

DNA-Bildzytometrische Bestimmung der Ploidie bei Vertretern der *Dryopteris affinis*-Gruppe

ANTON BÄR & MATTHIAS BÄR

Zusammenfassung: Die sichere Bestimmung von Sippen aus dem *Dryopteris affinis*-Komplex erfordert sehr oft die Messung des Ploidiegrades entweder durch eine aufwändige Chromosomenzählung oder Messung des Kern-DNA-Gehaltes, in der Regel mittels eines Flowzytometers. Dieses steht den Botanikern besonders im „citizen science“-Bereich meist nur eingeschränkt zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit zur Messung des DNA-Gehaltes ist die Bild-Zytometrie nach Färbung mit dem sogenannten Schiffschens Reagenz (Feulgen-Färbung). Diese Methode wurde von uns so modifiziert, dass es unter Verwendung der unteren Epidermen von Wedel-Fiederabschnitten möglich ist, den DNA-Gehalt quantitativ zu messen. Proben von Wedelmaterial stehen während der gesamten Vegetationsperiode zur Verfügung. Nach der Fixierung des Untersuchungsmaterials können bis zur Analyse die Proben in Ethanol 96 % unter Tiefkühl-Bedingungen über Jahre aufbewahrt werden. Als Vergleichsmaterial dienen durch Chromosomenzählung sicher bestimmte Pflanzen aus dem *D. affinis*-Komplex. Störende Substanzen im Untersuchungsmaterial, die zur Mitfärbung von Zellwänden und Zytosol der Parenchym- und Epidermiszellen führen, verursachen eine breitere Streuung der Messwerte, die aber trotzdem eine ausreichende Genauigkeit für die Bestimmung des Ploidiegrades aufweisen. Für eine genaue Massebestimmung der DNA sollte die Methode der Flowzytometrie verwendet werden.

Key Words: DNA image-cytometry, Feulgen staining, Schiff's reagent, *Dryopteris affinis*-complex, genome size, ploidy level

Summary: The reliable determination of specimens from the *Dryopteris affinis*-complex very often requires the measurement of the ploidy levels either by elaborate chromosome counts or measurement of the nuclear DNA-content, usually by flow cytometry. This is available to most botanists to a limited extent only, especially in the "citizen science" sector. Another possibility to estimate the nuclear DNA-content is DNA image-cytometry after staining with the so-called Schiff's reagent (Feulgen staining). This method is here modified in a way that allows to measure the amount of DNA quantitatively using the lower epidermis of pinnules of fronds. Samples of frond material are available throughout the growing season. After fixation of the material, the samples can be stored in Ethanol 96% under deep-freeze conditions for years until analysis. Plants from the *D. affinis*-complex, reliably determined by chromosome counting, served as reference. Interfering substances in the test material, which lead to the simultaneous staining of the cell walls and cytosol of parenchyma and epidermis cells, cause a broader standard deviation of the measured values, but the method nevertheless shows sufficient accuracy for the determination of the ploidy level. For an accurate mass determination of the DNA, flow cytometry should be used.

Anschriften der Autoren: Dr. Anton Bär, Lohengrinstraße 17, 91126 Schwabach; Matthias Bär, Lehrstuhl für Hochfrequenztechnik (LHFT), Member of Erlangen Graduate School in Advanced Optical Technologies (SAOT), Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Cauerstr. 9, 91058 Erlangen. Korrespondenz: Dr. Anton Bär: e-mail: anton.baer@t-online.de

1 Einleitung

Als die Methode zur spezifischen Färbung des Zellkerns im Jahr 1924 von R. Feulgen und H. Rossenbeck unter dem Begriff „Nuclealreaktion“ publiziert wurde, konnten sie die Bedeutung ihrer Methode bestenfalls ahnen (FEULGEN & ROSSENBECK 1924). Sie hat in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts mit der Verfügbarkeit von Geräten zur quantitativen, mikroskopischen Messung der DNA-Gehalte (Photometrische Zytometrie) weitere Bedeutung erlangt. Mit dem Aufkommen der digitalen Mikrofotografie in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde diese mikrophoto-metrische Methode durch ein densitometrisches Bildanalyseverfahren (DNA-Bild-zytometrie) abgelöst. Dabei wird aus den Grauwerten der Pixel eines Zellkerns deren „optische Dichte“ (OD) errechnet und zur „integrierten optischen Dichte“ (IOD) aufsummiert.

Die heute am meisten verwendete Methode zur quantitativen DNS-Bestimmung ist die Flowzytometrie, die jedoch eines erheblichen technischen und finanziellen Aufwandes und eines spezialisierten Labors bedarf. Trotz deren häufiger Anwendung spielt die DNA-Bildzytometrie immer noch eine Rolle sowohl in der Botanik und Zoologie als auch in der Pathologie, wo sie teilweise bis heute insbesondere für die Diagnose und die Beurteilung der Malignität solider Tumoren verwendet wird. Aus diesem Bereich stammen entsprechende standardisierte Methoden und Qualitätsstandards (BÖCKING 1990; HAROSKE et al. 1998). Sie wurden an die Gegebenheiten in der Botanik angepasst (VILHAR et al. 2001; VILHAR & DERMASTIA 2002).

