

## BOTANIK

### Anatomische und molekulargenetische Untersuchungen an Schachtelhalmen (*Equisetum*)

Von THOMAS BRUNE, Stuttgart  
mit 5 Abbildungen

#### ZUSAMMENFASSUNG

Das weltweite Vorkommen der Schachtelhalme (Equisetopsida) wird durch nur 15 rezente Arten in der einzigen Gattung *Equisetum* repräsentiert. Die sichere Ansprache der einzelnen Taxa ist allerdings wegen hoher Variabilität sowie dem Auftreten von Kreuzungen erschwert: Insgesamt sind bisher 18 Hybrid-Kombinationen bekannt. Als Differenzierungsmöglichkeiten werden mit der vorliegenden Arbeit Charakteristika des Spross-Querschnitts überprüft und die Anwendbarkeit von ‚ISSR-PCR‘-Mustern als zusätzlicher Merkmalskomplex evaluiert. Es werden die mitteleuropäischen Arten sowie schwerpunktmäßig verschiedene Populationen von vier in Südwestdeutschland vorkommenden Kreuzungen angesprochen.

Die Spross-Querschnitts-Merkmale, z.B. die Ausbildung des Festigungsgewebes, des Assimilationsparenchyms, der Interzellulargänge und der Zentralthöhle, variierten in Abhängigkeit der Sprosshöhe, insbesondere in der Untergattung *Hippochaete*. Als intermediär in einigen Charakteristika erwiesen sich die Kreuzungen *E. × litorale* und *E. × trachyodon*. Uneinheitlich dagegen neigten die Sprosse von *E. × moorei* (= *E. hyemale* × *E. ramosissimum*) mehr *E. ramosissimum* zu oder waren von *E. hyemale* kaum zu unterscheiden. *E. ramosissimum* zeigte extreme Variabilität. *E. × meridionale* ähnelte stark der Elternart *E. variegatum*. Insgesamt erwies sich der Spross-Querschnitt zur Differenzierung der Taxa aus der Untergattung *Hippochaete* als von untergeordneter Bedeutung, jedoch als sehr hilfreich im Falle des Subgenus *Equisetum*.

Die erzeugten ISSR-Bandenmuster waren in jedem Fall hoch charakteristisch für die jeweilige Art. Aus der Position hybridogener Taxa in der Cluster-Analyse lässt sich der Kreuzungscharakter bestätigen und die Elternarten können benannt werden. Das Verwenden unterschiedlicher ISSR-Primer entspricht dabei im Prinzip verschiedenen Blickrichtungen auf das Genom und führt damit jeweils zur Wiedergabe anderer Charakteristika der verschiedenen Kreuzungen. So war beispielsweise *E. × litorale* (= *E. arvense* × *E. fluviatile*) je nach verwendetem Primer entweder mehr der einen Elternart – *E. arvense* – oder mehr der anderen – *E. fluviatile* – zugeordnet. Die genetischen Ähnlichkeiten – basierend auf Ähnlichkeiten der Bandenmuster – deuten zudem daraufhin, dass manche Arten offenbar vegetative Reproduktion bevorzugen (z.B. *E. arvense*), während bei anderen Spezies sexuelle Reproduktion häufiger vorzukommen scheint (z.B. *E. sylvaticum*).

**Schlagworte:** Equisetaceae; Hybriden; Anatomie; Spross-Querschnitte; DNA-Fingerprinting; ISSR-PCR

#### ABSTRACT

Only 15 species in the single genus *Equisetum* represent the global recent occurrence of horsetails (Equisetopsida). However, identification is complicated by high variability and especially by the occurrence of interspecific hybrids: 18 hybrid combinations are reported so far. For differentiation of *Equisetum* taxa, with the present work characteristics of the stem cross section are tested and the applicability of 'ISSR-PCR' patterns as an additional molecular character complex is evaluated. All Central European *Equisetum* species and different populations of the four most frequent hybrids in Southwestern Germany are considered.

Especially for subgenus *Hippochaete*, it is shown that characters of the stem cross section like the formation of strengthening tissues, the chlorenchyma, intercellular cavities and the central cavity, have varied in dependence of the stem height. In several characters the hybrids *E. × litorale* and *E. × trachyodon* showed intermediacy, whereas the anatomy of *E. × moorei* (= *E. hyemale* × *E. ramosissimum*) in one case looked more like *E. ramosissimum* and in the other case was nearly not distinguishable from *E. hyemale*. *E. ramosissimum* showed extreme variation. The hybrid *E. × meridionale* showed high resemblance to the parental species *E. variegatum*. Stem cross sections seem to be only of delimited value in case of subgenus *Hippochaete*, but very useful for the differentiation of subgenus *Equisetum* taxa.

The revealed ISSR banding patterns are highly typical for each species. From the position of clusters of the hybrid taxa, their hybrid origin is provable and identification of the parental species is possible. Application of different ISSR primers corresponds with different genomic „perspectives“, each reflecting other characteristics of the taxon. In dependence on the applied primer, for example *E. × litorale* (= *E. arvense* × *E. fluviatile*) was assigned more to either *E. arvense* or *E. fluviatile*. Genetic similarities of populations, expressed by the pattern similarities, suggest that some species prefer vegetative reproduction (e.g. *E. arvense*), whereas for others (e.g. *E. sylvaticum*) sexual reproduction seems to be more frequent.

**Keywords:** Equisetaceae; hybrids; anatomy; stem cross sections; DNA fingerprinting; ISSR-PCR

#### EINLEITUNG

Die Schachtelhalme (Equisetopsida) repräsentieren unter den Farnen („Monilophyten“, PRYER et al. 2004) eine Linie, die bis ins späte Devon zurückreicht und heute nur noch mit 15 Spezies vertreten ist. Innerhalb der einzigen Gattung *Equisetum* lassen sich zwei Gruppen abgrenzen: das Subgenus *Equisetum* (8 Arten) und das Subgenus *Hippochaete* (7 Arten). Klar gestützt wird diese Unterscheidung sowohl durch morphologische Charakteristika (z. B. HAUKE

1963, 1978) als auch durch molekulare Merkmale (Chloroplasten-Gene, DES MARAIS et al. 2003, GUILLON 2004).

Von früheren Autoren wurden oft deutlich höhere Artenzahlen angegeben (z.B. SCHAFFNER 1925). Neben der hohen morphologischen Plastizität vieler Equiseten ist dies vor allem auf Kreuzungen zwischen den Arten zurückzuführen, die nicht als solche erkannten wurden.

Während der hybridogene Ursprung zunächst nur für wenige Taxa vermutet wurde (z.B. *E. litorale*, LUERSEN 1889), mehrten sich später die Berichte über Kreuzungen (z.B. ROTHMALER 1944). Bisher sind 18 Kreuzungen zwischen den 15 Arten beschrieben (DUCKETT 1979b, PAGE 1997). Hybriden sind nur innerhalb der jeweiligen Untergattung bekannt, was die Isolation dieser beiden Gruppen untermauert (s. Abb. 1).

Eine exemplarische Revision von Subgenus *Hippochaete*-Belegen aus den Herbarien Stuttgart und Karlsruhe ergab hohe Anteile von nicht erkannten Kreuzungen innerhalb dieser Sammlungen (BRUNE 2004). Tatsächlich ist die Identifizierung von Hybriden oftmals nicht einfach und sollte auf möglichst vielen Merkmalen basieren.

Die Beschreibung der Equisetaceae erfolgte zunächst anhand von Charakteristika aus Morphologie, Anatomie und teilweise auch Mikromorphologie. Diese Merkmalsbereiche haben bis heute nicht an Bedeutung verloren (MILDE 1867, HAUKE 1963 / 1978, DUCKETT 1973 / 1979a, DOSTÁL 1984, PAGE 1997, DINES u. BONNER 2002). Der Nachweis des hybridogenen Ursprungs, der für einige Taxa aufgrund von abortierten Sporen und intermediärer Morphologie angenommen wurde, konnte jedoch erst mit der Anwendung cytologischer Methoden erbracht werden (MANTON 1950, BIR 1960, OBERMAYER et al. 2002, BENNERT et al. 2005). Durch aufwendige Kreuzungsversuche gelang es zudem DUCKETT (1979b) eine Reihe interspezifischer Hybriden erfolgreich zu synthetisieren. Ein interessantes Ergebnis dieser Versuche ist darüber hinaus die offensichtliche Unidirektionalität von Kreuzungsmöglichkeiten in der Untergattung *Equisetum*, d. h. als beispielsweise weibliche Elternspezies kann für jede Kombination jeweils nur eine bestimmte Art fungieren. Die Arten der Untergattung *Hippochaete* lassen hingegen bidirektionale Kreuzungen zu.

Zusätzliche phänotypische Merkmalsbereiche ließen sich mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (DAYANANDAN und KAUFMANN 1973, PAGE 1972), der Phytochemie (SALEH et al. 1972, VEIT et al. 1995a/b, BRUNE 2001) und der Isozym-Analyse (SOLTIS 1986; SOLTIS et al. 1988, KORPELAINEN 1996) erschließen. Die Isozym-Analyse ermöglicht es, Aussagen zur genetischen Diversität, der Homo- / Heterozygotie und zum Ploidiegrad von Organismen zu treffen. Durch die verhältnismäßig geringe Markerzahl, die die Isozymtechnik bietet, kann jedoch nur ein kleiner Teil des Genoms abgedeckt werden. Ein weiterer Nachteil besteht im phänotypischen Charakter der verwendeten Marker, der möglichen Beeinflussung durch Umweltfaktoren bzw. Verfälschung der Untersuchungsergebnisse durch differentielle Gen-Expression (z.B. MURPHY et al. 1996). Schon seit längerem werden deshalb molekulare Markersysteme angewendet, bei denen

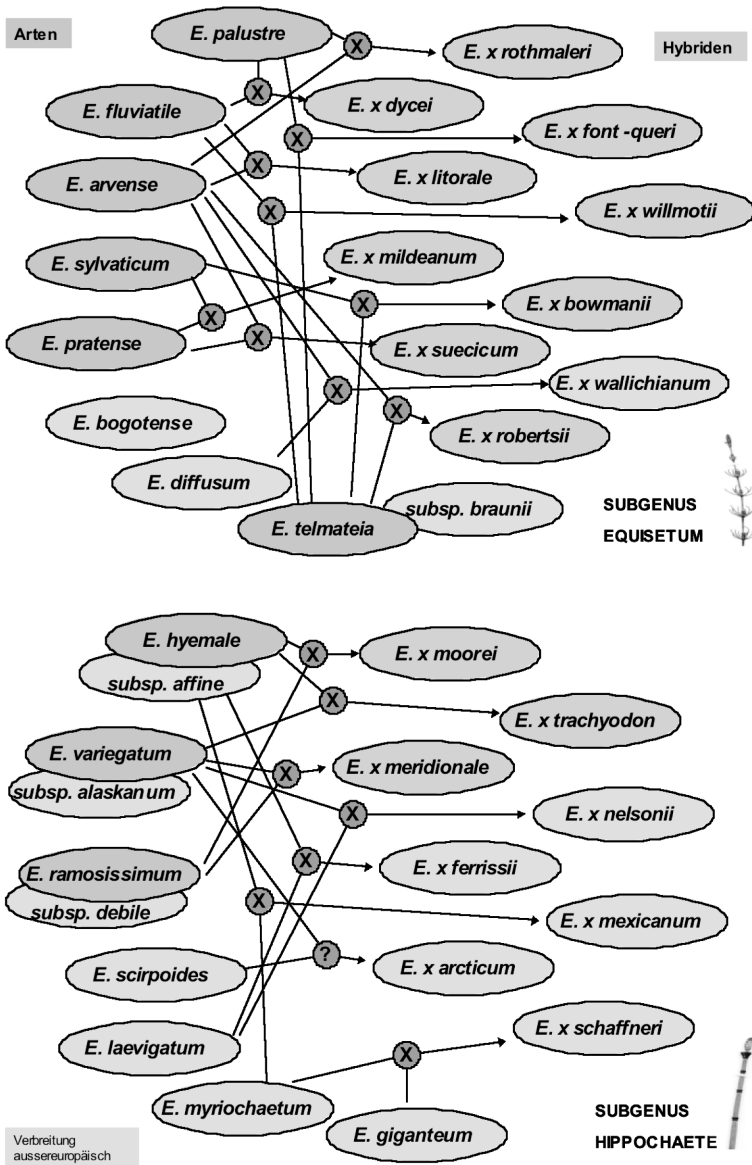


Abb.1. Die Arten und bisher beschriebenen Kreuzungen in den Untergattungen *Equisetum* und *Hippochaete*.

genetische Diversität bzw. Polymorphismen unmittelbarer widerspiegelt werden.

Für Farne und Moose sind dazu in jüngerer Zeit vor allem Populations-Untersuchungen mit DNA-Fingerprinting-Methoden wie der „RAPD“-Technik

(WILLIAMS et al. 1990) veröffentlicht worden (z.B. SCHNELLER et al. 1998, THOMSON 2000, FREITAS and BREHM 2001). Eine weitere Möglichkeit genetische Polymorphismen zu erfassen, stellt die mit Mikrosatelliten-Sequenzen arbeitende „ISSR-PCR“ dar (Inter-simple sequence repeats, ZIETKIEWICZ et al. 1994), welche eine im Vergleich zur RAPD-Methode bessere Reproduzierbarkeit der Bandenmuster aufweist. Bewährt hat sich die ISSR-Methode in der Populationsgenetik (z. B. XIAO et al. 2005), zur Klärung taxonomischer Fragestellungen (z. B. VANDERPOORTEN et al. 2003, TREUTLEIN et al. 2005) als auch zur Untersuchung von Kreuzungen (WOLFE et al. 1998, LAU et al. 2005).

Neben einer Arbeit über *Botrychium*-Populationen (Ophioglossaceae, CAMACHO and LISTON 2001) wurden aber offenbar bisher keine weiteren Farnpflanzen mittels ISSR-PCR analysiert. Durch Isozym-Analyse und PCR-RFLP-Fingerprinting mit Chloroplastenmarkern untersuchten MACHON et al. (2001) Populationen einer *Equisetum*-Art (*E. variegatum*). Die Equisetaceae sind jedoch noch nicht eingehender mit einer DNA-Fingerprinting-Methode charakterisiert.

Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit ist die Prüfung von Anwendbarkeit und Nutzen der ISSR-Fingerprinting-Muster als zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit von Schachtelhalm-Spezies und -Hybriden. Die Ermittlung der genetischen Diversität zwischen und innerhalb von *Equisetum*-Populationen stellt einen weiteren Aspekt dar.

