, mit Ausnahme von *E. arborea* und *E. manipuliiflora*, deutlich unterstützt. Populationen von *E. arborea* sind paraphyletisch und sie sind durch Polytomie mit anderen Taxa verbunden. Désamoré et al. (2011) erklärte das Auftreten von unterschiedlichen Haplotypen innerhalb der *E. arborea* durch verschiedene Migrationsepisoden und die Existenz von Schutzräumen, vor allem in der iberischen Halbinsel, während der letzten Eiszeit. In ihrer Arbeit wird die größte genetische Variabilität, das heißt die größte Anzahl an Haplotypen, auf der iberischen Halbinsel und in Ost-Afrika gefunden. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Gebieten sowohl ein Ursprung als auch ein Reservoir existiert. Dem hingegen ist *E. manipuliiflora* als eine Schwesterpopulation zu *E. scoparia* anzusehen. Grundsätzlich zeigt *E. manipuliiflora* eine große morphologische Variabilität (McClintock 1989, Fagúndez und Izco 2010) und ausführliche Studien dieses Taxon sind noch notwendig.

4.3 Phylogenetische Beziehungen zwischen den nördlichen *Erica*-Arten

Mehrere basale Zweige des Chloroplast-Baumes bekommen nur einen niedrigen Bootstrap-Wert. *E. lusitanica* stellt sich als Schwester der anderen Arten auf, welche in zwei Zweigen unterteilt sind. Ein Zweig ist zusammen mit *E. umbellata* und der Ostafrikanischen Art *E. trimera* verbunden. Diese ist gleichzeitig Schwester von mehreren Stämmen, wie *E. australis*, den Populationen von *E. arborea* und dem Stamm mit allen südafrikanischen Arten. Der andere Zweig umfasst den Kern der „nördlichen“ Arten und die anderen zwei ostafrikanischen Arten. *E. cinerea* ist zusammen mit ihren engen Verwandten *E. maderensis* und *E. sicula* basal positioniert, wobei diese Eingruppierung allerdings nur mit niedrigen unterstützenden Bootstrapwerten unterstützt wird. *E. spiculifolia* ist die Schwester der restlichen Arten. Diese Art hat mehrere Eigenschaften, wie die Abwesenheit der Vorblätter, sowie eine typische Chromosomenanzahl (Fagúndez und Izco 2008). Eine basale

Positionierung der ganzen Gattung wurde bei der phylogenetischen Analyse von nuklearen und chloroplastidären Markern (McGuire und Kron 2005) für *E. spiculifolia* herausgefunden.

Die Stellung von *E. terminalis* ist noch ungelöst. Sie ist laut Bayer (1993) mit *E. tetralix* verwandt. In ihrer Samenmorphologie ähnelt sie jedoch *E. cinerea* und *E. maderensis* (Fagúndez und Izco 2009). *E. terminalis* besitzt, zusammen mit *E. spiculifolia*, Pollenkörner, die Monaden bilden (Oldfield 1959, Nelson 2009).

Zwei Hauptzweige werden im nördlichen *Erica*-Stamm mit Bootstrap-Werten unterstützt. Der Erste ist die Gruppe der atlantischen Eriken. Diese sind alle glandulären Arten, die in feuchten Gebieten der gemäßigten Klimazonen, die jeweils in Meeresnähe liegen, vorkommen. Der Stamm beinhaltet *E. tetralix*, *E. ciliaris*, *E. mackayana* und *E. andevalensis*. Die letzte Art ist nahe verwandt zu *E. mackayana* und sie wurde früher als eine Subspezies dieser betrachtet (McClintock 1989). Die zweite Gruppe beinhaltet Arten vom Mittelmeer, von der atlantischen Küste sowie *E. carnea* aus Höhenlagen bis zu 3000 m in den Alpen. Sie teilen mehrere Eigenschaften miteinander, wie die Abwesenheit von Antheren-Adnexe, unbehaarte Stiele und eine sehr helle rosafarbene Korolla. *E. carnea* und *E. erigena* sind zwei sehr ähnliche Arten mit einer basalen Antheren-Einlage, die deshalb bei Bentham als eine eigene Untergattung betrachtet wurden (Bentham 1839, Hansen 1950, Bayer 1993, Fagúndez und Izco 2003). Diese sind Schwestern einer zweiten Gruppe, die *E. multiflora*, *E. manipuliflora*, *E. vagans* und *E. scoparia*, und *E. platycodon* beinhalten. Diese Gruppe ist mit zwei Ostafrikanischen Arten, *E. rossii* und *E. kingaensis*, fusioniert. *E. scoparia* und ihre nahe Verwandte aus Makaronesien unterscheiden sich auf Grund ihrer anemophilen Bestäubungsart: kleine Blüten und grünfarbige Korolla u.a.. Diese Merkmale sind eng korreliert mit der Bestäubungsart und sind unabhängig voneinander, in der evolutiven Entwicklungsphase, als eine Adaption an das Ökosystem, entstanden (Friedman und Barret 2009). Diese großen Unterschiede können durchaus in einer kurzen Zeit entstehen, wobei viele Gene involviert sein können.