Der *Dryopteris affinis*-Komplex in Bayern

Die Systematik des *Dryopteris affinis*-Komplexes erfuhr in den vergangenen Jahrzehnten mehrfache Überarbeitungen: u. a. im Hegi 1984 durch FRASER-JENKINS & REICHSTEIN (1984), durch FRASER-JENKINS (1987, 1996, 2007). Seit 2007 wurden auch zwei ergänzende Neubeschreibungen im Artrang (JESSEN et al. 2011) und Unterartrang (CHURCH et al. 2019) veröffentlicht. Diese fanden auch Eingang in die Florenwerke (JESSEN 2017, SELL & MURRELL 2018).

Die Bearbeitung der Gruppe in Bayern, Baden-Württemberg und auch angrenzenden Gebieten von Österreich erfolgte seit den 1970er Jahren insbesondere durch A. Eschelmüller und A. Bär (z. B. ESCHELMÜLLER 1972, 1985; BÄR & ESCHELMÜLLER 1984, 1985, 1986, 2006, 2007, 2010, 2014; ESCHELMÜLLER, A. & ESCHELMÜLLER, H. 1996; RASBACH et al. 1983; ZAHLHEIMER 2002; FREIGANG & ZENNER 2007). Die derzeit gültige Sippenaufteilung der auf dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland vorkommenden Arten und Unterarten ist in Tab. 1 dargestellt.

Für Bayern sind bis jetzt 12 Arten und Unterarten einschließlich deren Hybriden mit *D. filix-mas* nachgewiesen worden (s. Tab. 1). Dazu ist noch anzumerken, dass bei *D. affinis* subsp. *affinis* die Variationen „*affinis*“ (sog. „atlantische Form“) und „*disjuncta*“ von FRASER-JENKINS (2007) nicht mehr unterschieden wurden. Im „Rothmaler: Exkursionsflora von Deutschland“ werden sie von S. Jeßen weiterhin aufgeführt (JESSEN 2017). Auch bei *D. borrieri* wird von Fraser-Jenkins die var. *robusta* nicht mehr anerkannt. Die Aufteilung der Variationen wird hier jedoch zu informellen Zwecken beibehalten.

Tab. 1: Übersicht der zum *Dryopteris affinis*-Komplex gehörenden Sippen, welche bisher für das Gebiet der Bundesrepublik Deutschland nachgewiesen wurden. Die Einteilung und Benennung der Sippen folgen FRASER-JENKINS (2007) sowie JESSEN (2017).

Dryopteris affinis*-Gruppe (-Komplex), *Dryopteris affinis* agg., *Dryopteris affinis sensu lato

Diploide Sippen

***D. affinis* (Lowe) Fraser-Jenk. *sensu stricto* (= Diploide Sippen)**

D. affinis subsp. *affinis* var. *affinis*

D. affinis subsp. *affinis* var. *disjuncta* (Fomin) Fraser-Jenk.

D. affinis subsp. *punctata* Fraser-Jenk.

Triploide Sippen

D. borrieri (Newman) Oberh. et Tavel

D. cambrensis (Fraser-Jenk.) Beitel et W. Buck

D. cambrensis subsp. *cambrensis*

D. cambrensis subsp. *insubrica* (Fraser-Jenk.) Fraser-Jenk.

D. lacunosa S. Jess., Zenner, Chr. Stark & Bujnoch

D. pseudodisjuncta (Fraser-Jenk.) Fraser-Jenk.

Hybriden mit *Dryopteris filix-mas*

Tetraploide Hybriden

D. × complexa Fraser-Jenk. nothosubsp. *complexa*

(= *D. filix-mas* × *D. affinis* subsp. *affinis*)

D. × complexa Fraser-Jenk. nothosubsp. *eschelmulleri* Fraser-Jenk.

(= *D. filix-mas* × *D. affinis* subsp. *punctata*)

Pentaploide Hybriden

D. × complanata Fraser-Jenk. (= *D. filix-mas* × *D. pseudodisjuncta*)

D. × convoluta Fraser-Jenk. nothosubsp. *convoluta*

(= *D. filix-mas* × *D. cambrensis* subsp. *insubrica*)

D. × critica (Fraser-Jenk.) Fraser-Jenk. (= *D. filix-mas* × *D. borrieri*)

Tab. 2: DNA-Gehalte der Taxa der *D. affinis*-Gruppe und von *D. filix-mas* (BÄR et al. 2020). Flowcytometer-Messungen von Dr. Jörg Fuchs, Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben.

Taxon	Ploidie/Chromosomenzahl	Anzahl	DNA-Gehalt [pg]	CV [%]
<i>D. affinis</i> ssp. <i>affinis</i> <i>D. affinis</i> s. str.	$2n = 2x = 82$	4	$16,67 \pm 0,2$	1,2
<i>D. borrieri</i>	$2n = 3x = 123$	11	$24,73 \pm 0,3$	1,2
<i>D. cambrensis</i> ssp. <i>insubrica</i>	$2n = 3x = 123$	1	24,42	
<i>D. lacunosa</i>	$2n = 3x = 123$	3	$24,84 \pm 0,1$	0,4
<i>D. affinis</i> s. l. („Rehberger Typ“)	$2n = 4x = 164$	7	$32,38 \pm 0,4$	1,2
<i>D. × complexa</i> nssp. <i>complexa</i>	$2n = 4x = 164$	1	32,47	
<i>D. × critica</i>	$2n = 5x = 205$	1	40,16	
<i>D. filix-mas</i>	$2n = 4x = 164$	2	$32,05 \pm 0,4$	1,2