Morphologie und Anatomie sind von grundlegender Bedeutung für die Charakterisierung der Taxa der Equisetaceae. In Bestimmungsschlüsseln werden häufig Spross-Querschnitts-Merkmale als Unterscheidungsmöglichkeit genannt (z. B. GARCKE 1972, ROTHMALER 1990, SEBALD et al. 1990, DOSTÁL 1984, PAGE 1997). Die Angaben weichen allerdings oftmals sehr voneinander ab und sind besonders in Bezug auf die Hybriden lückenhaft. Vor diesem Hintergrund wurden von allen Kreuzungen, welche mit der ISSR-Methode untersucht wurden, sowie von deren mutmaßlichen Elternarten Spross-Querschnitte angefertigt und analysiert.

## MATERIAL UND METHODEN

### Pflanzenmaterial

Sowohl für die anatomischen Untersuchungen (beschränkt auf die Hybriden und Elternarten), als auch für die DNA-Fingerprinting-Analysen (ISSR-PCR) wurde Frischmaterial gesammelt von aus Literatur, Herbarbelegen und mündlichen Angaben bekannten Standorten (s. Anhang 1). Sammelschwerpunkt war Südwestdeutschland. Zusätzlich wurde auch Material aus Bayern (4 Proben), Hamburg (1 Probe), Irland (1 Probe), der Schweiz (1 Probe), den Kanarischen Inseln (Teneriffa, 1 Probe) sowie Südfrankreich (2 Proben) mit einbezogen.

Um Informationen zur genetischen Variabilität der einzelnen Taxa zu erhalten, wurden pro Taxon i.d.R. Individuen von drei bis sechs verschiedenen Populationen untersucht. Von jeweils mindestens einer Population wurden zudem mehrere (2–4) Individuen analysiert.

Mit der ISSR-Methode wurden so insgesamt 65 DNA-Isolate von 65 Individuen

(Sporophyten) untersucht, und zwar von 9 Arten und 4 Hybriden aus 42 verschiedenen Populationen. Es sind damit alle in Mitteleuropa vorkommenden Schachtelhalmmarten – für *E. scirpoides* gibt es gesicherte Nachweise nur aus Nord-europa – sowie die vier häufigsten Hybriden berücksichtigt:

*E. arvense* L., *E. fluviatile* L., *E. telmateia* EHRH., *E. palustre* L., *E. sylvaticum* L., *E. pratense* EHRH., *E. × litorale* KUEHLEW. ex RUPR. (Subgenus *Equisetum*); *E. ramosissimum* DESF. ssp. *ramosissimum*, *E. hyemale* L. ssp. *hyemale*, *E. variegatum* SCHLEICH. ex WEB. et MOHR ssp. *variegatum*, *E. × moorei* NEWM., *E. × trachyodon* (A.BRAUN) W.D.J. KOCH, *E. × meridionale* (MILDE) CHIOV. (Subgenus *Hippochaete*).

Belegexemplare wurden jeweils im Herbarium des Staatlichen Museums für Naturkunde in Stuttgart (STU) hinterlegt.

Die auch für die anatomischen Untersuchungen beprobten Vorkommen der Hybriden im einzelnen mit Quellenangaben (s. Anhang 1): *E. × meridionale*: 1) MTB 7631/3 – Augsburg, im Gleisschotter der Lokalbahn nach Haunstetten (vgl. ESCHELMÜLLER und HIEMEYER 1987), 2) MTB 8317/1 – Bahnhof Feuerthalen (Herbarbeleg leg. P. ALEKSEJEW 1988, sub *E. ramosissimum*); *E. × moorei*: 1) MTB 6517/3 – Mannheim Rheinauhafen (R. BÖCKER und M. SCHMID, mündlich), 2) Botanischer Garten der Universität Hohenheim (System, sub *E. hyemale*); *E. × trachyodon*: MTB 6816/3 – N Leopoldshafen, E-Ufer Kiesgrube (P. THOMAS im Artenschutzprogramm Baden-Württemberg „ASP“ 1995), MTB 8317/4 – Rheinufer SE Altenburg (E. BUCHHOLZ ASP 2002). *E. × litorale*: MTB 7616/3 – Wüstenbach bei Wittichen (S. SEYBOLD, mündlich). Drei dieser Populationen befinden sich an stark gestörten Standorten, *E. × moorei* Mannheim z. B. im Industriegebiet bzw. Hafengelände im Gleisschotter entlang eines Zaunes. Die Population der Hybride und die benachbarten Vorkommen der Elternart *E. ramosissimum* sind hier ausgedehnt und besonders wüchsig. Auch *E. × meridionale* Augsburg ist in Nachbarschaft seiner Elternart *E. ramosissimum* im Gleisbett einer Lokalbahn angesiedelt (sehr ähnlich: Feuerthalen) und hat sich sogar trotz Erneuerung des Gleisschotters wieder voll etabliert.

### Anatomische Untersuchungen

Von 8 morphologisch als Kreuzungen identifizierten *Equisetum*-Populationen sowie 6 Populationen der Elternarten wurden Querschnitte durch Handschnitt der Hauptspross-Internodien (heterophyadische Arten des Subgenus *Equisetum*: sterile Sprosse) in drei verschiedenen Sprosshöhen angefertigt. Es wurde jeweils ein dünner und ein kräftiger Spross ausgewählt. Analyse und fotografische Dokumentation der Querschnitte erfolgte mit einem Wild M5A Stereomikroskop und einer Nikon Coolpix 995 Digitalkamera. Die Durchmesser wurden mit der DatInf „Measure“-Software Version 1.0 ermittelt.

### ISSR-Fingerprinting

Mit einer Reihe von DNA-Fingerprinting-Methoden ist es möglich, die genetische Diversität von Organismen zu untersuchen, ohne dass zuvor Sequenz-

informationen der betreffenden Organismen bekannt sein müssen. Die ISSR-PCR (Inter-simple sequence repeats, Zietkiewicz et al. 1994) wird mit kurzen Mikrosatelliten-Motiven durchgeführt („Primer“: Länge ca. 16 Basen), z. B. (GTG)<sub>5</sub> = GTG.GTG.GTG.GTG.GTG. Mikrosatelliten (Sequenzwiederholungen) sind in jedem eukaryotischen Genom vielfach vorhanden, eine breite Anwendbarkeit der Technik auf verschiedenste Taxa scheint daher gewährleistet. Allerdings muss zuvor die Eignung jedes einzelnen Primers für den zu untersuchenden Organismus getestet werden. Die Bandenmuster entstehen durch die Vervielfältigung (Amplifikation) der unterschiedlich großen Bereiche zwischen jeweils zwei der betreffenden repetitiven Sequenzen. Durch Versehen der Primer mit einigen Basen, welche nicht Bestandteil der Wiederholungs-Sequenz sind (z. B. (GA)<sub>8</sub>YT), werden diese an den Flanken der Mikrosatelliten verankert und können so die Spezifität der Primer erhöhen.

Zur Probenahme wurden frische, junge Stücke von einzelnen Sprossen (Spitzen der Hauptsprosse oder Büschel von Seitenästen) an Freilandstandorten oder kultivierten Pflanzen abgeschnitten und sofort über Kieselgel getrocknet. Nach ca. 48 Stunden wurden die Proben entnommen und bei -20°C bis zur DNA-Isolation gelagert.

2–4 getrocknete Internodien eines einzelnen Hauptsprosses im Falle von nicht verzweigten Arten bzw. einige Seitenäste bei verzweigten Arten, wurden zerkleinert und anschließend in einer Schwingmühle pulverisiert. Mit dem Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex) wurde dann nach Angaben des Herstellers von ca. 20 mg des Pulvers die DNA isoliert. DNA-Konzentration und -Qualität wurde mit einem Eppendorf Biophotometer bestimmt. Die PCR wurde in einem „T<sub>3</sub>“ Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Mit 12 von 14 getesteten ISSR-Primern konnten Amplifikate produziert werden, nur 6 Primer lieferten nach Optimierung der PCR-Bedingungen klare Bandenmuster. Auf Grund ihrer ausgewogenen Bandenmuster bei allen untersuchten Taxa, dem Auftreten von Polymorphismen sowie guter Reproduzierbarkeit der Muster wurden die 4 Primer (GA)<sub>8</sub>YT, (CAC)<sub>4</sub>RC, (GT)<sub>7</sub>YG und (GTG)<sub>5</sub> ausgewählt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Nach der PCR wurden die erhaltenen Produkte über ein zweistufiges Acrylamid-Gel aufgetrennt und in einer 0,01%–„GelStar“-Lösung (Cambrex) gefärbt. Über einem UV-Transilluminator mit Dokumentationseinheit (GelDoc 2000, BioRad) wurde das Bild des Bandenmusters aufgenommen und gespeichert (Software Quantity One, BioRad).

Die Auswertung der in densitometrische Kurven umgewandelten Bandenmuster erfolgte mit der Software Gelcompar II (Applied Maths) jeweils getrennt nach Untergattung und verwendetem Primer. Ähnlichkeiten bzw. Distanzen wurden mit zwei verschiedenen Algorithmen berechnet, dem Cosine-Koeffizienten (RASMUSSEN 1992) und der Pearson-Korrelation (SNEATH u. SOKAL 1973). Die Darstellung der Musterähnlichkeiten erfolgte als hierarchische Cluster in Form eines UPGMA-Dendrogrammes (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) und als sogenanntes Multi-dimensional Scaling (MDS),

welches eine freiere Interpretation ermöglicht als die zweidimensionale Dendrogramm-Darstellung. Aus Platzgründen wurde das detaillierte UPGMA-Dendrogramm, welches auch in den MDS-Darstellungen in Form von Linien eingebildet ist, hier nur exemplarisch für einen Primer dargestellt (s. Anhang 2).

## ERGEBNISSE MIT DISKUSSION

### 1. Anatomie – Spross-Querschnitte der Kreuzungen und Elternarten

Der Spross-Querschnitt der Schachtelhalme ist sehr charakteristisch: Auffällig sind vor allem die zahlreichen Interzellulargänge um eine große zentrale Markhöhle (z. B. Abb. 2a). Die Oberfläche ist gerieft mit Längs-Rippen (Carinae) und -Tälchen (Valleculae). Kollaterale Leitbündel sind in einem konzentrischen Ring angeordnet, z. T. mit äußerer und innerer Endodermis. Durch Auflösung des Protoxylems entsteht ein Kanal, der auf Grund seiner Position unter den Carinae als „Carinalhöhle“ bezeichnet wird. Ein weiterer Interzellulargang liegt jeweils unter den Tälchen („Vallekularhöhle“), er entsteht vermutlich rhexigen aus dem Rindenparenchym. Unterhalb der Epidermis befindet sich nicht lignifiziertes Festigungsgewebe (hypodermales Sterom, Kollenchym; z. B. СРѢСЬК et al. 1998) das häufig vor allem im Bereich der Rippen zahlreiche Zellreihen umfasst und dann meist keilförmig in das darunter liegende Gewebe hineinragt. Das Assimilationsparenchym oder Chlorenchym ist als durchgehendes oder unterbrochenes Band unter dem Festigungsgewebe ausgebildet (vgl. auch OGURA 1972).

#### Subgenus *Equisetum*

Für die Untergattung *Equisetum* stellt HAUKE (1978) sechs charakteristische Merkmalskategorien aus dem Bereich der Anatomie des Spross-Querschnitts auf. Beispielsweise beträgt nach HAUKE (1978) der Durchmesser der Zentralhöhle für *E. arvense*  $1/3$  bis  $2/3$  des gesamten Spross-Durchmessers, für *E. fluviatile* dagegen ca.  $9/10$ . PAGE (1997) gibt jedoch diesbezüglich für *E. arvense*  $2/3$  bis  $3/4$  an und DOSTÁL (1984) beschreibt den Anteil der Zentralhöhle mit ungefähr  $1/4$ . Nicht ganz so unterschiedlich sind die Angaben der verschiedenen Autoren beim Merkmal „Anzahl der Carinae“. Während HAUKE (1978) zwischen 4 und 14 Sprossrippen bei *E. arvense* zählt, gibt PAGE (1997) für dieselbe Art zwischen 6 und 18 Carinae an, fast ebenso wie DOSTÁL (1984): 6–20 Rippen. Neben der insbesondere bei *E. arvense* bemerkenswerten Variabilität, die u.U. von den einzelnen Autoren nur zum Teil erfasst wurde, könnte auch die Messung bei unterschiedlichen Sprosshöhen Ursache für diese Abweichungen sein. Für die vorliegende Untersuchung wurden deshalb pro Spross jeweils drei Querschnitte im unteren, mittleren und oberen Sprossbereich angefertigt (s. Abb 2a/d, 3a-c). Tatsächlich hat sich für Taxa beider Subgenera gezeigt, dass vor allem die Verhältnisse der Durchmesser von Zentralhöhle und gesamtem Spross, in geringerem Maße die Anzahl der Sprossrippen, mit der Sprosshöhe variieren. Dabei setzt sich jeweils vor allem der Querschnitt des unteren Sprossbereichs von dem des mittleren und oberen Sprossbereichs deutlich ab (z. B. Abb 2a).



Weitere Merkmale sind die Ausbildung des Carinal-Kollenchyms, des Festigungsgewebes unter den Spross-Rippen – nach HAUKE (1978) sowohl bei *E. arvense* als auch bei *E. fluviatile* vorhanden – und des Vallekular-Kollenchyms, welches bei *E. fluviatile* im Gegensatz zu *E. arvense* fehlt. Mit letzterem Merkmal eng verbunden ist die Ausprägung des Chlorenchyms: unterbrochen nur im Bereich der Carinae (durch das Carinal-Kollenchym, *E. fluviatile*), unterbrochen nur im Bereich der Valleculae (*E. arvense*). Mit einer Ausnahme besitzen alle Arten des Subgenus *Equisetum* in ihren überirdischen Sprossen eine einfache „äußere“ Endodermis, die den Zentralzylinder mit den Leitbündeln und der Zentralhöhle vom übrigen Sprossbereich abgrenzt, so auch *E. arvense*. Nur *E. fluviatile* verfügt über Einzel-Endodermen, die jedes Leitbündel separat umgeben.

Zum Vergleich mit den Vertretern der *E. × litorale*-Populationen („Wüba1“, „Wüba2“) wurden je zwei Sprosse (schmächtig / kräftig) einer *E. arvense*- („Ktt“, Quellstandort am Waldrand) sowie einer *E. fluviatile*-Population („Hözl“, Seeufer) untersucht (Abb. 2a-d, Tabelle 1): Der ZH-Anteil ist für beide Sprosse von *E. arvense* mit 0,23 bzw. 0,29 der Angabe von DOSTÁL (1984) am nächsten (ca. 1/4). Die Anzahl der Carinae und dementsprechend auch die Anzahl der relativ großen, langgezogenen Vallekularhöhlen liegt im mittleren Bereich (13 und 10). Es sind gut ausgebildete Vallekular-Kollenchyme zu erkennen, die das Chlorenchym trennen, sowie meist breit-keilförmige Carinal-Kollenchyme.