Das Chloroplasten-Genom wurde schon seit längerer Zeit für die Phylogenie der Pflanzen analysiert (Chat et al. 2004, Shaw et al. 2007). Dies ist der Fall, weil Chloroplasten ihre

Hauptstruktur gut konservieren können und weil die untersuchten Regionen eine hohe Substitutionsrate der Nukleotide besetzen (Perry und Wolfe 2002). Das nukleare Genom wurde meistens zur Bestätigung der analysierten phylogenetischen Information aus dem Chloroplast verwendet, um Fehler durch Hybridisierung zu vermeiden (Doyle 1992). Die Ergebnisse aus den nuklearen ITS-Markern sind für manche Arten auf Grund von Polymorphismen in den Sequenzen nur sehr schwach unterstützt. Deswegen wurden diese Proben nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Viele Stämme weisen die gleiche Einordnung wie im Chloroplasten-Baum auf, wie zum Beispiel bei der *E. tetralix-ciliaris*-Gruppe oder bei der *E. scoparia-vagans*-Gruppe mit Ausnahme von *E. multiflora*, die aus ihrer Stellung nicht getrennt werden konnte. *E. arborea* kam noch einmal mit den südafrikanischen Arten zusammen, aber hier ist *E. lusitanica* ihre nächste Verwandte.

In diesen Arten sind morphologische Merkmale wie eine weiße Korolla vorhanden. Die Arten unterscheiden sich jedoch in anderen Merkmalen, wie die Morphologie der Samen, stark (Fagúndez und Izco 2010). Zwei andere Gruppen bilden eine Polytomie mit der arborea-Südafrika-Gruppe. Eine ist die *E. umbellata* und die andere ist die *E. australis* mit *E. cinerea* und *E. maderensis*. Beide Arten, *E. umbellata* und *E. australis*, stammen endemisch vom Westen der iberischen Halbinsel und Nord-Marokko. Diese geografische Region ist als Refugium für mehrere Arten (Postigo Mijarra et al. 2008) bekannt. So wahrscheinlich auch für *E. arborea*, bei der die meisten Haplotypen gefunden wurden (Désamoré et al. 2011). *E. australis* und *E. umbellata* sind zusammen mit *E. arborea* die engsten Verwandten der südafrikanischen Arten in beiden Bäumen, wie auch bei McGuire und Kron (2005) und Pirie et al. (2011) beschrieben worden ist.

4.4 Kombinierte Analyse

Obwohl viele Autoren auch bei schwachen Werten des IDL-Tests die Information aus Chloroplasten und Nukleus fusionieren (Gillespie und Kron 2010), waren in dieser Studie beide Bäume inkongruent und die Topologie der Bäume war deutlich unterschiedlich. Dies führte zu der Entscheidung die Bäume getrennt zu behandeln.

4.5 Hybridisierung und Evolution von *Erica*

Die weit überwiegende Mehrheit der Angiospermen besitzt eine maternale Vererbung der Chloroplasten-DNA (Harris und Ingram 1993). In *Erica* oder Ericaceae sind noch keine Studien zur Chloroplastenvererbung durchgeführt worden (Rendell und Ennos 2002). Obwohl es keine Bestätigung in *Rhododendron* bei Kron et al. (1993), oder in *Calluna* (Rendell und Ennos 2002) gab, deuten diese Studien auf einer maternale Vererbung beider Gruppen, der Organellen an. Da eine paternale Vererbung der verwandten Familie Actinidiaceae (Chat et al. 2004) dokumentiert wurde, sollte eine detaillierte Analyse aus einer Kreuzungsnachkommenschaft mit bekannten Eltern, die Vererbung der Organellen aufklären. In unserer Untersuchung ist die Hybride *E. × stuartii* deutlich mit verschiedenen elterlichen Arten gruppiert, wenn beide Sequenzen in den Bäumen analysiert worden sind. Unter der wahrscheinlichen Annahme, dass die Chloroplasten maternal vererbt werden, sind dementsprechend *E. tetralix* die maternale und *E. mackayana* die paternale Pflanzenart.