Die Arten des *D. affinis*-Komplexes vermehren sich im Gegensatz zu den meisten Arten der Gattung *Dryopteris* apomiktisch, bzw. agamospor. (MANTON 1950; SCHNELLER 1974, 1975; TILQUIN 1981) Die aus Diplosporen aufwachsenden Prothallien bilden zwar Antheridien aus, aber keine Archegonien. So können die Arten des *D. affinis*-Komplexes als männliche Geschlechtspartner für Kreuzungen mit *D. filix-mas* fungieren und die entsprechenden Hybriden bilden. Die neuen Sporophyten entwickeln sich aus einer vegetativen Zelle des Prothalliums. Für eine kurze Zusammenfassung über die genomischen Zusammenhänge des *D. affinis*-Komplexes siehe BÄR et al. (2020).

Aufgrund einer ausgeprägten Variabilität in den Merkmalen sind Abgrenzungen zwischen den Arten und Unterarten oft schwierig und benötigen neben makromorphologischen Merkmalen immer auch mikromorphologische Untersuchungen (Sporen und Stomata) und zur Sicherung der Bestimmung u. U. den Nachweis des Ploidiegrades bzw. der Chromosomenzahl. Bei der hohen Zahl an Chromosomen im *D. affinis*-Komplex sind Zählungen zeitlich sehr aufwändig und benötigen ein im Wachstum befindliches Gewebe, z. B. Wurzelspitzen für Mitosen oder Sporangien mit Sporenmutterzellen in Meiose. Die Sammelzeiten vor allem für Erstere sind zeitlich sehr begrenzt.

Der Generationswechsel und die Genomgrößen in der Gattung *Dryopteris* sind seit langem wiederholt erforscht und untersucht worden durch Chromosomenuntersuchungen (DÖPP 1932, 1939; MANTON 1939, 1950; GIBBY 1985; RASBACH et al. 1983; SCHNELLER 1975) und Flowzytometrie (EKRT et al. 2009; Jörg Fuchs in BÄR et al. 2020).

Die Grundzahl bei der Gattung *Dryopteris* ist $n=x=41$. Speziell im *Dryopteris affinis*-Komplex ist der Schluss von der Genomgröße auf die Chromosomenzahl bzw. Ploidie gerechtfertigt (HENRY et al. 2014). Bezüglich der Verwendung der Begriffe „genome size“, C-Wert bzw. Cx-Wert siehe GREILHUBER et al. (2005), GREILHUBER & DOLEZEL (2009), SUDA et al. (2006). Auch für viele weitere Artenkomplexe (z.B. in den Gattungen *Hieracium*, *Pilosella*, *Sorbus*, *Amelanchier*, u. a.) spielt der Ploidiegrad eine wichtige Rolle, der entweder durch eine Chromosomenzählung oder heutzutage meist durch eine flowzytometrische Bestimmung ermittelt werden kann.

DNA-Bildzytometrie

Zur Bedeutung der Flowzytometrie, der Photometrischen Zytometrie und der Bildzytometrie sind zahlreiche Publikationen erschienen (z. B. VILHAR et al. 2001; VILHAR & DERMASTIA 2002; GREILHUBER & TEMSCH 2001). In der Flowzytometrie ist man auf eine teure apparative Laboreinrichtung angewiesen, die Botanikern oft nur eingeschränkt oder gar nicht zur Verfügung steht. Wir haben deshalb versucht, zur Ploidiebestimmung die DNA-Bildzytometrie nach Feulgen-Färbung im „citizen-science“-Bereich, speziell für den *Dryopteris-affinis*-Komplex, so zu entwickeln, dass sie die Flowzytometrie und die Chromosomenzählung ersetzen kann. Seit die Digitalfotografie verfügbar ist, hat sie die Mikrodensitometrie technisch sogar vereinfacht. Eine digitale Mikroskopkamera und eine Software zur Auswertung der aufgenommenen Bilder sollte eine densitometrische Messung ermöglichen, worüber wir nachfolgend berichten.

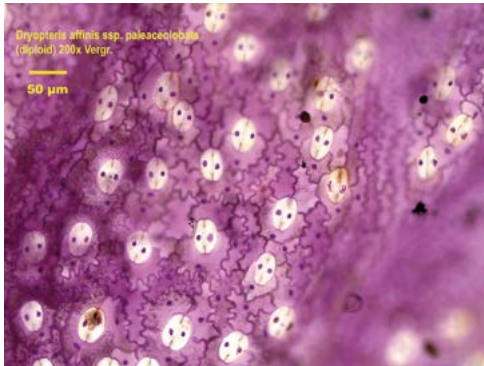


Abb. 1: Nach Feulgen gefärbtes Präparat der unteren Epidermis mit Schließzellen. Die Zellwände der Epidermis- und Blattparenchymzellen färben sich unspezifisch, nicht aber die der Schließzellen. Diese können, wenn sie nicht mit Parenchymzellen überlagert sind, somit gut densitometrisch gemessen werden. Schließzellen, die „verschattet“ sind, werden von der Messung ausgeschlossen.