Die *E. fluviatile*-Sprosse zeigen typischerweise eine sehr große Zentralhöhle und im mittleren und oberen Sprossbereich keinerlei Vallekularhöhlen, diejenigen der basalen Region (Vallekularhöhlen-Anzahl ist hier relativ gering: 12 bzw. 13) sind im Querschnitt deutlicher breiter als lang. Das Chlorenchym ist unter den Valleculae als nicht unterbrochener grüner Querbalken ausgebildet (Vallekular-Kollenchym fast durchgängig fehlend), das Carinal-Kollenchym als schmaler Längsbalken. Die Leitbündel besitzen Einzel-Endodermen. Letzteres Merkmal kennzeichnet auch alle hier untersuchten Sprosse von *E. × litorale* (s. Detail Abb. 2b) und grenzt sie eindeutig von *E. arvense* ab.

Auch die verhältnismäßig flachen Carinae und das mehr strich- als keilförmige Carinal-Kollenchym sowie die deutlich größere Zentralhöhle unterscheiden die Kreuzung von dieser Elternart. Das hier untersuchte Material von *E. × litorale* ist ebenso leicht von *E. fluviatile* abgrenzbar durch das vorhandene, meist gut ausgebildete Vallekular-Kollenchym (unterbricht das Chlorenchym), die kleinere Zentralhöhle und die Hervorwölbung der Carinae. Bereits auf den ersten Blick fällt die intermediäre Stellung der Sprosse von *E. × litorale* hinsichtlich der Elternarten *E. arvense* und *E. fluviatile* ins Auge (vgl. Abb. 2a/d). HAUKE (1965) stellte in Bezug auf Blattscheiden-Länge, -Breite und Sprosshöhe fest, dass sich *E. × litorale* an trockenen Standorten *E. arvense* annähert, an feuchteren Standorten jedoch *E. fluviatile*. Auch in der vorliegenden Untersuchung unterscheiden sich die Sprosse der etwas trockener stehenden *E. × litorale*-Population am Fahrweg („Wüba1“) rein habituell deutlich von denen der z.T. im Wasser stehenden Population am Waldrand („Wüba2“): Die ersteren tendieren zu *E. arvense* (Abb. 2c

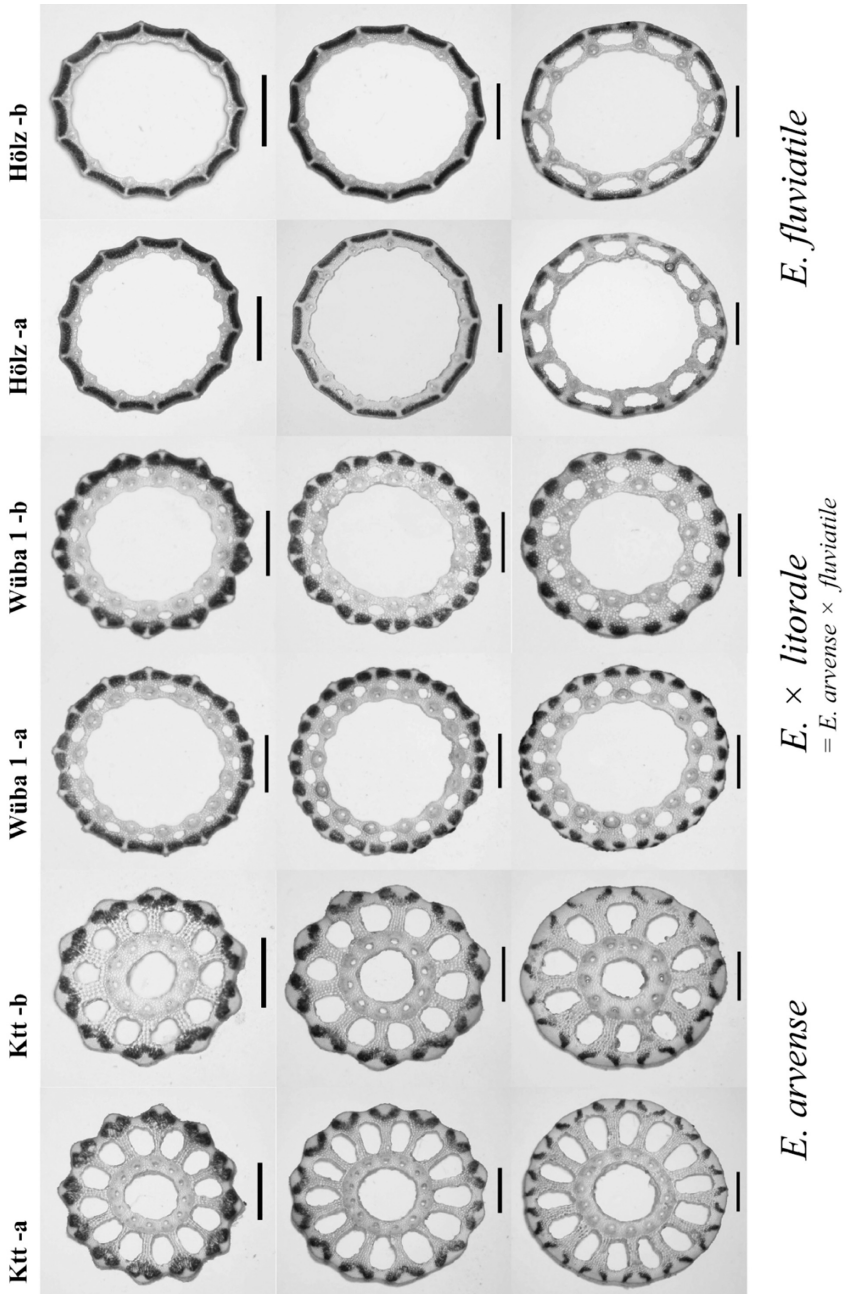
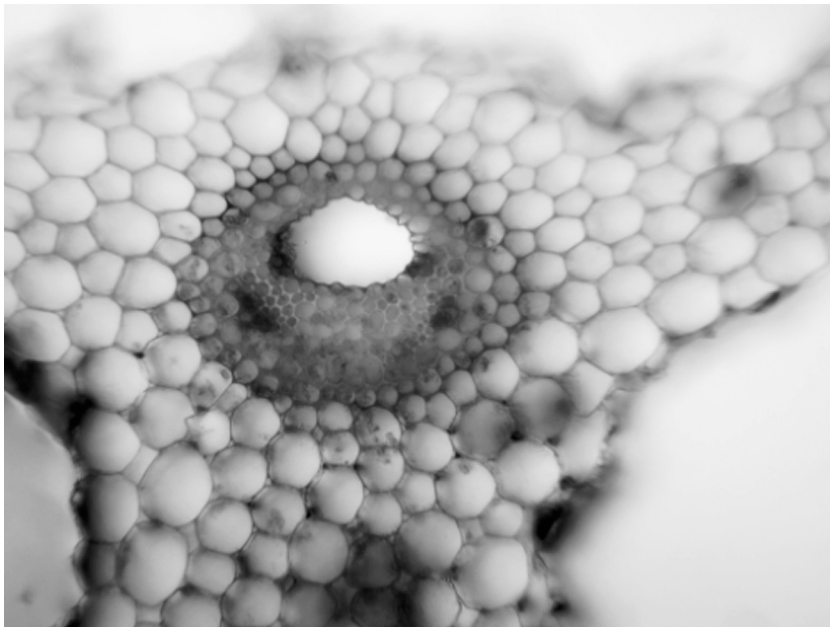


Abb. 2a. Subgenus *Equisetum*. Spross-Querschnitte (Internodien) verschiedener Populationen (,'Ktt' / ,'Wüba' / ,'Hölz', s. Anhang 1) von Hybriden und Elternarten. Reihe unten: Sprossbasis-nahes Internodium, Reihe Mitte: Spross-Mitte, Reihe oben: oberer Sprossbereich. Maßstab 1 mm.

**Tab. 1.** Merkmale des Spross-Querschnitts, Subgenus *Equisetum* (s. Abb. 2a/d).

Taxon	Pop	Spr	VH	ZH / D	CK	VK	Endodermis
EA-a	Ktt	a	13,0	0,29	breit	++	außen
EA-b	Ktt	b	10,0	0,23	breit	++	außen
ExL-a	Wüba1	a	14,0	0,63	mittel	(+)	individuell
ExL-b	Wüba1	b	12,7	0,59	mittel	+	individuell
EF-a	Hölz	a	13,0	0,76	schmal	-	individuell
EF-b	Hölz	b	12,3	0,75	schmal	(-)	individuell
ExL-a	Wüba2	a	18,3	0,71	mittel	+	individuell
ExL-b	Wüba2	b	12,7	0,61	mittel	++	individuell

*Pop*=Population, *Spr*=Spross, *VH*=Vallekularhöhle (Anzahl im Mittel) *ZH*= Zentralhöhle (*D*) *D*=Sprossdurchmesser, *CK*=Carinal-Kollenchym, *VK*=Vallekular-Kollenchym

**Abb. 2b.** *E. × litorale*. Leitbündel mit Einzel-Endodermis.

oben, z. B. Länge, Verteilung und Orientierung der Seitenäste, vgl. BORG 1967), die letzteren mehr zu *E. fluviatile* (Abb. 2c unten).

Im Bereich der Spross-Querschnitte ist diese Abgrenzung nicht so offensichtlich. Zwar zeigt Spross A von ‚Wüba2‘ tatsächlich eine ausgesprochen weite Zen-

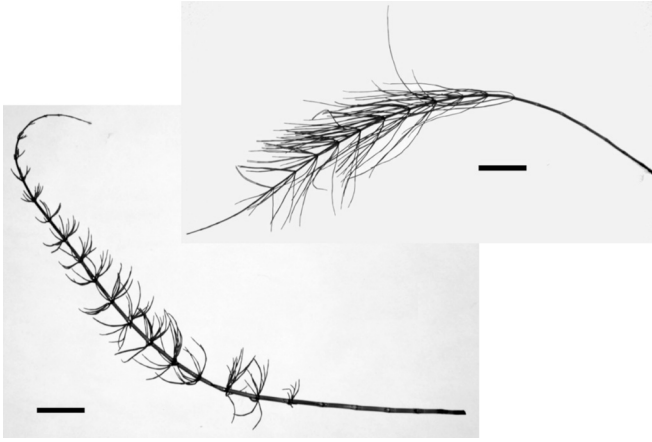


Abb. 2c. *E. x litorale*. Formen verschiedener Standorte: *E. arvensis*-„Morphotyp“ (oben), *E. fluviatile*-„Morphotyp“ (unten). Maßstab 5 cm.

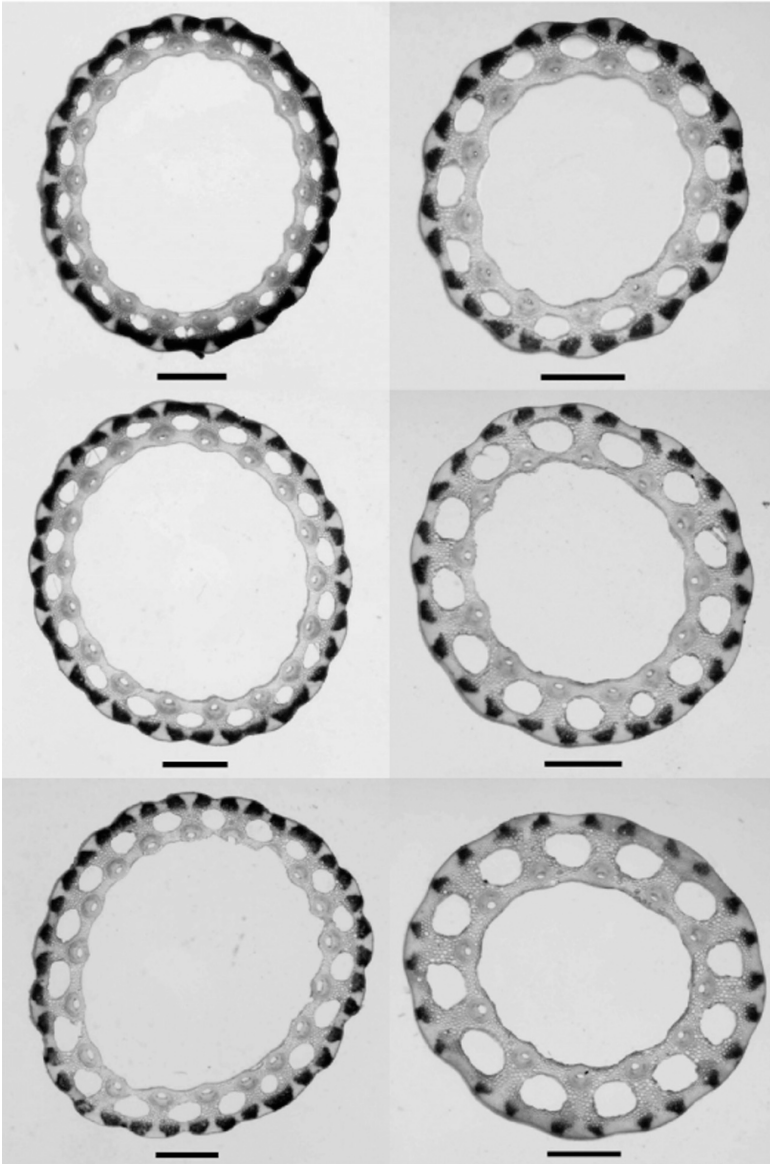
trahlhöhle bei hoher Rippenzahl und nur gering ausgeprägtes Vallekularkollenchym, nähert sich also stärker *E. fluviatile* an; Spross B besitzt dagegen ein besonders breites Carinal-Kollenchym und eine kleinere Zentralhöhle, mehr in Richtung *E. arvensis* weisend. Allerdings sind die Vallekularkollenchymhöhlen von Spross B – wieder mehr zu *E. fluviatile* tendierend – erkennbar breiter als lang (Abb.2d).