Die Stellung anderer Arten wie *E. cinerea*, *E. umbellata*, *E. lusitanica* und *E. australis* ist deutlich unterschiedlich, wenn DNA aus den Chloroplasten oder aus dem Nukleus betrachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein Homoploid-Hybrid-Ursprung dieser Arten. Zum Beispiel teilt *E. lusitanica* mehrere phänotypische Eigenschaften mit *E. arborea*. Beide Arten wurden ursprünglich in der Abteilung *Arsace* zusammengefügt (Hansen 1950, Bayer 1993). Allerdings sind manche Eigenschaften, wie die Samenmorphologie komplett unterschiedlich zwischen den Arten (Fagúndez und Izco 2010). *E. lusitanica* wird mit

E. arborea in dem ITS-Baum in der südafrikanischen Gruppe zusammengestellt. Aber in dem Chloroplasten-Baum ist ihre Position nicht geklärt und sie ist auch nicht zusammen mit der *E. arborea* -Südafrika-Gruppe. Der Ursprung von *E. lusitanica* könnte als eine homoploide Hybridisierung zwischen zwei Abstammungen interpretiert werden, dabei wäre *E. arborea* ein möglicher Elternteil. Weitere spezifische Studien sind noch notwendig, um eine netzähnliche Evolution als Begründung für die Inkongruenzen innerhalb der Arten aufklären zu können.

Es konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass alle untersuchten südafrikanischen Arten untereinander verwandtschaftlich relativ ähnlich sind und dass die Verbindung zwischen den europäischen und südafrikanischen Arten mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Art *Erica arborea* erfolgte. Hieraus dürften mögliche Kreuzungen zwischen europäischen und südafrikanischen Arten wohl am erfolgreichsten verlaufen, wenn die europäische Art *Erica arborea* direkt oder als Brücke in die Kreuzungsplanung einbezogen wird, wobei es durchaus überlegenswert ist, diejenigen *Erica arborea* -Akzessionen zu verwenden, die an die Zielumgebung angepasst sind. Auf Seiten der Südafrikanischen Arten dürfte das Zielmerkmal den Ausschlag für die Kreuzungspartner geben, da sich aus der Verwandtschaftsanalyse keine genaueren Hinweise auf mögliche Empfehlungen hinsichtlich Brückenarten ableiten lassen. Mit höheren Schwierigkeiten aber dennoch interessant dürften aufgrund der Untersuchungen der Kerngene auch folgende europäische Kreuzungspartner sein: *Erica lusitanica*, *Erica australis*, *Erica cinerea* und *Erica maderensis*.

4.5.1 Genom-Analysen

Die relative Messung des Gesamtgenoms im Zellkern aus ausgewählten *Erica*-Pflanzen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. *Erica*-Arten sind diploid mit $2n=24$, außer *E. spiculifolia* mit $2n=36$ (Maude 1940; Nelson und Oliver 2005). Alle untersuchten Proben zeigten eine ähnliche Genomgröße mit der Ausnahme von *E. bauera*. Diese hat

vermutlich einen höheren Ploidiegrad, das heißt, dass diese Pflanzen-Probe eine Vervielfachung der Chromosomenanzahl aufweist.

Nach den Ergebnissen der DNA-Messung, repräsentiert sowohl der Ploidiegrad als auch die Genomgröße der untersuchten Proben keine Barriere für die Kreuzung zwischen Arten und die Entwicklung neue *Erica*-Sorten.

4.5.2 Prüfung der Pollenlagerungsfähigkeit

Die Vitalität der Pollenkörner nach der Lagerung wurde via Fluoreszenzmikroskopie mit einer FDA-Lösung getestet. Dies ergab ein positives Ergebnis von ca. zwei lebendigen Zellen innerhalb der Pollentetrade nach der Lagerungsperiode. Somit eignet sich die Methode für die Pollenlagerung, um Pollenkörner von *Erica*-Arten, die zu verschiedenen Jahreszeiten blühen, bereitzustellen, damit eine interspezifische Kreuzung zwischen diese Pflanzen ermöglicht wird.