2 Methoden

Die Feulgen-Reaktion

Bei der Feulgen-Färbung findet eine spezifische und stöchiometrische Reaktion der Desoxyribose mit durch Sulfit entfärbtem Pararosanilin, dem sogenannten Schiff's Reagenz statt (RIS & MIRSKY 1949). Zuvor werden mittels Salzsäure-Hydrolyse Purinbasen der DNA von der Desoxyribose abgespalten unter Bildung von Aldehydgruppen an der Desoxyribose. Diese reagieren mit Schiff's Reagenz unter Bildung einer rot gefärbten Schiffschen Base.

Untersuchungsmaterial

Als geeignetes Material für die Feulgenfärbung können Wurzelspitzen und andere Gewebe verwendet werden. Vorteilhaft wären Pflanzenteile, die in der gesamten Vegetationsperiode leicht zugänglich sind und wie hier im Fall des *Dryopteris affinis*-Komplexes für mikromorphologische Untersuchungen gesammelt werden können. Beim *Dryopteris affinis*-Komplex wird zur Messung der Stomatagröße die untere Blattepidermis präpariert, die jederzeit auch für eine Feulgen-Färbung verfügbar ist. Vorversuche haben gezeigt, dass insbesondere in den Schließzellen eine Messung der DNA der Kerne möglich ist.

Reagenzien

Formalin 4 %, gepuffert auf pH 7,4 mit Phosphatpuffer nach Sørensen, plus 0,1 % Triton X-100 zur Fixierung wurde modifiziert nach GREILHUBER & TEMSCH (2001).

Schiff's Reagenz und die Kaliummetabisulfit-Spüllösung wurden nach MÜLLER (1966) hergestellt.

Schiff's Reagenz: 0,5 g Pararosanilin in 15 ml 1 mol/l HCl ohne Erwärmen lösen; 0,5 g Kaliummetabisulfit ($K_2S_2O_5$) in 85 ml Aqua dest. lösen und zusetzen (auch Natriummetabisulfit ist geeignet); nach 24 Std filtrieren; im Dunkeln aufbewahren.

Kaliumdisulfit-Spüllösung: Kaliummetabisulfit-Stammlsg. 10 % 5 ml; Aqua dest. 90 ml; Salzsäure 1 mol/l 5 ml. Nur frisch hergestellte Spüllösung verwenden.

Fixierung und Färbung (GREILHUBER & TEMSCH 2001)

Feulgen-Methode für Prothallien, junge Sporophyten und für untere Epidermen von *Dryopteris filix-mas* und *D. affinis*-Arten.

Fixierung und Färbung nach Feulgen wurden mit wenigen Anpassungen nach den Angaben von GREILHUBER & TEMSCH (2001) durchgeführt. Beide Autoren haben grundlegende Versuchsprotokolle für die Anwendung bei Pflanzen publiziert. Bis zu sechs Proben einschließlich der Vergleichsstandards durchlaufen parallel den Fixierungs- und Färbeprozess. Zunächst muss die untere Epidermis eines Fiederabschnittes aller Proben abgelöst werden. Während der Zeit bis zur Fixierung werden sie in eiskaltem Wasser aufbewahrt (ca. 1 Stunde). Die Kofixierung aller Proben eines Versuchs ist dringend zu empfehlen. Für alle Wässerungsschritte sollte abgekochtes und wieder erkaltetes Wasser verwendet werden, damit die Epidermen eingetaucht bleiben und nicht durch feinste Gasbläschen an der Oberfläche schwimmen. Alternativ kann auch zu 5 ml Wasser 1 Tr. Benzalkoniumchlorid 1 % zugegeben werden, um das Eintauchen der Proben zu gewährleisten. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass die Tenside (z. B. Benzalkoniumchlorid, Triton X-100, Polysorbate) mit 5 mol/l Salzsäure inkompatibel sind und nach einigen Stunden zu Ausfällungen führen.

Nachfolgend sind alle Reaktionsschritte für die Feulgen-Färbung chronologisch aufgeführt.

Fixierung:

- Formalin 4 % pH 7,4
Triton X-100 0,1 % 2 h, 4°C
- Waschen in Wasser
(1x wechseln der Flüssigkeit) 30 min, Raumtemperatur (RT)
- 2x Waschen und Fixieren in
Ethanol abs. – Eisessig 3+1, 2x 30 min, RT
- bei sofortiger Weiterverwendung,
waschen in Wasser, 10 min, RT
sonst
- Aufbewahren in EtOH 96 % -20°C
- Vor der Salzsäure-Hydrolyse wird in EtOH 96 %
aufbewahrtes Material in Wasser gewaschen 10 min, RT

Hydrolyse:

- 5 mol/l HCl 10 h, 2° oder 4°C

Auswaschen der Salzsäure:

- Waschen in Wasser 10 min, RT

Färbung:

- Schiffs Reagenz 60 min, RT, Lichtschutz
oder 10 h, 2° oder 4°C

Auswaschen mit Sulfit-Spüllösung:

- 3x Waschen in Sulfit-Spüllösung, je 15 min

Entwässern:

- Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) je 2 min

Eindeckung:

- Euparal

Bild-zytometrische Messung

Die Objekte sollten zeitnah (spätestens 1-2 Wochen) nach der Präparation densitometrisch vermessen werden (GREILHUBER et al. 1999).