### Subgenus *Hippochaete*

Die Zentralhöhle wird für die Arten der Untergattung *Hippochaete* von HAUKE (1963) nicht als Merkmal geführt, die Vallekularkanäle sieht er als nicht besonders typisch an. Nur für *E. variegatum* führt er sinngemäß aus: Zentralhöhle bei kräftigen Sprossen gut ausgebildet und dann größer als die Vallekularkollenchymhöhlen, ZH bei schwächtigen Sprossen fehlend. DOSTÁL (1984) beschreibt dagegen jeweils den Anteil der Zentralhöhle am Sprossdurchmesser: Dieser beträgt bei *E. ramosissimum* etwas mehr als 1/2, bei *E. hyemale* 2/3 bis 9/10 und bei *E. variegatum* 1/4 bis 1/3. PAGE (1997) gibt für letztere Art einen Zentralhöhlen-Anteil von 1/3 bis 3/4 an. Die durchschnittliche Anzahl der Carinae ist nach HAUKE (1963) „hoch“ bei *E. hyemale* (20), „mittel“ bei *E. ramosissimum* (14,3) und „niedrig“ bei *E. variegatum* (6,4). Auf die Durchmesser-Einheit umgerechnet hat lt. HAUKE (1963) aber *E. hyemale* durchschnittliche 3,8 Rippen, *E. ramosissimum* 4,0 und *E. variegatum* 4,3. Das charakteristische Carinal-Kollenchym ist bei *E. hyemale* bis zum Leitbündel durchgehend, bei *E. ramosissimum* meist gut ausgebildet und z. T. auch bis zum Leitbündel vorstoßend. Bei *E. variegatum* durchbricht es das Chlorenchym nicht bzw. nimmt nur ungefähr die halbe Distanz von der Epidermis bis zur Endodermis ein oder fehlt sogar ganz. Im Gegensatz dazu zeigt *E. variegatum* typischerweise ein bis zur Vallekularkollenchymhöhle reichendes

**Wüba 2 -a**

**Wüba 2 -b**



*E. × litorale*  
 = *E. arvense* × *fluviatile*

Abb. 2d. Subgenus *Equisetum*. Spross-Querschnitte (Forts.).

Vallekular-Kollenchym (aber Reduktion möglich oder fehlend), während *E. hyemale* nur seichtes oder gar kein Vallekular-Kollenchym aufweist. *E. ramosissimum* schließlich zeigt unterschiedlichste Ausprägungen des Kollenchyms im Bereich der Valleculae von nahezu fehlend bis gut ausgebildet (alle Angaben nach HAUKE 1963). Das Verhältnis von Vallekular-Kollenchym / Carinal-Kollenchym gibt HAUKE (1963) an mit  $1/2$  bis  $1/4$  (*E. ramosissimum*),  $1/4$  bis  $1/7$  (*E. hyemale*) und  $1/1$  bis  $2/3$  (*E. variegatum*). Die Endodermis ist für die drei mitteleuropäischen *Hippochaete*-Arten nicht charakteristisch, da alle gleichermaßen eine äußere sowie innere Endodermis („doppelt“) aufweisen, welche die Leitbündel in ihrem Inneren einschließen.

Das in der vorliegenden Untersuchung analysierte Pflanzenmaterial (Abb. 3a-c) wies bezüglich der Verhältnisse von Sprossdurchmesser, Zentralhöhle und Vallekularhöhlen Unterschiede in Abhängigkeit von der Sprosshöhe auf, deutlich stärker im Vergleich zur Situation in der Untergattung *Equisetum* (s. o.). So beträgt der ZH-Anteil bei *E. hyemale* 0,52 bis 0,65 (Spross A) bzw. 0,55 bis 0,72 (Spross B). Die besonders hohe Variabilität von *E. ramosissimum* ist bekannt (z. B. DOSTÁL 1984) und zeigt sich hier sowohl zwischen den Sprossen als auch innerhalb eines Sprosses (0,51 bis 0,71 und 0,36 und 0,5). Bei *E. variegatum* scheint die Sprosshöhe noch vergleichsweise am wenigsten relevant zu sein (ZH: 0,32 bis 0,38 und 0,34 bis 0,43).

Im Mittel ist die ZH eines Sprosses von *E. hyemale* anteilig am größten, diejenige von *E. variegatum* am kleinsten. *E. ramosissimum* kann sowohl sehr kleine ZH besitzen als auch ähnlich große wie *E. hyemale* (s. Abb. 3b). Trotzdem lässt sich ein solcher Spross von einem *E. hyemale*-Spross unterscheiden, z. B. durch die Anzahl an Carinae, die bei *E. hyemale* deutlich höher ist als bei *E. ramosissimum*. In Diagramm 1 sind die ZH/Sprossdurchmesser-Verhältnisse gegen die Anzahl an Carinae bzw. Vallekularhöhlen aufgetragen: Deutlich abgesetzt sind die beiden *E. hyemale*-Sprosse mit dem *E. × moorei*-Vertreter aus Mannheim („Mhm“), welcher in diesen Merkmalen sehr jener Elternart gleicht. Tatsächlich ist der Spross-Querschnitt kaum von *E. hyemale* zu unterscheiden, höchstens durch die leicht abgerundeten Carinae und nicht langgezogenen Vallekularhöhlen im untersten Sprossbereich. Der zweite *E. × moorei*-Spross („Hoh“) tendiert mehr Richtung des benachbarten kräftigen Sprosses von *E. ramosissimum*, der anderen Elternart. Die Carinae weisen jedoch jeweils eine deutliche Rille auf, was an eine Beteiligung von *E. hyemale* erinnert (Abb. 3a).

Mit kleiner Zentralhöhle und wenigen Carinae ist *E. variegatum* (zusammen mit *E. × meridionale*) in der linken unteren Ecke des Diagramms (S. 64) positioniert. Eine Carinalrille ist unabhängig von der Sprosshöhe gut erkennbar, besonders im untersten Sprossbereich tritt zudem die starke Ausprägung des Vallekular-Kollenchyms deutlich zum Vorschein. Spross A der Augsburger Population („Aug“) von *E. × meridionale* (= *E. ramosissimum* × *variegatum*) lässt sich nur durch das im unteren Bereich sehr stark ausgeprägte Carinal-Kollenchym (unterbricht nahezu das Chlorenchym) von *E. variegatum* unterscheiden. Spross B zeigt dagegen ein komplett durchgehendes Chlorenchym

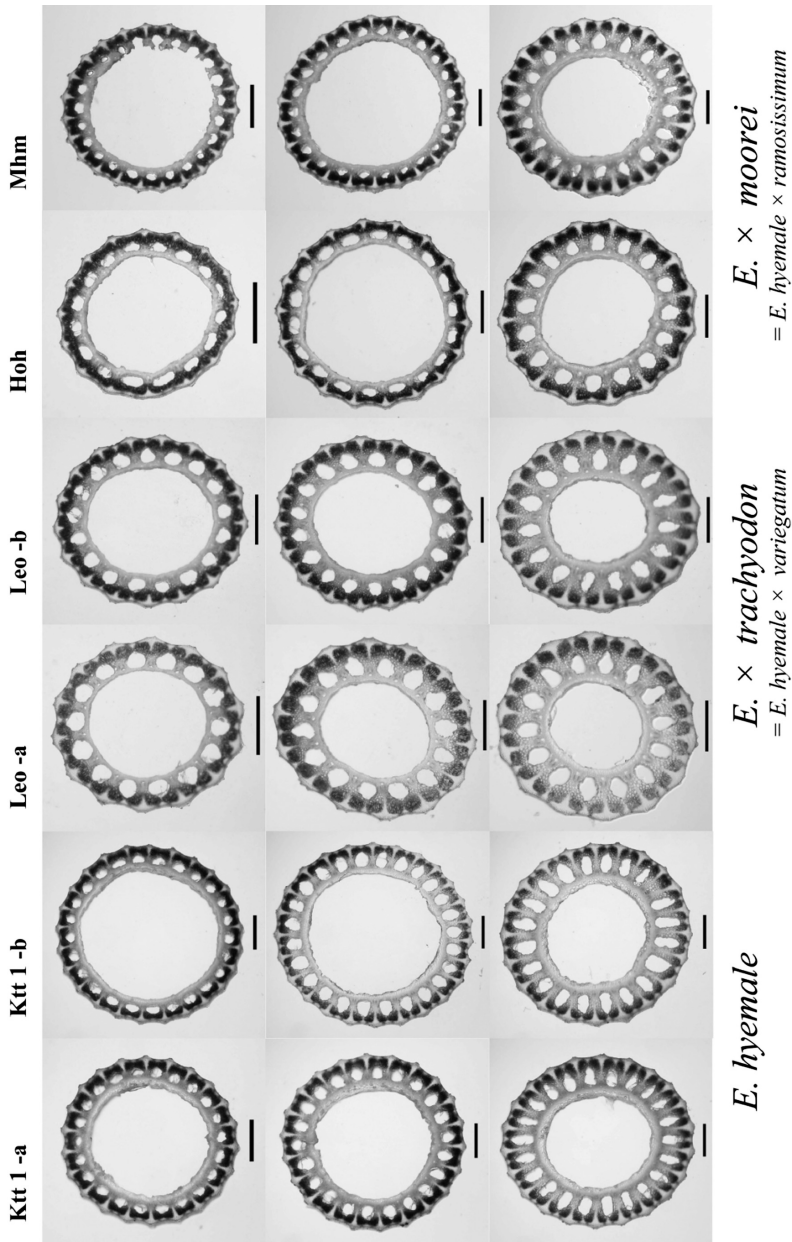


Abb. 3a. Subgenus *Hippochaete*. Spross-Querschnitte (Internodien) verschiedener Populationen (,Ktt' / ,Leo' / ,Hoh' / ,Mhm', s. Anhang 1) von Hybriden und Elternarten. Reihe unten: Sprossbasis-nahes Internodium, Reihe Mitte: Spross-Mitte, Reihe oben: oberer Sprossbereich. Maßstab 1 mm.

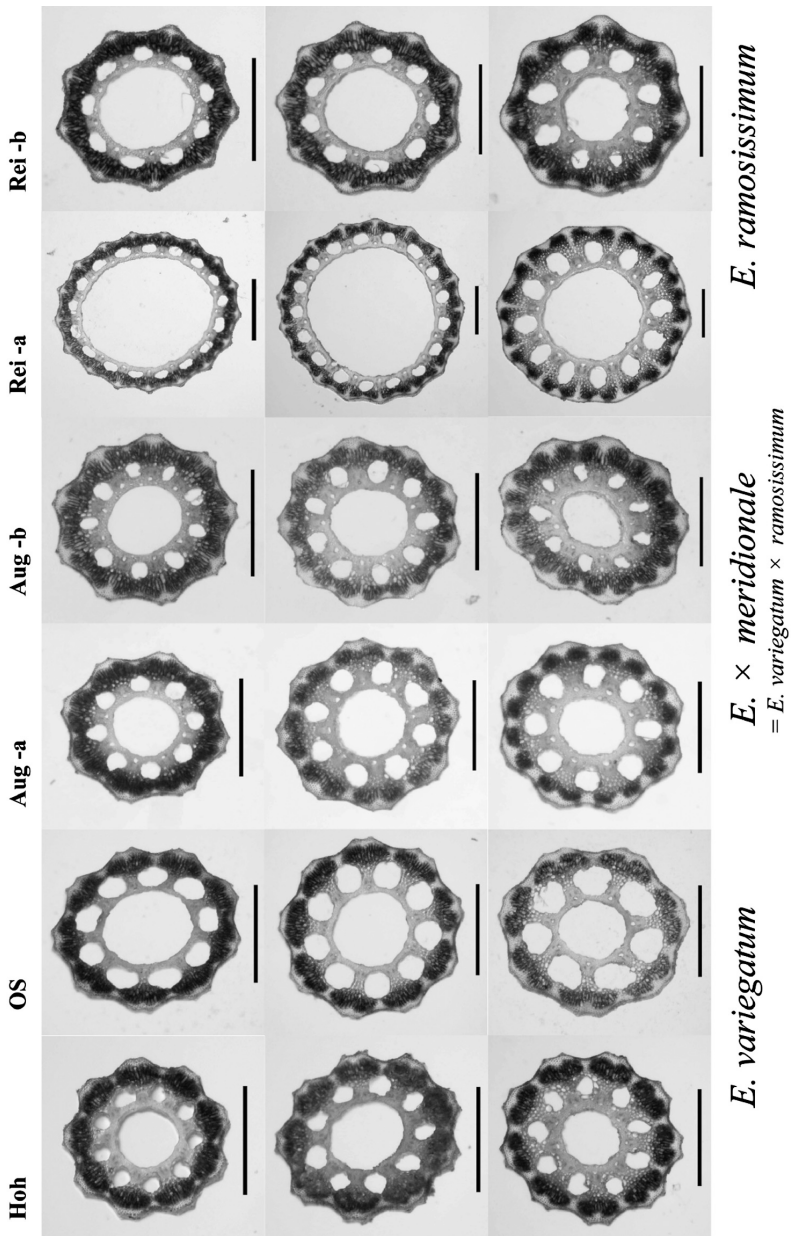


Abb. 3b. Subgenus *Hippochaete*. Spross-Querschnitte (Internodien) verschiedener Populationen (‚Hoh‘ / ‚OS‘ / ‚Aug‘ / ‚Rei‘, s. Anhang 1) von Hybriden und Elternarten. Reihe unten: Sprossbasis-nahes Internodium, Reihe Mitte: Spross-Mitte, Reihe oben: oberer Sprossbereich. Maßstab 1 mm.