4.5.3 Weiteres Vorgehen im Projekt

Es besteht weiterhin regelmäßige Kommunikation mit den Pflanzenzüchtern und Pflanzenproduzenten der Sondergruppe Azerca im Zentralverband Gartenbau e.V. Nach Beendigung der Versuche wurden die Daten erfasst und ausgewertet. Alle Ergebnisse wurden wissenschaftlich präsentiert.

5 Literaturverzeichnis

Abreu, M., Tavares, M., und Batista, M. (2008). Potential use of *Erica andevalensis* and *Erica australis* in phytoremediation of sulphide mine environments: Sao Domingos, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration* 96: 210-222.

Bayer, E. (1993). *Erica* L. In C. S. al. (Ed.), *Flora Iberica, Plantavasculares de la Peninsula Iberica e Islas Baleares (Vol. IV)*. Madrid: Botanico, Real Jardin C.S.I.C.

Bentham, G. (1839). Ericaceae. In *Prodromussystematis* (pp. 580-733). Paris: DE CANDOLLE A. P.

Chat, J., Jauregui, B., Petit, R., und Nadot, S. (2004). Reticulate evolution in kiwifruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) identified by comparing their maternal and paternal phylogenies. *American Journal of Botany* 5: 736-747.

Désamoré, A., Laenen, B., Devos, N., und Popp, M. (2011). Out of Africa: north-westwards Pleistocene expansions of the heather *Erica arborea*. *Journal of Biogeography* 38: 164-176.

Doyle, J. (1992). Gene trees and species trees: Molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botany* 17: 144-163.

Drummond A. J., A. B.-H. (2010). Geneious v 5.0. Available from <http://www.geneious.com>.

Duminil, J., Pemonge, M.-H. und Petit, R.J. (2002). A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 2: 428-430.

Fagúndez, J., und Izco, J. (2003). Seed morphology of *Erica* L. sect. *Callicodon* Bentham. Taxonomic implications. *Plant Biosystems* 137: 111-116.

Fagúndez, J., und Izco, J. (2008). Seed morphology of two distinct European species of *Erica* L. (Ericaceae). *Acta Botanica Malacitana* 33: 1-9.

Fagúndez, J., und Izco, J. (2009). Seed morphology of *Erica* L. sect. *Loxomeria* Salisb. ex Benth., sect. *Eremocallis* Salisb. ex Benth. and sect. *Brachycallis* I. Hansen, and its systematic implications. *Plant Biosystems* 328-336.

Fagúndez, J., und Izco, J. (2010). Seed morphology of the European species of *Erica* L. sect. *Arsace* Salisb. ex Benth. (Ericaceae). *Actabotanicagallica* 157: pp. 45-54.

Fagúndez, J., Juan, R., Fernández, I., Pastor, J., und Izco, J. (2010). Systematic relevance of seed coat anatomy in the European heathers (Ericaceae, Ericaceae). *Plant Systematics and Evolution* 284: 65-76.

Faris, J., Kallersjö, M., Kluge, A., und Bult, C. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Forup, M., Henson, K., Craze, P., und Memmott, J. (2008). The restoration of ecological interactions: plant–pollinator networks on ancient and restored heathlands. *Journal of Applied Ecology* 45: 742-752.

Friedman, J., und Barret, S. (2009). Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Annals of Botany* 103: 1515-1527.

Gillespie, E., und Kron, K. (2010). Molecular phylogenetic relationships and a revised classification of the subfamily Ericoideae (Ericaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 343-354.

Hansen, I. (1950). Die Europäischen Arten der Gattung *Erica* L. Botanische Jahrbücher 75: 1-81.

Harris, S., and Ingram, R. (1993). Chloroplast DNA and Biosystematics: The Effects of Intraspecific Diversity and Plastid Transmission. *Taxon* 393-412.

Kron, K. A., Gawen, L., und Chase, M. (1993). Evidence for Introgression in Azaleas (*Rhododendron*; Ericaceae): Chloroplast DNA and Morphological Variation in a Hybrid Swarm on Stone Mountain, Georgia. *American Journal of Botany* 9: 1095-1099.

Kron, K., Judd, W., Stevens, P., Crayn, D., Andenberg, A., Gadek, P., et al. (2002). Phylogenetic classification of Ericaceae: molecular and morphological evidence. *The Botanical Review* 68: 335-423.

Loidi, J., Biurrun, I., Campos, J., García-Mijangos, I., und Herrera, M. (2007). A survey of heath vegetation of the Iberian Peninsula and the Northern Morocco: a biogeographic and bioclimatic approach. *Phytoecologia* 37: 341-370.