Dies erfolgte mit einem Leica DM 2500 Mikroskop bei 630-facher Vergrößerung. Es wurden digitale Aufnahmen im tif-Format mit einer Leica EC3 CMOS-Kamera und der Leica LAS-EZ Software gemacht.

Einstellungen am Mikroskop

Die Beleuchtung wird ca. 90 Min vor Beginn der Messung eingeschaltet, damit das System thermisch stabil ist. Die Auflösung wird durch die Einstellung der Köhler-Beleuchtung optimiert.

Der Helligkeitsregler wird in die nach der Erfahrung benötigte Position gebracht (s. auch den folgenden Absatz).

Einstellungen in der Aufnahme-Software (Leica LAS EZ)

In der Aufnahme-Software wird die Einstellung „Manuell“ gewählt, damit keine automatischen Veränderungen an der Einstellung während des Messvorganges vorgenommen werden (Kamerasteuerung auf Manuell (M); Belichtungszeit: 20-40 ms; Verstärkung: 1,5-2,0; Gamma: 1,00; Sättigung: 100 %). Das Präparat wird eingelegt und eine Position außerhalb des Objektes gewählt. Nachdem ein Weißabgleich durchgeführt wurde, wird ein Grünfilter (560-590 nm) eingelegt und eine „Leeraufnahme“ von Objekträger mit Deckglas aber ohne Objekt im Strahlengang gemacht.

Von dieser Aufnahme wird nun mit der Fiji Software (= ImageJ, Version 2.1.0, 2.8.2020; kostenfrei) (<https://imagej.net/Fiji>) ein Histogramm der Verteilung der Helligkeitswerte in den RGB-Kanälen erstellt und diejenige im Grünkanal geprüft. Die Verteilung der Werte im Grünkanal sollte im oberen Bereich, zwischen 220 und 255 liegen (s. Abb. 2). Sollte das nicht der Fall sein, kann mit der Helligkeitseinstellung am Mikroskop und mit der Verstärkung und der Belichtungszeit in der Aufnahme-Software (LAS EZ) nachjustiert werden. Wird die Helligkeit am Mikroskop verändert, beginnt man wieder mit dem Weißabgleich, usw.

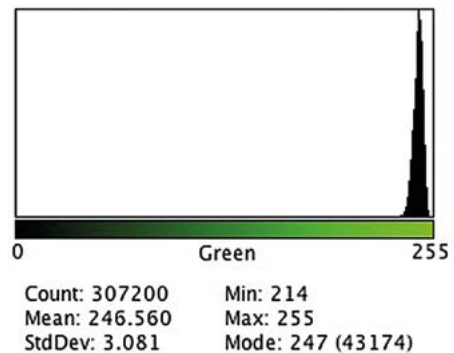


Abb. 2: Histogramm des Grünkanals einer Leeraufnahme.

Die Einstellungen am Mikroskop und in der Aufnahme-Software dürfen während der gesamten Messdauer nicht mehr verändert werden!

Messung der Integrierten Optischen Dichte (IOD) der Zellkerne mit dem MATLAB-Programm

Die Messungen erfolgen durch eine densitometrische Auswertung von digitalen Aufnahmen bei 630-facher Vergrößerung mit einem Leica N Plan Luft-Objektiv 63x, N.A. 0,80. Nur normal aussehende Zellkerne von Stomatazellen werden

zur Messung ausgewählt und müssen scharf fokussiert sein. Wenn darunterliegende Parenchymzellen die Stomatazellen „verschatten“, werden diese Kerne nicht gemessen.

Zur Berechnung der IOD der Zellkerne wurde ein eigenes Programm von M. Bär in der Programmiersprache MATLAB (R2017b, 9.3.0) (<https://de.mathworks.com/products/matlab-online.html>; zuletzt besucht 1.2.2021) entwickelt, mit dessen Hilfe die zu messenden Zellkerne in einer digitalen Aufnahme ausgewählt, die IODs berechnet und in Tabellenform in eine Datei geschrieben werden.

Das Messprinzip und die Berechnung sind in Reviews von HARDIE et al. (2002), GREILHUBER (2008) und VILHAR & DERMASTIA (2002) ausführlich dargestellt.

Für die Berechnung der IODs werden die digitalen Aufnahmen (s. Abb. 3 A) mit dem in MATLAB geschriebenen Auswertungsprogramm geöffnet. Mit einem Schieber kann der Schwellenwert für die Vorauswahl so verändert werden, dass die Zellkerne klare Umrissgrenzen zeigen (Blaufärbung in Abb. 3 B). Die für die Messung geeigneten Zellkerne werden mittels des Cursors ausgewählt (Rosafärbung in Abb. 3 C). Mit „Enter“ wird die Auswahl der zu messenden Kerne abgeschlossen. Anschließend werden durch das MATLAB-Programm die einzelnen Zellkerne nacheinander eingeblendet (s. Abb. 3 D und 4). Mit den vier Schiebern rechts kann jeweils die Auswahl verändert werden. Die innere, gelbe Linie zeigt die Auswahl durch den gewählten Schwellenwert. Diese Auswahl kann mit dem Schieber „Threshold“ für jeden Zellkern nochmals angepasst werden. Um auch noch außerhalb der Schwellenwertgrenze liegende Grauwerte zu erfassen, kann mit dem Schieber „Add to core“ diese Auswahl des zu messenden Bereiches erweitert werden (weiße Linie). Die Pixel des außen liegenden gelben Rings werden zur Berechnung der Intensität des eingestrahletes Lichts verwendet. Dieser gelbe Ring kann mit 2 weiteren Schiebern („Radius“ und „Border“) in der Breite und der Lage verändert werden.