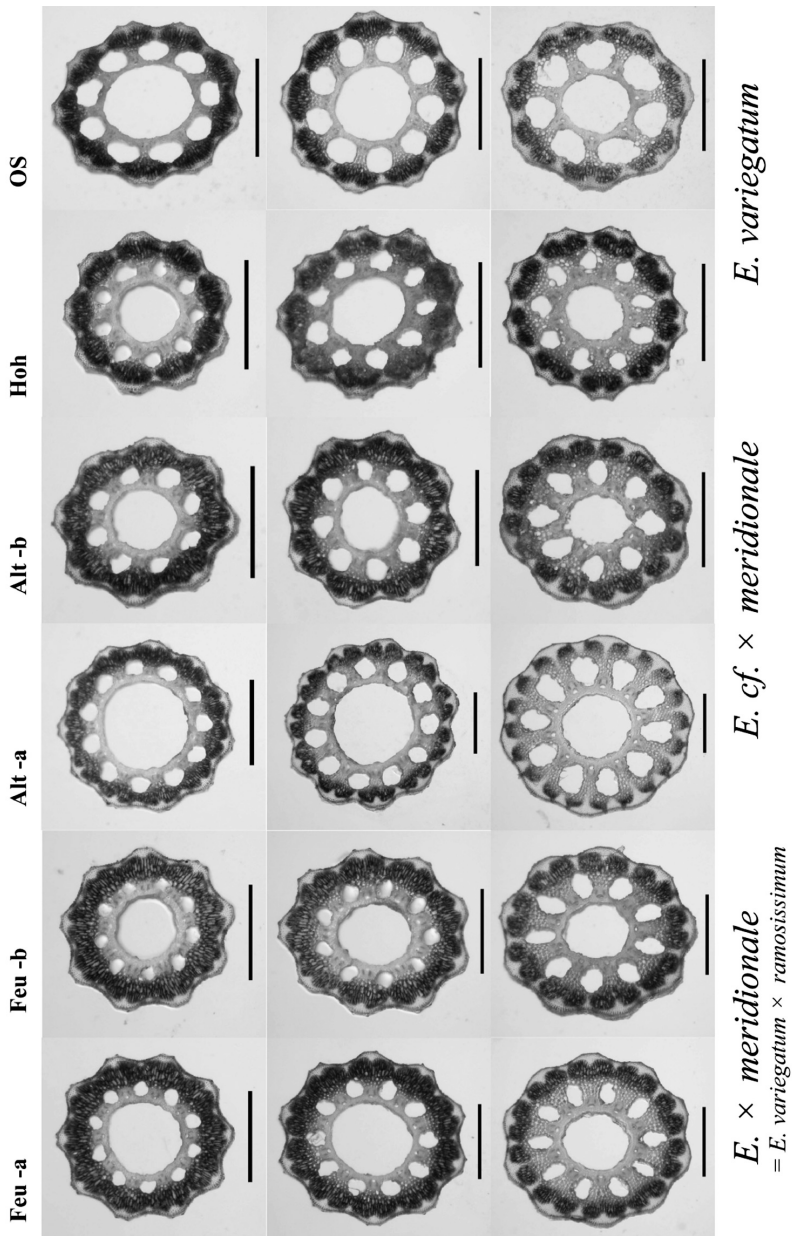
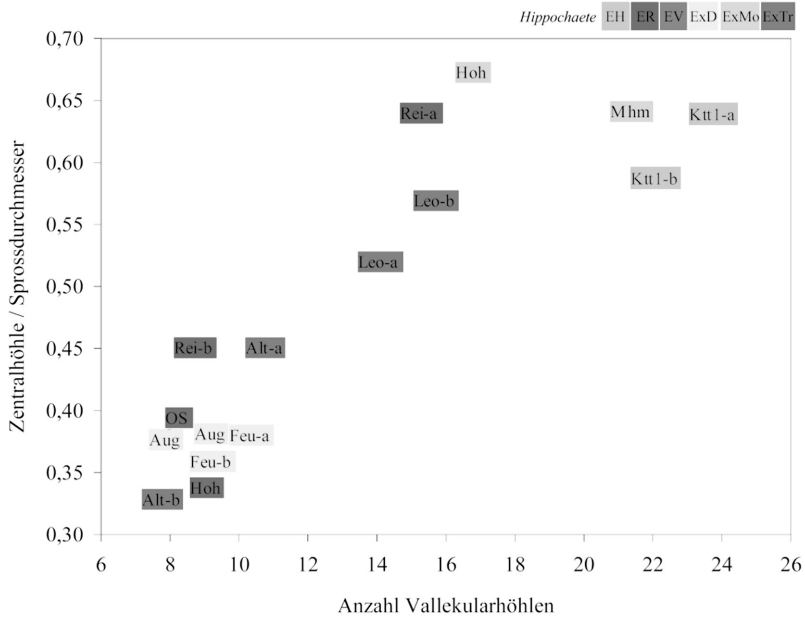


Abb. 3c. Subgenus *Hippochaete*. Spross-Querschnitte (Internodien) verschiedener Populationen („Feu“ / „Alt“ / „Hoh“ / „OS“, s. Anhang 1) von Hybriden und Elternarten. Reihe unten: Sprossbasis-nahes Internodium, Reihe Mitte: Spross-Mitte, Reihe oben: oberer Sprossbereich. Maßstab 1 mm.



**Diagramm 1.** Subgenus *Hippochaete*. Spross-Querschnitte. Vergleich der Populationen von Kreuzungen und Elternarten.

(Vallekular-Kollenchym schlecht ausgeprägt) und relativ abgerundete Carinae, was auf *E. ramosissimum* verweist (Abb. 3b). Ein fast ähnliches Bild ergibt sich bei den Sprossen der Population Feuerthalen („Feu“, *E. × meridionale*), hier mit durchgehendem Chlorenchym im oberen und mittleren Sprossbereich und verhältnismäßig geringer Ausprägung des Vallekular-Kollenchyms im unteren Sprossbereich (Abb. 3c). Bemerkenswerterweise reihen sich auch die Sprosse der zunächst als „*E. × trachyodon*“ (= *E. hyemale* × *variegatum*) angesprochenen Population aus Altenburg („Alt“, vgl. ASP 2002) in diesen Komplex ein (Diagramm 1). Keinerlei Hinweise sind auf eine Beteiligung von *E. hyemale* an diesem Taxon zu finden, es lässt sich vielmehr im Spross-Querschnitt nicht von den Vertretern der Populationen „Aug“ und „Feu“ unterscheiden! Nur Spross A rückt auf Grund des ZH-Verhältnisses mehr in Richtung des benachbarten schwächtigen *E. ramosissimum*-Vertreters, gleichzeitig ist im unteren Sprossbereich das Vallekular-Kollenchym besonders breit angelegt.

Eine ungefähre Mittelstellung zwischen den beiden Extremen nehmen die Sprosse der Leopoldshafen-Population („Leo“) von *E. × trachyodon* ein (Diagramm 1). Dies entspricht auch den Elternarten dieser Hybride, *E. hyemale* und *E. variegatum*. Spross A tendiert eher Richtung letzterer Art, Spross B mehr Richtung *E. hyemale*. Neben dem im Vergleich zu *E. hyemale* sehr gut aus-

geprägten Kollenchym unter den Valliculae deuten auch die etwas stärker hervorstechenden Carinae auf eine Beteiligung der Art *E. variegatum* (Abb. 3a).

Zweifellos ist die Ausprägung von Chlorenchym als auch Kollenchym zur Charakterisierung von Spezies und Hybriden in der Untergattung *Hippochaete* von einiger Bedeutung. Es hat sich jedoch gezeigt, dass diese Merkmale nicht nur in Abhängigkeit der Sprosshöhe variieren. Ein „durchgehendes Chlorenchym“ (HROUDA u. KRAHULEC 1982, KRAHULEC et al. 1996) scheint demnach nicht generell typisch für *E. × meridionale* zu sein, genauso wenig wie ein „unterbrochenes Chlorenchym“ nicht notwendigerweise charakteristisch für *E. × moorei* sein muss. Im Falle der beiden Kreuzungen scheint die Variabilität auf die besonders hohe Plastizität der Elternart *E. ramosissimum* zurückzugehen.

Ein Merkmal „rote Wände der äußeren Endodermis“ (HROUDA u. KRAHULEC 1982) wurde hier ebenfalls nicht als ein besonderes Merkmal von *E. × meridionale* beobachtet.

Insgesamt erwiesen sich in der vorliegenden Untersuchung Spross-Querschnitte als sehr hilfreich zur Charakterisierung von Subgenus *Equisetum*-Hybriden (hier: *E. × litorale*). Im Subgenus *Hippochaete* ist jedoch aufgrund der starken Ähnlichkeit der Querschnitte aller 6 Taxa und einer vergleichsweise hohen Merkmals-Variabilität die Spross-Anatomie nur von eingeschränktem Wert für die Identifikation von Kreuzungen.

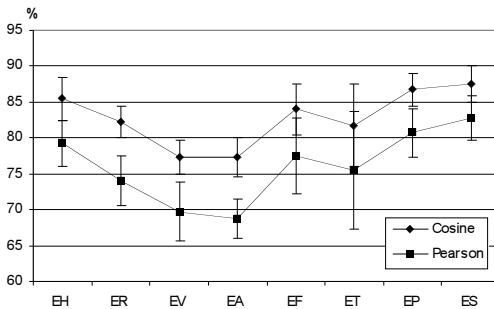
## 2. DNA-Fingerprinting – ISSR-Analysen

Die Ergebnisse des DNA-Fingerprintings mittels „Inter-simple sequence repeats“-PCR zeigen, dass diese Methode auch auf die Pteridophyten-Gruppe der Equisetopsida grundsätzlich anwendbar ist. Alle vier benutzten Primer eignen sich zudem sehr gut zur Differenzierung der verschiedenen Spezies, die resultierenden Muster sind in jedem Fall hoch charakteristisch für die jeweilige Art.

Zum Teil eingeschränkt war die Aussagefähigkeit der ISSR-Muster bei einzelnen Primern in Bezug auf die Unterscheidung der Populationen innerhalb der Spezies. In einigen Fällen überlagerten hier offensichtlich Gel-Effekte die Populations-richtige Zuordnung der Isolate. Dies gilt umso mehr für die Detektion von möglichen Polymorphismen zwischen verschiedenen Individuen einer Population, die mit den verwendeten Primern offenbar unzureichend war und hier deshalb unberücksichtigt bleiben musste. Trotzdem kann festgestellt werden, dass selbst optisch unbefriedigende Muster in der Clusteranalyse Spezies-richtig zugeordnet wurden.

## Genetische Diversität

Begreift man den prozentualen Ähnlichkeitswert eines Spezies-Clusters (kann aus dem Dendrogramm der Clusteranalyse abgelesen werden, s. Anhang 2), also des alle Populationen einer Art umfassenden Clusters, als Maß für die genetische Ähnlichkeit der Populationen der betreffenden Spezies, so lässt sich hier wie folgt zusammenfassen: Ein Vergleich der durchschnittlichen Ähnlichkeiten (Dia-

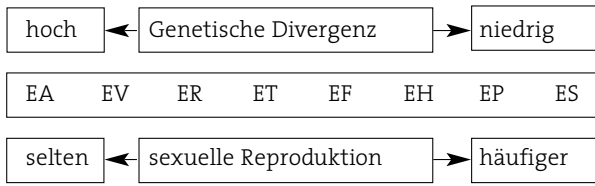


**Diagramm 2.** Ähnlichkeit der Populations-Cluster (Pearson-Korrelation bzw. Cosine-Koeffizient, Fehlerbalken: Mittlere Abweichung).

ogramm 2) ergibt sowohl für die Berechnung nach dem Cosine-Koeffizienten als auch nach der Pearson-Korrelation das gleiche Bild: die geringste Ähnlichkeit und damit die größte genetische Divergenz weisen offensichtlich Populationen von *E. variegatum* und *E. arvense* auf, gefolgt von *E. ramosissimum*, *E. telmateia* und *E. fluviatile* mit mittlerer Ähnlichkeit der Populationen. Die niedrigste genetische Divergenz ihrer Populationen zeigen dagegen *E. sylvaticum*, *E. palustre* und *E. hyemale*.

Untersuchungen zur genetischen Diversität von *E. hyemale* und *E. arvense* auf Basis von Allozym-Analysen (KORPELAINEN u. KOLKKALA 1996, SOLTIS et al. 1988) ermittelten die genetische Variabilität innerhalb der Populationen als durchschnittlich (*E. arvense* mit etwas weniger Genotypen je Population), außerdem wurde jedoch erhöhte Heterozygotie der Genotypen festgestellt (höher: *E. arvense*). Dies ist zum einen Indiz dafür, dass der Anteil an Selbstbefruchtungen (intra- und intergametophytisch) besonders gering ist (vgl. auch PÄEGER et al. 1989). Zum anderen lässt sich auf einen geringen Genfluss und damit vegetative Vermehrung als bevorzugter Reproduktionsstrategie beider Arten schließen. Dieselbe Untersuchung stellte niedrige genetische Ähnlichkeit – d. h. hohe genetische Divergenz – auch zwischen geographisch relativ naheliegenden Populationen fest, sowohl für *E. hyemale* als auch für *E. arvense*. Hieraus folgern die Autoren, dass die sexuelle Reproduktion in etablierten Beständen dieser Spezies eher unüblich ist und führen dies auf die vergleichsweise ineffektive Sporenkeimung und gametophytische Reproduktion zurück (KORPELAINEN u. KOLKKALA 1996).

Vor diesem Hintergrund – hohe genetische Divergenz der Populationen entspricht einer niedrigen Rate der sexuellen Reproduktion – lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen aus dem ISSR-Fingerprinting in Form einer Skala veranschaulichen:

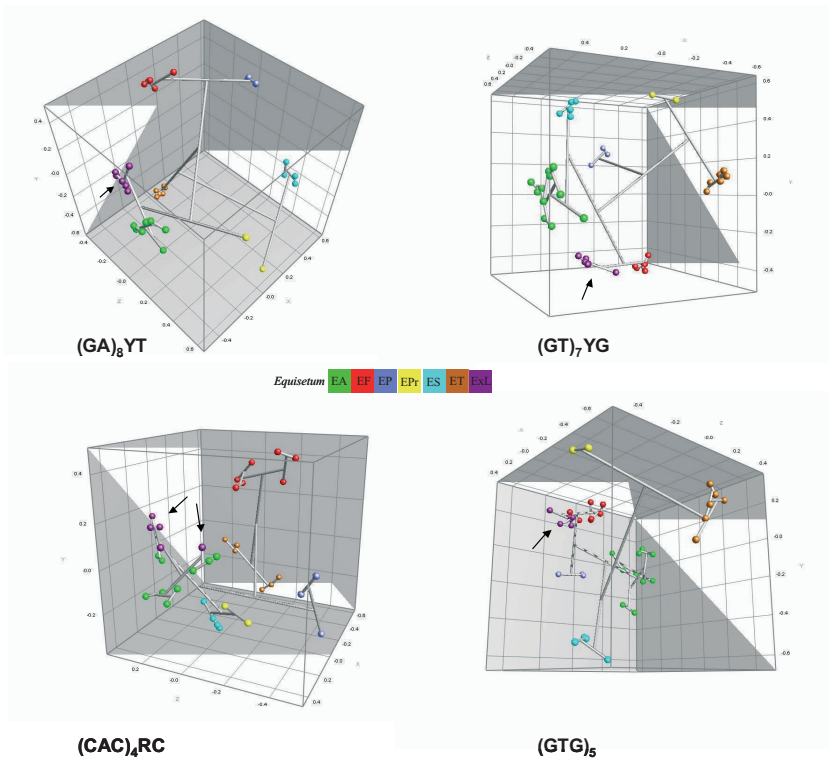


Hierbei markiert *E. arvensis* links diejenige Art, welche vegetative Vermehrung ausgesprochen bevorzugt, während bei *E. sylvaticum* (rechte Flanke) sexuelle Reproduktion offenbar zumindest häufiger vorkommt. Relativiert wird diese Skala zum einen durch die verhältnismäßig geringe Zahl jeweils verglichener Populationen, welche außerdem z.T. bei den einzelnen Arten geographisch unterschiedlich weit entfernt liegen; zum anderen unterscheiden sich die Ähnlichkeitswerte je nach verwendetem Primer durchaus: Diese Streuung, hier dargestellt in Form der Mittleren Abweichung, ist beispielsweise im Falle von *E. telmateia* besonders groß, was eine Einordnung dieser Art erschwert (Diagramm 2). Weitere Untersuchungen sind deshalb nötig, um die sich hier abzeichnenden Tendenzen zu verifizieren.