Luis, A., Domingues, F., Gil, C., und Duarte, A. (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartumtridentatum*, *Cytisusscoparius* and *Erica* spp. *Journal of Medicinal Plants Research* 3: 886-893.

Mather, L., und Williams, P. (1990). Phenology, seed ecology, and age structure of spanishheath (*Erica lusitanica*) in Cantenbury. *New Zealand Journal of Botany* 28: 207-215.

Maude, P. F., 1940. Chromosome numbers in some British plants. *New Phytologist*, Volume 39, pp. 17-32.

McGuire, A., und Kron, K. (2005). Phylogenetic relationships of European and African *Ericas*. *International Journal of Plant Sciences* 166: 311-318.

McClintock, D. (1989). The heathers of Europe and adjacent areas. *Botanical Journal of the Linnean Society* 101: 279-289.

Müller, K. (2004). PRAP - computation of Bremer support for large data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 780-782.

Nelson, E. (2009). *Erica scoparia* and *Erica spiculifolia* (formerly *Bruckenthalia spiculifolia*) in interglacial floras in Ireland and Britain: confused nomenclature leading to misidentification of fossilized seeds. *Quaternary Science Reviews* 28: 381-383.

Nelson, E. und Oliver, E., (2005). Chromosome numbers in *Erica* - an updated checklist. *Heathers, Volume 2*, pp. 57-58.

Nixon, K. (1999). The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.

Oldfield, F. (1959). The pollen morphology of some of the West European Ericales. *Pollen et Spores* 1: 19-48.

Oliver, E. (1989). The Ericoideae and the southern African heathers. *Botanical Journal of the Linnean Society* 319-327.

Oliver, E. (1991). The Ericoideae (Ericaceae) - a review. *Contributions from the Bolus Herbarium* 13: 158-208.

Oliver, E. (2000). Systematics of Ericaceae (Ericaceae-Ericoideae): species with indehiscent and partially dehiscent fruits. *Contributions from the Bolus Herbarium* 19: 1-483.

Perry, A., und Wolfe, K. (2002). Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. *Journal of Molecular Evolution* 501-508.

Pirie, M.D., Oliver, E.G.H. und Bellstedt, D.U. (2011). A densely sampled ITS phylogeny of the Cape flagship genus *Erica* L. suggests numerous shifts in floral macro-morphology. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 61: 593-601.

Postigo Mijarra, J., Gómez Manzaneque, F., und Morla, C. (2008). Survival and long-term maintenance of tertiary trees in the Iberian Peninsula during the Pleistocene: first record of *Aesculus* L. (Hippocastanaceae) in Spanien. *Vegetation History and Archaeobotany* 351-364.

Rendell, S., und Ennos, R. (2002). Chloroplast DNA diversity in *Calluna vulgaris* (heather) populations in Europe. *Molecular Ecology* 11: 69-78.

Shaw, J., Lickey, E., Beck, J., Farmer, S., Liu, W., Miller, J., et al. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.

Shaw, J., Lickey, E., Schilling, E., und Small, R. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.

Small, D., and Wulff, E. (2008). *Gardening with Hardy Heathers*. London, United Kingdom: Timber Press.

Sorrie, B. (2005). Alien vascular Plants in Massachusetts. *Rhodora* 107: 284-329.

Stevens, P. (1971). A classification of the Ericaceae: subfamilies and tribes. *Botanical Journal of Linnean Society* 64: 1-53.

Stevens, P., Luteyn, J., Oliver, E., Bell, T., Brown, E., Crowden, R., et al. (2004). Ericaceae. In K. Kubitzki, *The families and genera of flowering plants* (Vol. 6: 145-194). Berlin, Heidelberg: Springer.

Stöver, B., und Müller, K. (2010). TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 7: 11.

Sun, Y., Skinner, D., Liang, G., and Hulbert, S. (1994). Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.

Swofford, D. (2002). PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4.0b10. Sinauer Associates Inc.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., und Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.

Webb, N. (1998). The traditional management of European heathlands. *Journal of Applied Ecology* 35: 987-990.

6 Liste über Veröffentlichungen

Phylogenetics of Mediterranean and European *Erica* L. (Ericaceae) species from sequences of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA regions. Plant systematic and evolution (under review).

7 Liste über Vorträge

03.02.2010 Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau Bad Zwischenahn.

27.05.2010 Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf.