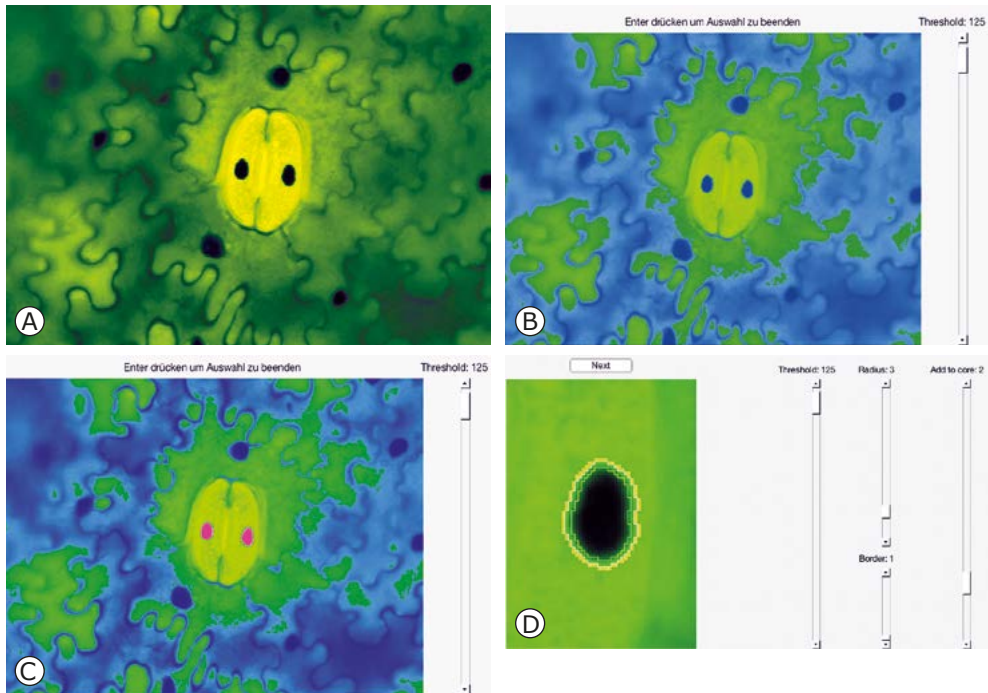
Sind die ausgewählten Kerne nacheinander abgearbeitet, gibt das Programm eine Zwischendarstellung der berechneten Werte aus (s. Abb. 5). Die Bilder oben zeigen nochmals die Auswahl, die darunter liegenden die Intensität der Absorption. Ganz unten werden einige berechnete Werte ausgegeben: Hintergrund-Intensität, Zahl der Pixel mit dem Wert 0 und dem Wert 255, Zahl der ausgewählten Pixel, Zahl der Pixel unterhalb des Schwellenwertes, IOD bis zum Auswahlring für die Hintergrundintensität, IOD aller für die Berechnung ausgewählten Pixel. IOD der Pixel unterhalb des Schwellenwertes. Diese Daten werden nachfolgend in einer Datei gespeichert. Treten bei der Messung eines Kerns mehr als 1 % der gemessenen Pixel als 0-Wert-Pixel (0 pixel) auf, wird der Kern von der Auswertung ausgeschlossen. Je Probe werden mindestens 50 Zellkerne gemessen.

Die Messwertedatei wird in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen und graphisch ausgewertet (s. Tab. 3 und Abb. 6-8).

3 Ergebnisse

Auswahl des Untersuchungsmaterials

Zur Messung des Ploidiegrades wurden die unteren Epidermen von Fiederabschnitten präpariert, die in der Regel auch zur Bestimmung der Stomatalänge und -breite benötigt werden. Der Vorteil gegenüber Wurzelspitzen liegt darin, dass die

**Abb. 3:**

- A) Aufnahme eines Schließzellenapparates mit Grünfilter bei 630-facher Vergrößerung.
 B) Mit dem MATLAB-Programm geöffnete Bilddatei mit ausgewählten Bereichen (blau) unterhalb des gewählten Schwellenwertes. Dieser kann mit dem Schieber „Threshold“, rechts im Bild, verändert werden.
 C) Durch Anklicken werden Zellkerne, die gemessen werden sollen (rosa), ausgewählt. Mit „Enter“ wird die Auswahl der zu messenden Kerne abgeschlossen.
 D) Anschließend werden durch das MATLAB-Programm die einzelnen Zellkerne nacheinander eingblendet. Mit den vier Schiebern rechts kann jeweils die Auswahl verändert werden.

Abb. 4: Auswahl aus Abb. 3D. Die feine, gelbe Linie zeigt die Auswahl durch den gewählten Schwellenwert. Diese Auswahl kann mit dem Schieber „Add to core“ erweitert werden (weiße Linie). Die Pixel des gelben Rings werden zur Berechnung der Hintergrundintensität verwendet. Dieser gelbe Ring kann mit 2 weiteren Schiebern („Radius“ und „Border“) in der Breite und der Lage verändert werden.