#### Verwandtschaftsverhältnisse

Der Grad der Ähnlichkeit zwischen den einzelnen Spezies-Cluster ist starken Schwankungen unterworfen, auch in Abhängigkeit der verwendeten Primer. Demgegenüber ist in der Untergattung *Hippochaete* die Schwankungsbreite deutlich geringer. In den MDS-Darstellungen (Abb. 4 und Abb. 5) drückt sich das Auftreten sowohl sehr hoher als auch sehr geringer Spezies-Ähnlichkeiten in der Untergattung *Equisetum* als eine heterogene Verteilung der Arten im dreidimensionalen Raum aus. Von Interesse können in diesem Zusammenhang die Positionen der beiden Arten *E. sylvaticum* und *E. pratense* sein, die als verwandtschaftlich sehr nahestehend betrachtet werden. Zum Beispiel sind diese Spezies als einzige der Gattung semi-heterophyadisch, d. h. ihre fertilen Sprosse ergrünen später, außerdem finden sich Übereinstimmungen auf Grund von morphologischen, mikromorphologischen und molekularen Merkmalen (HAUKE 1978, PAGE 1972, DES MARAIS et al. 2003). Wenngleich die hier behandelten Gruppierungen der Spezies auf Grund von Ähnlichkeiten ihrer ISSR-Muster nicht die phylogenetischen Beziehungen im Sinne eines Zurückverfolgens des Stammbaumes ausdrücken, so stellen sie doch den Grad einer momentanen genetischen Ähnlichkeit dar. Es ist deshalb nicht abwegig, die Arten *E. sylvaticum* und *E. pratense* als genetisch relativ ähnlich zu vermuten. Dies konnte durch die vorliegenden Untersuchungen jedoch nur mittels des Primers (CAC)<sub>4</sub>RC bestätigt werden, allenfalls Primer (GA)<sub>8</sub>YT lässt noch eine Nähergruppierung erahnen. In den anderen zwei Fällen war die Aussage entweder indifferent – Primer (GT)<sub>7</sub>YG – oder völlig gegensätzlich wie bei Primer (GTG)<sub>5</sub> (Abb. 4).

Auch unter den anderen Spezies des Subgenus *Equisetum* kann eine Gruppierung gemäß verwandtschaftlicher Beziehungen nicht festgestellt



**Abb. 4.** *Equisetum* subgenus *Equisetum*. Ähnlichkeitsvergleich der mit vier verschiedenen ISSR-Primern erzeugten DNA-Fingerprinting-Muster (Multi-dimensional Scaling, Pearson Korrelation).

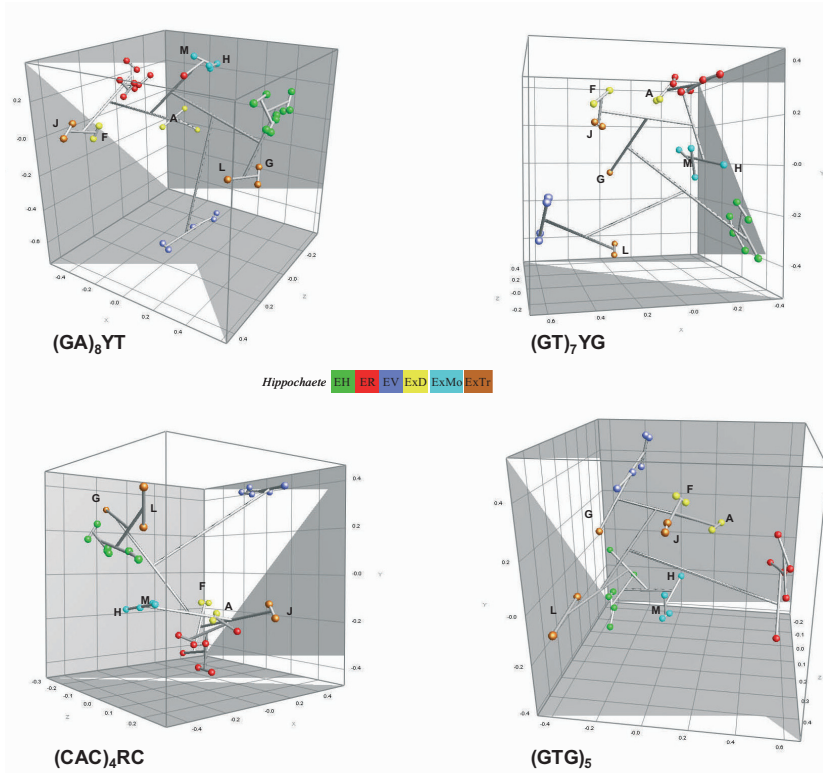
Pfeile: Kreuzung *E. × litorale* (= *E. arvense × fluviatile*).

werden. Lediglich innerhalb der Untergattung *Hippochaete* könnte die bei drei Primern (Abb. 5) stärker abgerückte Position von *E. variegatum* im Vergleich zu *E. ramosissimum* und *E. hyemale* in diesem Sinne interpretiert werden (*E. ramosissimum* gilt als mit *E. hyemale* näher verwandt, z. B. DE MARAIS et al. 2003).

#### Positionen der Kreuzungen

Unter Einschluss der Hybriden tritt jedoch ein weiterer interessanter Aspekt hinzu: Drücken sich die jeweiligen Elternarten in der Position der Kreuzungs-Cluster aus bzw. lassen sich umgekehrt aus der Position der Cluster Rückschlüsse auf die Elternarten ziehen?

Für die Untergattung *Equisetum* ist die Hybride *E. × litorale* (= *E. arvense × fluviatile*), mit zwei geographisch sehr nahe liegenden Populationen berücksichtigt worden: Die Sprosse der Population ‚Wüba 1‘ gleichen in ihrem Habitus eher *E. arvense*, während die der Population ‚Wüba 2‘ (ca. 100 m entfernt) deutlicher *E. fluviatile* ähneln vgl. (Abb. 2c). Beide Populationen positionieren sich



**Abb. 5.** *Equisetum* subgenus *Hippochaete*. Ähnlichkeitsvergleich der mit vier verschiedenen ISSR-Primern erzeugten DNA-Fingerprinting-Profilen (Multi-dimensional Scaling, Pearson Korrelation). Populationen der Hybriden: A = ‚Aug‘, F = ‚Feu‘, J = ‚Alt‘, L = ‚Leo‘, G = ‚Germ‘, M = ‚Mhm‘, H = ‚Hoh‘.

in der Cluster-Analyse nicht unabhängig voneinander, wenn auch in zwei Fällen einzelne, jedoch unterschiedliche Proben abgesetzt sind.

Die *E. × litorale*-Gruppe insgesamt ist aber nicht etwa durchgängig intermediär, also zwischen den beiden Elternarten gelegen, sondern im Gegenteil je nach verwendetem Primer entweder eher *E. arvense* oder mehr *E. fluviatile* zuzuordnen (Abb. 4). Mit zwei Primern durchdringt *E. × litorale* sogar das jeweilige Spezies-Cluster teilweise und zwar bei unterschiedlichen Elternarten: *E. arvense* mit (CAC)<sub>4</sub>RC und *E. fluviatile* mit (GTG)<sub>5</sub>. Auch in den beiden Fällen einer gut abgegrenzten Hybrid-Gruppe ist diese deutlich hin zu einer jeweils unterschiedlichen Art verschoben: zu *E. arvense* mit (GA)<sub>8</sub>YT und zu *E. fluviatile* mit (GT)<sub>7</sub>YG.

Offenbar entspricht die Verwendung unterschiedlicher ISSR-Primer im Prinzip verschiedenen Blickrichtungen auf das Genom und führt damit jeweils zur Wiedergabe anderer Charakteristika des Organismus. Daraus lässt sich wiederum schließen, dass nur mit einer größeren Zahl von Primern ein der Wirklich-

keit nahekommendes Gesamtbild erstellt werden kann. Für die *E. × litorale*-Gruppe bedeutet das wechselseitige Clustern zu entweder *E. fluviatile* oder *E. arvense* und die Position im Zwischenraum dieser Spezies eine Bestätigung sowohl des grundsätzlichen Kreuzungscharakters als auch der Elternschaft beider letztgenannter Arten.

Innerhalb des Subgenus *Hippochaete* sind in der vorliegenden Untersuchung alle drei möglichen Kreuzungen berücksichtigt worden. Analysiert wurden Vertreter von sieben Hybrid-Populationen: ‚Leo‘, ‚Germ‘ und ‚Alt‘ (*E. × trachyodon* = *E. hyemale* × *variegatum*), ‚Aug‘ und ‚Feu‘ (*E. × meridionale* = *E. ramosissimum* × *variegatum*) sowie ‚Mhm‘ und ‚Hoh‘ (*E. × moorei* = *E. hyemale* × *ramosissimum*).

Die beiden *E. × moorei*-Populationen sind zwar voneinander trennbar, unterscheiden sich aber nicht wesentlich in ihrer Positionierung. Diese liegt mit den drei Primern (CAC)<sub>4</sub>RC, (GA)<sub>8</sub>YT und (GT)<sub>7</sub>YG ungefähr in der Mitte zwischen den Elternarten *E. hyemale* und *E. ramosissimum*, die Verankerung im Dendrogramm im Falle der zwei erstgenannten Primern zielt auf *E. ramosissimum*. Bei (GT)<sub>7</sub>YG „kippt“ allerdings der Dendrogramm-Ast von *E. × moorei* je nach Algorithmus zu *E. ramosissimum* (Pearson) oder zu *E. hyemale* (Cosine), was zusätzlich auf eine ziemlich genau intermediäre Stellung des Hybrid-Clusters hindeutet (Daten nicht abgebildet). Der vierte Primer – (GTG)<sub>5</sub> – liefert Muster, die *E. × moorei* nahe an *E. hyemale* gruppieren lässt (Abb. 5). Auch für diese Kreuzung kann somit der Hybridcharakter bestätigt und die Elternarten benannt werden. Mit (GA)<sub>8</sub>YT ist ein *E. ramosissimum*-„Ausreisser“ festzustellen (Population ‚Ach‘) der zur *E. × moorei*-Gruppe clustert. Dieses Isolat wurde nicht mit den anderen Primern analysiert, das Ergebnis ist deshalb hier nicht verifizierbar.

Etwas komplizierter ist die Situation bei Betrachtung der weiteren Kreuzungen. Die *E. × trachyodon*-Populationen ‚Leo‘ und ‚Germ‘ gruppieren – wenn auch etwas voneinander separiert – in 2 Fällen gemeinsam nahe *E. hyemale* während die anderen Primer zu einer Trennung der Populationen führen (Abb. 5):

Für beide Hybrid-Taxa besteht über die Elternschaft von *E. hyemale* kein Zweifel, was sich in der Cluster-Analyse durch nahes Gruppieren ausdrückt. Zu *E. variegatum* clustert die ‚Leo‘-Population mit Primer (GT)<sub>7</sub>YG am nächsten, während ‚Germ‘ mit Primer (GTG)<sub>5</sub> nahe dieser Spezies gruppiert. ‚Leo‘ zeigt keine Hinweise auf eine Beteiligung von *E. ramosissimum*, der dritten *Hippochaete*-Art, und in der MDS-Darstellung mit (GA)<sub>8</sub>YT nehmen beide Populationen eine fast exakt intermediäre Position zwischen *E. hyemale* und *E. variegatum* ein. Aus „ISSR-Sicht“ ist daher die Identität des Taxons von Leopoldshafen mit der Kreuzung *E. × trachyodon* sehr wahrscheinlich.

Der Charakter der ‚Germ‘-Population kann u.U. nicht durch ein einfaches Kreuzungsereignis erklärt werden. Das (GA)<sub>8</sub>YT – Muster dieses Taxons zeigt Ähnlichkeiten mit Mustern von *E. ramosissimum* und assoziierter Taxa. Möglicherweise handelt es sich hier um das Ergebnis einer (Rück-)Kreuzung zwischen *E. × trachyodon* und *E. ramosissimum* (s. u.).



Unerwartet ist das Ergebnis der Clusteranalyse hinsichtlich des dritten Taxons, welches morphologisch als *E. × trachyodon* klassifiziert wurde – der Population ‚Alt‘: Eine Übereinstimmung mit den Positionen der ‚Leo‘ / ‚Germ‘-Cluster ist nicht feststellbar. Im Gegenteil, die Muster der Primer (GA)<sub>8</sub>YT, (GT)<sub>7</sub>YG sowie (GTG)<sub>5</sub> zeigen sehr hohe Ähnlichkeiten mit Mustern der Population ‚Feu‘, die wie die ‚Aug‘-Population der Kreuzung *E. × meridionale* zugeordnet ist (Abb. 5). Letztere Taxa positionieren sich beide zwischen oder nahe ihrer mutmaßlichen Elternarten *E. variegatum* und *E. ramosissimum*. Mit dem Primer (CAC)<sub>4</sub>RC ist die Population ‚Alt‘ von der ‚Feu‘-Population separiert, gruppiert dafür aber ähnlich der Augsburger Population (‚Aug‘) nahe *E. ramosissimum*. Wie zuvor aufgrund von Charakteristika des Spross-Querschnitts gezeigt werden konnte (s. o.), ist im Falle der Hybrid-Population ‚Alt‘ also auch mittels ISSR-Fingerprinting-Analyse kein Hinweis auf eine Elternschaft von *E. hyemale* erkennbar. Bei diesem Taxon handelt es sich offensichtlich nicht um *E. × trachyodon*, sondern vielmehr ebenfalls um die Kreuzung zwischen *E. variegatum* und *E. ramosissimum* (*E. × meridionale*).

Trotz der Ähnlichkeiten positionieren sich die drei Populationen ‚Feu‘, ‚Alt‘ und ‚Aug‘ durchaus unterschiedlich: In der MDS-Darstellung scheint die ‚Aug‘-Gruppe etwas mehr mit *E. ramosissimum* assoziiert als die ‚Feu‘ / ‚Alt-Gruppe (Abb. 5). Letzteres Cluster ist ebenfalls klar getrennt, was ja bereits in den morphologischen Unterschieden des Pflanzenmaterials beider Populationen zum Ausdruck kam. Angesichts der verhältnismäßig niedrigen genetischen Ähnlichkeiten von Populationen der Elternart *E. ramosissimum* und insbesondere von *E. variegatum* (vgl. Diagramm 2) scheinen genetisch stark unterschiedliche Kreuzungen zwischen diesen Arten nicht ungewöhnlich. Ein weiterer wichtiger Aspekt sollte hier jedoch berücksichtigt werden:

Es ist seit langem bekannt (z. B. KÜMMERLE 1931) dass neben den Hybriden mit „typischer“ intermediärer Morphologie auch Übergangsformen feststellbar sind, sogenannte Nothomorphen dieser Kreuzungen (DOSTÁL 1984). Dies hat zu der Annahme geführt, dass möglicherweise auch Rückkreuzungen zwischen den Hybriden und ihren Elternarten stattfinden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass *Hippochaete*-Kreuzungen auch einen kleinen Prozentsatz nicht abortierter, grüner Sporen produzieren, welche in der Lage sind zu keimen und zu normal entwickelten Prothallien heranzuwachsen (HROUDA u. KRAHULEC 1982, KRAHULEC et al. 1996).