02.02.2011 Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau Bad Zwischenahn.

03.07.2011 Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau, Erfurt.

13.02.2012 Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf.

8 Kurzfassung

Erica L. ist mit mehr als 840 Arten eine der umfangreichsten Gattungen der Ericaceae. *Erica* ist eine immergrüne Pflanze, die sich von Europa bis nach Südafrika ausbreitet hat. Bisherige Studien zeigen, dass die nördlichen *Erica*-Arten, d.h. die in Europa und im Mittelmeerraum vorkommenden Arten, eine paraphyletische Gruppe bilden, währenddessen die südlichen Arten als eine monophyletische robuste Gruppe dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde eine molekular phylogenetische Analyse der europäischen und zentral- und südafrikanischen *Erica*-Arten durchgeführt. Dabei wurden sowohl chloroplastische als auch nukleare DNA-Marker eingesetzt. Die entsprechenden untersuchten Regionen sind *trnL-trnL-trnF* und *5'trnK-matK*, und ITS. Die Analyse beabsichtigte i) die Feststellung der Monophylie der nördlichen und südlichen *Erica*-Arten, ii) die Bestimmung der phylogenetischen Beziehungen zwischen den Arten und Vergleich gegenüber ehemaligen Studien und iii) die Gegenüberstellung der nuklearen Information, um neue mögliche evolutive Muster zu untersuchen. Alle Arten waren monophyletisch mit der Ausnahme von *E. arborea* und *E. manipuliflora*. Die Paraphylie der nördlichen Arten wurde bestätigt. Allerdings waren drei Taxa aus Zentralafrika polyphyletisch. Dies lässt vermuten, dass verschiedene Besiedlungsperioden stattgefunden haben könnten. Der Vererbungspfad der Chloroplasten-Marker sowie der Mitochondrien-Region *cox3* aus einem kontrollierten Hybrid wurden getestet. Dabei wurde zum ersten Mal die maternale Vererbung der Organellen bei *Erica* beschrieben. Dies ermöglicht die Hypothese, dass Inkongruenzen der Chloroplasten und ITS-Bäume das Resultat einer netzähnlichen Evolution innerhalb der Gattung sein könnten. Die relative Genomgröße wurde via Durchflusszytometrie mit DAPI für selektierte Proben kalkuliert. Alle untersuchten Proben zeigten eine ähnliche Genomgröße mit der Ausnahme von *E. bauera*. Diese hat vermutlich einen höheren Ploidiegrad. Die Vitalität der Pollenkörner nach der Lagerung wurde via Fluoreszenzmikroskopie mit einer FDA-Lösung getestet. Dies ergab ein positives Ergebnis von ca. zwei lebendigen Zellen innerhalb der Pollentetrade nach der Lagerung.

9 Abstract

With over 840 species *Erica* L. is one of the largest genera of the Ericaceae, comprising woody perennial plants that occur from Scandinavia to South Africa. According to previous studies, the northern species, present in Europe and the Mediterranean, form a paraphyletic, basal clade, and the southern species, present in South Africa, form a robust monophyletic group. In this work a molecular phylogenetic analysis from European and from Central and South African *Erica* species was performed using the chloroplast regions: *trnL-trnL-trnF* and *5'trnK-matK*, as well as the nuclear DNA marker ITS, in order i) to state the monophyly of the northern and southern species, ii) to determine the phylogenetic relationships between the species and contrasting them with previous systematic research studies and iii) to compare the results provided from nuclear data and explore possible evolutionary patterns. All species were monophyletic except for the widely spread *E. arborea*, and *E. manipuliflora*. The paraphyly of the northern species was also confirmed, but three taxa from Central East Africa were polyphyletic, suggesting different episodes of colonization of this area. The inheritance path of chloroplast markers and the mitochondria region *cox3* from the analysis of a controlled hybrid and its parents was tested. The maternal inheritance of organelles is described for the first time in *Erica*, enabling the hypothesis that incongruences between chloroplast and ITS marker trees may be the result of a reticulate evolution within the genus. An approximation of nuclear DNA amount by the quantification of the relative genome amount via flow cytometry with DAPI was assayed for selected samples, all revealing to have a similar genome size, with the exception of *E. bauera* that seemed to present a higher ploidy level. The vitality test of pollen grains after storage from two *Erica* species was carried out using a FDA solution and applying UV-light fluorescence microscopy techniques with a positive yield of up to two living cells within the pollen tetrad after finalizing the storage period.