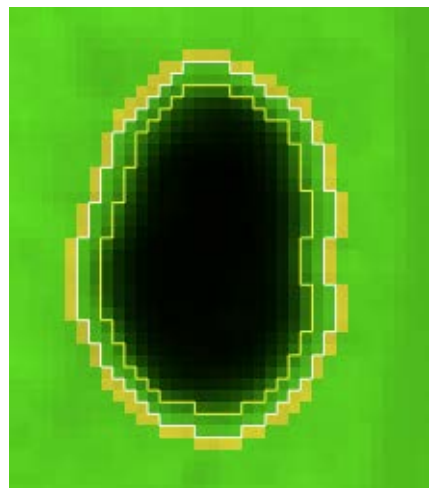




Abb. 5: Zwischendarstellung der berechneten Werte. Die Bilder oben zeigen nochmals die Auswahl, die darunter liegenden die Intensität der Absorption. Ganz unten werden einige berechnete Werte ausgegeben: Hintergrund-Intensität, Zahl der Pixel mit dem Wert 0 und dem Wert 255, Zahl der ausgewählten Pixel, Zahl der Pixel unterhalb des Schwellenwertes, Integrierte Optische Dichte (IOD) bis zum Auswählung für die Hintergrundintensität, IOD aller für die Berechnung ausgewählter Pixel. IOD der Pixel unterhalb des Schwellenwertes.

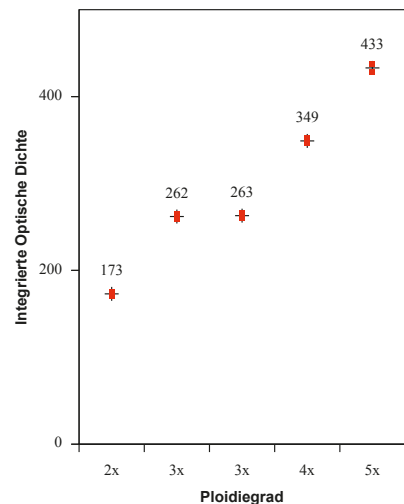
Epidermen in der gesamten Vegetationsperiode leicht zugänglich sind. Vorversuche haben gezeigt, dass insbesondere in den Schließzellen eine Messung möglich ist.

Zwei wesentliche Probleme traten bei den Färbeversuchen an den unteren Epidermen der Fiederabschnitte bei *Dryopteris* auf. Erstens färben sich meist die Zellwände der Epidermis- und der noch anhaftenden Parenchymzellen unspezifisch und machen somit die Messung der Kerne in diesen Zellen oft unmöglich (s. Abb. 1). Bei den Schließzellen der Stomata ist das nicht der Fall, so dass die Kerne dieser Zellen gemessen werden können. Zweitens verursachen die in den Schließzellen enthaltenen Zellorganellen (hauptsächlich Chloroplasten) und die unspezifisch gefärbten Parenchymzellen, die die Schließzellen teilweise oder auch fast vollständig überlagern können, Inhomogenitäten, die sich in einer größeren Streuung der gemessenen Integrierten Optischen Dichten (IOD) äussern oder eine Messung unmöglich machen. Mit Parenchymzellen überlagerte Schließzellen werden von der Messung ausgeschlossen. Trotz der erheblichen Standardabweichungen lassen sich die Ploidiegrade der diversen Aufsammlungen eindeutig trennen (s. Abb. 6). Die Variationskoeffizienten der Mittelwerte liegen zumeist unter 5 %, abhängig von der Zahl der gemessenen Zellkerne je Probe.

Darüberhinaus enthalten die Wurmfarne-Arten erhebliche Mengen phenolischer Verbindungen als sekundäre Inhaltsstoffe, z. B. Filixsäure, Albaspidine, Flavaspidine, u. a. (WIDÉN et al. 1996), die bekanntermaßen mit der Feulgenfärbung interferieren und stören. Die Fixierung mit Formalin 4 % begrenzt diese Interaktion (GREILHUBER 1986).

Verwendet man Prothallien oder ganz junge Sporophyten zur Messung, so ist die „unspezifische“ Färbung minimal und man erhält die gefärbten Zellkerne vor fast klarem Hintergrund.

Abb. 6: Grafische Darstellung der Mittelwerte der IODs. Die Fehlerbalken (rot) entsprechen einem 95 % Konfidenzintervall für den Mittelwert der Stichprobe.



Der Färbeprozess

In den Vorversuchen zeigte sich meist eine zu schwache Färbung der Zellkerne, die auf eine unzureichende Penetrierung einzelner oder mehrerer Reagenzien zurückgeführt wurde. Dies konnte durch enzymatische Behandlung mit Cellulase und Mazerozym ausreichend verbessert werden. Inzwischen lässt sich der enzymatische Schritt vermeiden, indem der gepufferten Fixierlösung Formaldehyd 4 %, 0,1 % oder 0,2 % Triton X-100 zugesetzt wird. Nach den Fixierungsschritten mit Formalin 4 %, Ethanol abs. – Eisessig (3+1) und dem Auswaschen mit Wasser für 10 Min. kann gleich mit 5 mol/l Salzsäure hydrolysiert werden oder die Proben werden in EtOH 96 % überführt und bei -20°C aufbewahrt.