Anhand von durchflusszytometrischen Analysen haben BENNERT et al. (2005) herausgefunden, dass es sich bei Kreuzungen mit intermediärer Morphologie um „normale“, diploide Hybriden handelt, während die Zwischenformen offenbar triploide Taxa repräsentieren. Ein triploider Schachtelhalm kann demnach z. B. durch das Verschmelzen eines haploiden Gameten mit einem diploiden Gameten von einem diploiden Prothallium entstehen, da diploide Kreuzungen gelegentlich vergrößerte, unreduzierte Sporen (sog. Diplosporen) erzeugen. Generell sind durch Rückkreuzungen 6 triploide Übergangs- / Zwischenformen möglich, die sich in ihrer Morphologie stark einzelnen Elternarten annähern:

[*E. × moorei*] × *E. ramosissimum* (= Genom HRR), [*E. × moorei*] × *E. hyemale* (= RHH), [*E. × trachyodon*] × *E. hyemale* (= VHH), [*E. × trachyodon*] × *E. variegatum* (= HVV), [*E. × meridionale*] × *E. variegatum* (= RVV), [*E. × meridionale*] × *E. ramosissimum* (= VRR). Darüber hinaus können jedoch noch drei weitere Kreuzungsereignisse zur Bildung einer siebten Hybride führen, die Merkmale aller drei *Hippochaete*-Arten aufweist: z.B. [*E. × trachyodon*] × *E. ramosissimum* (Genom HVR).

Insgesamt hat sich die ISSR-Methode als wertvolles zusätzliches Hilfsmittel zur Identifikation und Charakterisierung von hybriden Taxa und ihrer Elternarten erwiesen.

Ob die hier analysierten Taxa einzelnen der oben beschriebenen triploiden Kombinationen entsprechen, kann auf Basis der vorliegenden ISSR-Daten nicht mit Sicherheit geklärt werden. Während wenig Zweifel daran besteht, dass es sich im Falle der beiden Populationen von *E. × moorei* um das diploide Resultat eines einfachen Kreuzungsereignisses zwischen *E. hyemale* and *E. ramosissimum* handelt, könnte Triploidie eine Erklärung für die verhältnismäßig großen genetischen Unterschiede zwischen den drei Populationen ‚Aug‘, ‚Feu‘ und ‚Alt‘ sein (*E. × meridionale*). Des weiteren könnte das uneinheitliche Gruppierungsverhalten der ‚Germ‘-Population (*E. × trachyodon*) darauf hinweisen, dass es sich hier möglicherweise um die triploide HRV Hybride handelt. Weitere Untersuchungen an diesen sowie zusätzlichen (diploiden und triploiden) Hybrid-Populationen sind jedoch notwendig, um detailliertere Aussagen treffen zu können.

#### DANK

Ich danke insbesondere Herrn Prof. Dr. K. Haas und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. O. Spring am Institut für Botanik der Universität Hohenheim, den Mitarbeitern der Abteilung Botanik des Staatlichen Museums für Naturkunde in Stuttgart, Frau Prof. Dr. E. Kandeler und ihrer Arbeitsgruppe Bodenbiologie am Institut für Bodenkunde (Hohenheim), sowie Herrn Prof. Dr. R. Böcker und Herrn B. Schäfer vom Institut für Landschafts- und Pflanzenökologie (Hohenheim). Der Gesellschaft für Naturkunde in Württemberg danke ich für die Verleihung des Walter-Schall-Preises. Ich danke M. Schnieder, meiner Frau.

#### LITERATUR

- BENNERT, W., LUBIENSKI, M., S. KÖRNER u. M. STEINBERG (2005): Triploidy in *Equisetum* subgenus *Hippochaete* (Equisetaceae, Pteridophyta). – *Annals of Botany*, 95:807–815.
- BIR, S.S. (1960): Chromosome numbers of some *Equisetum* species from the Netherlands. – *Acta Botanica Neerlandica*, 9:224–234.
- BORG, P. (1967): Studies on *Equisetum* hybrids in Fennoscandia. – *Annales Botanici Fennici*, 4:35–50.
- BRUNE, T. (2001): Vergleichende Untersuchungen zur Mikromorphologie und chemischen Zusammensetzung der Cuticularwachse von *Equisetum*-Arten. – unveröffentlichte Diplomarbeit Universität Hohenheim.

- BRUNE, T. (2004): *Equisetum* subgenus *Hippochaete*-Hybriden in Baden-Württemberg – Verbreitung und Häufigkeit. – Jahreshefte der Gesellschaft für Naturkunde Württemberg, 160:123–159.
- CAMACHO, F.J. u. A. LISTON (2001): Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). – American Journal of Botany, 88:1065–1070.
- DAYANANDAN, P. u. P.B. KAUFMANN (1973): Stomata in *Equisetum*. – Canadian Journal of Botany, 51:1555–1564.
- DES MARAIS, D.L., A.R. SMITH, D.M. BRITTON u. K.M. PRYER (2003): Phylogenetic relationships and evolution of extant horsetails, *Equisetum*, based on chloroplast DNA sequence data (*rbcL* and *trnL-F*). – International Journal of Plant Sciences, 164:737–751.
- DINES, T.D. u. I.R. BONNER (2002): A new hybrid horsetail, *Equisetum arvense* × *E. telmateia* (*E. × robertsii*) in Britain. – Watsonia, 24:145–157.
- DOSTÁL, J. (1984): Sphenopsida. – In: Hegi, G. (Hrsg.) Flora von Mitteleuropa, Bd. 1 Pteridophyta, Teil 1. 3. Aufl., Parey, Berlin.
- DUCKETT, J.G. (1973): Comparative morphology of the gametophytes of *Equisetum* subgenus *Equisetum*. – Botanical Journal of the Linnean Society, 66:1–22.
- DUCKETT, J.G. (1979a): Comparative morphology of the gametophytes of *Equisetum* subgenus *Hippochaete* and the sexual behaviour of *Equisetum ramosissimum* subsp. *debile*, (Roxb.) Hauke, *Equisetum hyemale* var. *affine* (Engelm.) A.A., and *Equisetum laevigatum* A. Br. – Botanical Journal of the Linnean Society, 79:179–203.
- DUCKETT, J.G. (1979b): An experimental study of the reproductive biology and hybridization in the European and North American species of *Equisetum*. – Botanical Journal of the Linnean Society, 79:205–229.
- ESCHELMÜLLER, A. u. F. HIEMEYER (1987): Der Süd-Schachtelhalm (*Equisetum* × *meridionale*) erstmals in der Bundesrepublik Deutschland festgestellt. – Berichte des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schwaben e.V., 91:16–19.
- FREITAS, H. u. A. BREHM (2001): Genetic diversity of the macaronesian leafy liverwort *Porella canariensis* inferred from RAPD markers. – Journal of Heredity, 92:339–345.
- GARCKE, A. (1972): Illustrierte Flora. Deutschland und angrenzende Gebiete. Von Weihe, K. (Hrsg.). 23. Aufl., Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- GUILLON, J.-M. (2004): Phylogeny of horsetails (*Equisetum*) based on the chloroplast *rps4* gene and adjacent noncoding sequences. – Systematic Botany, 29:251–259.
- HAUKE, R.L. (1963): A taxonomic monograph of the genus *Equisetum* subgenus *Hippochaete*. – Beihefte zur Nova Hedwigia 8.
- HAUKE, R.L. (1965): An analysis of a variable population of *E. arvense* and *E. × litorale*. – American Fern Journal, 55:123–135.
- HAUKE, R.L. (1978): A taxonomic monograph of *Equisetum* subgenus *Equisetum*. – Nova Hedwigia, 30:385–455.
- HROUDA, L. u. F. KRAHULEC (1982): Taxonomic and ecological analysis of the occurrence of *Hippochaete* species and hybrids (Equisetaceae). – Preslia, 54:19–43.
- KORPELAINEN, H. u. M. KOLKALA (1996): Genetic diversity and population structure in the outcrossing populations of *Equisetum arvense* and *E. hyemale* (Equisetaceae). – American Journal of Botany, 83:58–62.

- KRAHULEC, F., L. HROUDA u. M. KOVÁROVÁ (1996): Production of gametophytes by *Hippochaete* (Equisetaceae) hybrids. – *Preslia*, 67:213–218.
- KÜMMERLE, J.B. (1931): Equiseten-Bastarde als verkannte Artformen. – *Magyar botanikai lapok*, 30, 146–160.
- LAU, C.P.Y., L. RAMSDEN u. R.M.K. SAUNDERS (2005): Hybrid origin of „*Bauhinia blakeana*“ (Leguminosae: Caesalpinioideae), inferred using morphological, reproductive, and molecular data. – *American Journal of Botany*, 92:525–533.
- LUERSSEN, C. (1889): Die Farnpflanzen. – In: GRUNOW, A., FISCHER A., HAUCK, F., LIMPRICHT G., LUERSSEN C., MIGULA, W., REHM H., P. RICHTER u. G. WINTER (Hrg.), Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Kummer, Leipzig.
- MACHON, N., GUILLON, J.-M., DOBIGNY, G., S. LE CADRE u. J. MORET (2001): Genetic variation in the horsetail *Equisetum variegatum* Schleich., an endangered species in the Parisian region. – *Biodiversity and Conservation*, 10:1543–1554.
- MANTON, I. (1950): Problems of cytology and evolution in the pteridophyta. At the University Press, Cambridge.
- MILDE, J. (1867): Monographia Equisetorum. – *Verhandlungen der Kaiserlichen Leopoldino-Carolinischen deutschen Akademie der Naturforscher*, 32:1–605.
- MURPHY, R.W., SITES, J.W., D.G. BUTH u. C.H. HAUFLER (1996): Proteins: isozyme electrophoresis. 51–20. – In: HILLIS, D.M., C. MORITZ u. B.K. MABLE (Hrsg.): *Molecular Systematics*. 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland.
- OBERMAYER, R., LEITCH, I.J., L. HANSON u. M.D. BENNETT (2002): Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in pteridophytes. – *Annals of Botany*, 90:209–217.
- OGURA, Y. (1972): Comparative anatomy of vegetative organs of the pteridophytes. – *Handbuch der Pflanzenanatomie Band 7, Teil 3*. Bornträger, Berlin, Stuttgart.
- PAEGER, J., U. HECKMANN u. H.W. BENNERT (1989): Erste populationsökologische Studien mit Hilfe der Isoenzymelektrophorese bei einheimischen Farnpflanzen (Pteridophyta). – *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 18:711–717.
- PAGE, C. N. (1972): An assessment of inter-specific relationships in *Equisetum* subgenus *Equisetum*. – *New Phytologist*, 71:355–369.
- PAGE, C. N. (1997): *The ferns of Britain and Ireland*. 2nd edition. University Press, Cambridge.
- PRYER, K.M., SCHUETTELPELZ, E., WOLF, P.G., SCHNEIDER, H., A.R. SMITH u. R. CRANFILL (2004): Phylogeny and evolution of ferns (Monilophytes) with a focus on the early leptosporangiate divergences. – *American Journal of Botany*, 91:1582–1598.
- RASMUSSEN, E. (1992): *Clustering Algorithms*. – In: FRAKES, W. B. u. BAEZA-YATES, R. (Hrsg.): *Information Retrieval: Data Structures and Algorithms*. Prentice Hall.
- ROTHMALER, W. (1944): Pteridophyten-Studien I. – *Feddes Repertorium*, 54:55–82.
- ROTHMALER, W. (1990): *Exkursionsflora von Deutschland*. Band 4. Kritischer Band. SCHUBERT, R. und VENT, W. (Hrg.) 8. Aufl. Volk und Wissen, Berlin.
- SALEH, N.A.M., W. MAJAK u. G.H.N. TOWERS (1972): Flavonoids of *Equisetum* species. – *Phytochemistry*, 11:1095–1099.
- SCHAFFNER, J.H. (1925): Main lines of Evolution in *Equisetum*. – *American Fern Journal*, 15:8–12, 35–39.

- SCHNELLER, J., HOLDEREGGER, R., GUGERLI, F., K. EICHENBERGER u. E. LUTZ (1998): Patterns of genetic variation detected by RAPDs suggest a single origin with subsequent mutations and long-distance dispersal in the apomictic fern *Dryopteris remota* (Dryopteridaceae). – American Journal of Botany, 85:1038–1042.
- SEBALD, O., S. SEYBOLD u. G. PHILIPPI (Hrsg.) (1990): Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. Bd.1; Eugen Ulmer, Stuttgart.
- SNEATH, P.H.A. u. R.R. SOKAL (1973): Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co, San Francisco.
- SOLTIS, D.E. (1986): Genetic evidence for diploidy in *Equisetum*. – American Journal of Botany, 73:908–913.
- SOLTIS, D.E., P.S. SOLTIS u. R.D. NOYES (1988): An electrophoretic investigation of in-tragametophytic selfing in *Equisetum arvense*. – American Journal of Botany, 75:231–237.
- SPECK, T., SPECK, O., A. EMANNS u. H.-CH. SPATZ (1998): Biomechanics and functional anatomy of hollow-stemmed sphenopsids. III. *Equisetum hyemale*. – Botanica Acta, 111:366–376.
- THOMSON, J.A. (2000): Morphological and Genomic Diversity in the Genus *Pteridium* (Dennstaedtiaceae). – Annals of Botany, 85:77–99.
- TREUTLEIN, J., P. VORSTER u. M. WINK (2005): Molecular relationships in Encephalartos (Zamiaceae, Cycadales) based on nucleotide sequences of nuclear ITS 1&2, rbcL, and genomic ISSR fingerprinting. – Plant Biology, 7:79–90.
- VANDERPOORTEN, A., L. HEDENÄS u. A.-L. JACQUEMART (2003): Differentiation in DNA fingerprinting and morphology among species of the pleurocarpous moss genus, *Rhytidadelphus* (Hylocomiaceae). – Taxon, 52:229–236.
- VEIT, M., BECKERT, C., HOHNE, C., K. BAUER u. H. GEIGER (1995a): Interspecific and Intraspecific Variation of Phenolics in the Genus *Equisetum* Subgenus *Equisetum*. – Phytochemistry, 38:881–891.
- VEIT, M., BAUER, K., BECKERT, C., KAST, B., H. GEIGER u. F.-C. CZYGAN (1995b): Phenolic Characters of British Hybrid Taxa in *Equisetum* Subgenus *Equisetum*. – Biochemical Systematics and Ecology, 23:79–87.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., KENNETH, J.L., J.A. RAFALSKI u. S.V. TINGEY (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. – Nucleic Acids Research, 18:6531–6535.
- WOLFE, A.D., Q.-Y. XIANG u. S.R. KEPHART (1998): Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. – Molecular Ecology, 7:1107–1125.
- XIAO, L., GONG, X., TIAN, B., ZHENG S., G. HAO u. X. GE (2005): Comparison of the genetic diversity in two species of cycads. – Australian Journal of Botany, 53:219–223.
- ZIETKIEWICZ, E., A. RAFALSKI u. D. LABUDA (1994): Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. – Genomics, 20:176–183.

Anschrift des Verfassers:

Dr. THOMAS BRUNE, Hummelwiesenweg 38, 70569 Stuttgart.

E-mail: thobrune@uni-hohenheim.de

**Anhang 1.** Pflanzenmaterial (*Pop* = Population, \*Spross-Querschnitte; *Spr* = Spross, *MTB* = Messtischblatt-Quadrant).

Spezies	Pop	Spr	Datum	MTB	Koord.	Fundort	
<i>E. arvense</i>	EA	Beb	1	21.09.03	7420/1	N48,55924° E09,04700°	(D) Bebenhausen (Tübingen)
<i>E. arvense</i>	EA	Büs	1	05.05.04	7220/2	N48,74994° E09,07443°	(D) Büsnau (Stuttgart)
<i>E. arvense</i>	EA	FrFa	1	22.05.04	(F)	N43,12335° E06,36092°	(F) La Favière (Var, Provence)
<i>E. arvense</i>	EA	*Ktt	1	14.06.04	7220/4	N48,74950° E09,13811°	(D) Kaltental (Stuttgart)
<i>E. arvense</i>	EA	Ktt	2	14.06.04	7220/4	N48,74950° E09,13811°	(D) Kaltental (Stuttgart)
<i>E. arvense</i>	EA	Ktt	3	14.06.04	7220/4	N48,74950° E09,13811°	(D) Kaltental (Stuttgart)
<i>E. fluviatile</i>	EF	Büs	1	28.08.04	7220/3	N48,74236° E09,07391°	(D) Büsnau (Stuttgart)
<i>E. fluviatile</i>	EF	Hoh	1	17.09.03	7221/3	N48,71152° E09,21503°	(D) Hohenheim (Stuttgart)
<i>E. fluviatile</i>	EF	Hoh	2	14.09.04	7221/3	N48,71152° E09,21503°	(D) Hohenheim (Stuttgart)
<i>E. fluviatile</i>	EF	*Hölz	1	15.08.04	7220/3	N48,74933° E09,02061°	(D) Magstadt
<i>E. fluviatile</i>	EF	Hölz	2	15.08.04	7220/3	N48,74933° E09,02061°	(D) Magstadt
<i>E. fluviatile</i>	EF	Irl	1	28.05.04	(IRL)	N51,9554° W09,5836°	(Irl) Killarny National Park, leg. B. Schäfer
<i>E. palustre</i>	EP	Dam	1	28.09.04	7220/2	N48,77129° E09,08446°	(D) Stuttgart
<i>E. palustre</i>	EP	Hölz	1	15.08.04	7220/3	N48,75104° E09,01809°	(D) Magstadt
<i>E. palustre</i>	EP	Wut	1	6.04	8116/4	N47,84000° E08,49328°	(D) Aselfingen (Blumberg), leg. B. Schäfer
<i>E. pratense</i>	EPr	Gies 1	1	24.04.03	8325/1	N47,68899° E09,90901°	(D) Gießen (Argenbühl)
<i>E. pratense</i>	EPr	Gies 2	1	24.04.03	8325/1	N47,69232° E09,91750°	(D) Gießen (Argenbühl)
<i>E. sylvaticum</i>	ES	Bern	1	07.09.03	7220/2	N48,77192° E09,08494°	(D) Stuttgart
<i>E. sylvaticum</i>	ES	Büs	1	05.05.04	7220/2	N48,75075° E09,07110°	(D) Büsnau (Stuttgart)

**Anhang 1.** Forts. Pflanzenmaterial (*Pop* = Population, \*Spross-Querschnitte; *Spr* = Spross, *MTB* = Messtischblatt-Quadrant).

Spezies	Pop	Spr	Datum	MTB	Koord.	Fundort	
<i>E. sylvaticum</i>	ES	Scha	1	22.08.04	7220/4	N48,75675° E09,12212°	(D) Stuttgart
<i>E. sylvaticum</i>	ES	Scha	2	22.08.04	7220/4	N48,75675° E09,12212°	(D) Stuttgart
<i>E. telmateia</i>	ET	Beb	1	21.09.03	7420/1	N48,55924° E09,04747°	(D) Bebenhausen (Tübingen)
<i>E. telmateia</i>	ET	Beb	2	25.04.04	7420/1	N48,55924° E09,04747°	(D) Bebenhausen (Tübingen)
<i>E. telmateia</i>	ET	Kern	1	24.08.04	7222/1	N48,77831° E09,34017°	(D) Stetten (Kernen)
<i>E. telmateia</i>	ET	Kern	2	24.08.04	7222/1	N48,77831° E09,34017°	(D) Stetten (Kernen)
<i>E. telmateia</i>	ET	Kern	3	24.08.04	7222/1	N48,77831° E09,34017°	(D) Stetten (Kernen)
<i>E. telmateia</i>	ET	Rei	1	06.09.04	8320/2	N47,68998° E09,12718°	(D) Reichenau
<i>E. × litorale</i>	ExL	*Wüba 1	1	28.08.03	7616/3	N48,33998° E08,33772°	(D) Wittichen (Schenkenzell)
<i>E. × litorale</i>	ExL	Wüba 1	2	28.08.03	7616/3	N48,33998° E08,33772°	(D) Wittichen (Schenkenzell)
<i>E. × litorale</i>	ExL	Wüba 1	3	28.08.03	7616/3	N48,33998° E08,33772°	(D) Wittichen (Schenkenzell)
<i>E. × litorale</i>	ExL	Wüba 1	4	28.08.03	7616/3	N48,33998° E08,33772°	(D) Wittichen (Schenkenzell)
<i>E. × litorale</i>	ExL	*Wüba 2	3	22.05.03	7616/3	N48,33964° E08,33644°	(D) Wittichen (Schenkenzell)
<i>E. × litorale</i>	ExL	Wüba 2	1	22.05.03	7616/3	N48,33964° E08,33644°	(D) Wittichen (Schenkenzell)
<i>E. hyemale</i>	EH	Bär	1	25.01.04	7220/2	N48,75819° E09,09733°	(D) Stuttgart
<i>E. hyemale</i>	EH	Gstad	1	19.06.04	BAY	N47,88347° O12,41813°	(D) Gstad (Prien)
<i>E. hyemale</i>	EH	*Ktt 1	1	17.02.04	7220/4	N48,74489° E09,13844°	(D) Kaltental (Stuttgart)
<i>E. hyemale</i>	EH	Ktt 1	2	29.07.04	7220/4	N48,74489° E09,13844°	(D) Kaltental (Stuttgart)
<i>E. hyemale</i>	EH	Ktt 2	1	17.10.04	7220/4	N48,74430° E09,14058°	(D) Kaltental (Stuttgart)
<i>E. hyemale</i>	EH	Ktt 2	2	17.10.04	7220/4	N48,74430° E09,14058°	(D) Kaltental (Stuttgart)

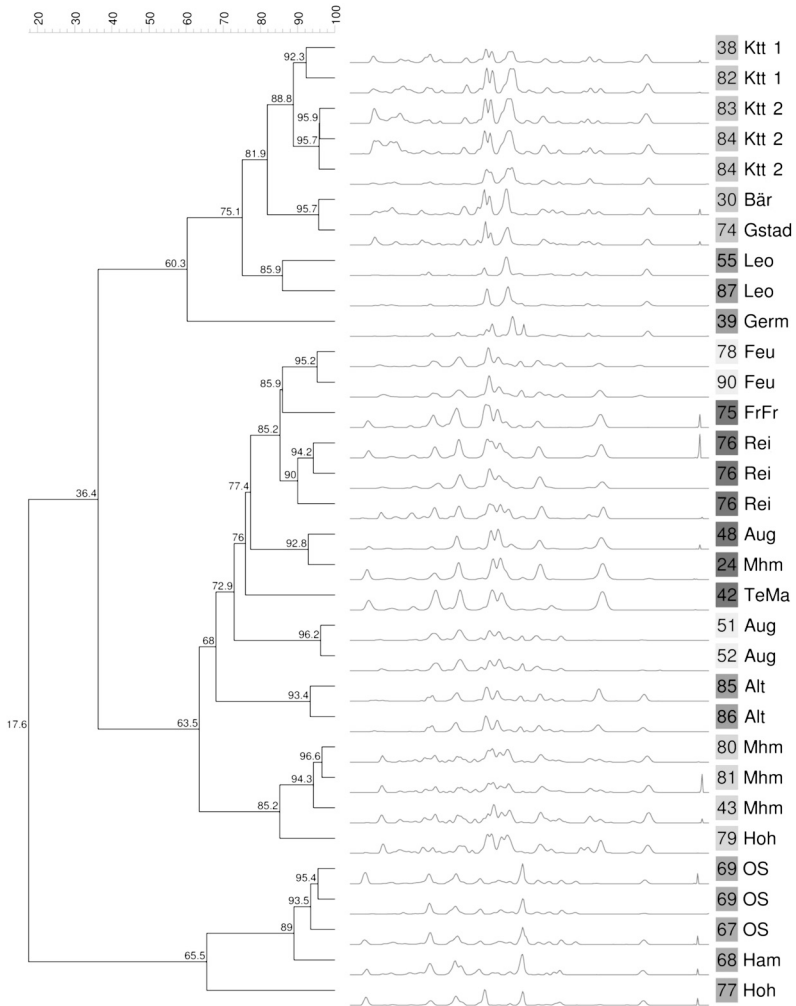
**Anhang 1.** Forts. Pflanzenmaterial (*Pop* = Population, \*Spross-Querschnitte; *Spr* = Spross, *MTB* = Messtischblatt-Quadrant).

Spezies	Pop	Spr	Datum	MTB	Koord.	Fundort	
<i>E. ramosissimum</i>	ER	Ach	1	03.07.03	7911/2	N48,06179° E07,60860°	(D) Achkarren (Vogtsburg i. K.)
<i>E. ramosissimum</i>	ER	Aug	1	20.06.04	7631/3	N48,33378° E10,91005°	(D) Augsburg
<i>E. ramosissimum</i>	ER	FrFr	1	17.05.04	(F)	N43,46002° E06,74265°	(F) N Frejus (Provence)
<i>E. ramosissimum</i>	ER	Mhm	2	01.07.03	6517/3	N49,42268° E08,51797°	(D) Mannheim- Rheinau
<i>E. ramosissimum</i>	ER	Mhm	1	01.07.03	6517/3	N49,42268° E08,51797°	(D) Mannheim- Rheinau
<i>E. ramosissimum</i>	ER	*Rei	1	06.09.04	8320/2	N47,68854° E09,13270°	(D) Reichenau
<i>E. ramosissimum</i>	ER	TeMa	1	15.10.03	(S)	N28,2940° W16,8480°	(S) Masca (Teneriffa)
<i>E. variegatum</i>	EV	Bain	1	24.04.03	8123/4	N47,83714° E09,66297°	(D) Baidt (Ravensburg)
<i>E. variegatum</i>	EV	Ham	1	10.10.04	HH	-	(D) Hamburg, kultiv. M. Schmid
<i>E. variegatum</i>	EV	*Hoh	1	13.09.04	-	-	(D) System Hohen- heim, kultiv., Herkunft unbe- kannt
<i>E. variegatum</i>	EV	*OS	3	20.06.04	8224/3	N47,7340° E09,7198°	(D) Waldburg, kultiv. R. Böcker
<i>E. variegatum</i>	EV	OS	1	10.10.04	8224/3	N47,7340° E09,7198°	(D) Waldburg, kultiv. R. Böcker
<i>E. variegatum</i>	EV	OS	2	10.10.04	8224/3	N47,7340° E09,7198°	(D) Waldburg, kultiv. R. Böcker
<i>E. x meridionale</i>	ExD	*Aug	1	20.06.04	7631/3	N48,33378° E10,91005°	(D) Augsburg
<i>E. x meridionale</i>	ExD	Aug	2	20.06.04	7631/3	N48,33378° E10,91005°	(D) Augsburg
<i>E. x meridionale</i>	ExD	*Feu	1	06.09.04	8317/1	N47,69347° E08,64652°	(CH) Feuerthalen (Kt. Zürich)
<i>E. x meridionale</i>	ExD	Feu	2	06.09.04	8317/1	N47,69347° E08,64652°	(CH) Feuerthalen (Kt. Zürich)
<i>E. x moorei</i>	ExMo	*Hoh	1	13.09.04	-	-	(D) System Hohen- heim, kultiv., Herkunft unbe- kannt



**Anhang 1.** Forts. Pflanzenmaterial (*Pop* = Population, \*Spross-Querschnitte; *Spr* = Spross, *MTB* = Messtischblatt-Quadrant).

Spezies	Pop	Spr	Datum	MTB	Koord.	Fundort
<i>E. × moorei</i> ExMo	*Mhm	1	01.07.03	6517/3	N49,42279° Eo8,51701°	(D) Mannheim-Rheinau
<i>E. × moorei</i> ExMo	Mhm	2	06.10.04	6517/3	N49,42279° Eo8,51701°	(D) Mannheim-Rheinau
<i>E. × moorei</i> ExMo	Mhm	3	06.10.04	6517/3	N49,42279° Eo8,51701°	(D) Mannheim-Rheinau
<i>E. × trachyodon</i> ExTr	*Alt	1	06.10.04	8317/4	N47,64900° Eo8,61564°	(D) Altenburg (Jestetten)
<i>E. × trachyodon</i> ExTr	Alt	2	06.10.04	8317/4	N47,64900° Eo8,61564°	(D) Altenburg (Jestetten)
<i>E. × trachyodon</i> ExTr	*Leo	1	24.07.04	6816/3	N49,11061° Eo8,39809°	(D) Leopoldshafen (Eggenstein-L.)
<i>E. × trachyodon</i> ExTr	Leo	2	24.07.04	6816/3	N49,11061° Eo8,39809°	(D) Leopoldshafen (Eggenstein-L.)
<i>E. × trachyodon</i> ExTr	Germ	1	28.01.04	6816/3	Eo8,3510° N49,1305°	(D) Leimersheim (Germersheim) leg. A. Schmidt-Lebuhn



*Hippochaete* EH ER EV ExD ExMo ExTr

**Anhang 2.** Beispiel einer Clusteranalyse der ISSR-Fingerprinting-Muster auf Basis densitometrischer Kurven (re.). Primer (CAC)<sub>4</sub>RC – Untergattung *Hippochaete*, Pearson-Korrelation. Dendrogramm UPGMA (Ähnlichkeitswerte in %). Populationen siehe Anhang 1.