Um während der Wässerungsschritte das Eintauchen der Proben zu gewährleisten, sollte abgekochtes und wieder erkaltetes Wasser verwendet werden. Alternativ kann auch zu 5 ml Wasser 1 Tr. Benzalkoniumchlorid 1 % zugegeben werden.

Feulgen-Färbung der unteren Epidermen

Wie bei der Flowzytometrie werden hier Blattteile untersucht, die während der ganzen Vegetationsperiode stets zur Verfügung stehen. Dagegen sind Wurzelspitzen und Sporangien für Chromosomenzählungen nur verhältnismäßig kurzzeitig in der richtigen Wachstumsphase.

Bei der Präparation der unteren Epidermen wird in unterschiedlichem Maße Parenchymgewebe mitgerissen. Die Zellwände der Blattparenchymzellen und der Epidermiszellen färben sich mit Schiff's Reagenz unspezifisch rot (s. Abb. 1). Die Färbung geschieht auch vor der Salzsäurehydrolyse und hat somit nichts zu tun mit eventuellen Hydrolyseprodukten. Die Zellwände der Schließzellen der Stomata werden nicht gefärbt, so dass die unspezifische Färbung hier nicht stört, solange die Schließzellen nicht von Parenchymzellen überlagert sind. Die unspezifische Anfärbung der Epidermiszellen kann unterschiedlich ausfallen und zwar stärker bei den diploiden und triploiden Vertretern der Gruppe, am geringsten tritt sie bei *D. filix-mas* und den tetra- und pentaploiden Hybriden auf. Manchmal ist sie so gering, dass auch die Zellkerne der Epidermiszellen gemessen werden können und gleiche Werte wie die Kerne der Schließzellen ergeben. Die unspezifische Färbung der Parenchymzellwände ist in der Regel größer als die der Epidermiszellen.

Interessanterweise zeigen Prothallien und ganz junge Sporophyten keine oder höchstens sehr schwache unspezifische Färbung.

Auswertung der Messungen

In jedem Versuch wird als interner Standard mindestens eine Probe mit bekanntem Ploidiegrad bzw. bekannter Chromosomenzahl so mitgeführt, dass die Unterscheidbarkeit zweier benachbarter Ploidiestufen nachweisbar ist. Da die Chromosomenzahlen und Genomgrößen des untersuchten *Dryopteris affinis*-Komplexes alle bekannt sind (s. Tab. 2) (SCHNELLER 1975; BÄR et al. 2020), kommt es hier nicht so sehr auf absolut genaue DNA-Mengen an, sondern „lediglich“ auf eine klare Trennung der Ploidiestufen. Die Auswertung der Messungen zeigt, dass die Ploidiestufen eindeutig unterschieden werden können (s. Tab. 3, Abb. 6, 7). Die 95 %-Konfidenzintervalle der Mittelwerte der IODs zeigen keinerlei Überlappung.

Tab. 3: Tabellarische Auflistung der statistischen Kennzahlen der gemessenen Stichproben.

	<i>D. affinis ssp. affinis</i>	<i>D. borrieri</i>	<i>D. borrieri</i>	<i>D. × complexa</i>	<i>D. × critica</i>
Ploidiegrad	2x	3x	3x	4x	5x
Mittelwert IOD	173	262	263	349	433
StAbw	17,3	24,2	27,4	23,5	31,8
Anzahl Messwerte	71	98	78	65	52
SEM	2,1	2,4	3,1	2,9	4,4
SEM x 2 (95%)	4,1	4,9	6,2	5,8	8,8
CV (%) des Mittelw.	1,2	0,9	1,2	0,8	1,0
CV (%) der Stichpr.	10,0	9,4	10,4	6,7	7,3
IOD / 1Cx	86	87	88	87	87

Qualitätsprüfung der Messungen

Um die Gleichmäßigkeit der Beleuchtung im Bildbereich zu prüfen, wurde ein und derselbe Kern an 15 über den gesamten Bildbereich gleichmäßig verteilten Stellen aufgenommen bei unveränderter Fokussierung und unter identischen Einstellungen in der Software die IOD gemessen. Der Variationskoeffizient $CV_{(IOD)}$ der Messungen betrug 1,9 %.

Um die Gleichmäßigkeit der Aufnahmen (Rauschen der CMOS-Kamera) zu testen wurde ein Zellkern an derselben Position sieben Mal hintereinander aufgenommen und gemessen. Der Variationskoeffizient $CV_{(IOD)}$ der IOD betrug 0,16 %.

Da die Zellkerne sphärische Gebilde sind, kann die optimale Scharfstellung nicht immer visuell entschieden werden. Entsprechend kann die IOD trotz augenscheinlich wahrgenommener Fokussierung etwas variieren. Um den Einfluss der Fokussierung auf die IOD zu prüfen, wurde ein Zellkern an der gleichen Stelle von der unteren zur oberen gerade erkennbaren unscharfen Fokussierung in gleichen Abständen aufgenommen und die IOD gemessen. Bei einer diploiden Probe waren das 2 fokussierte Aufnahmen (insgesamt 4), bei einer pentaploiden 3 fokussierte Aufnahmen (insgesamt 5). Der Variationskoeffizient der fokussierten Aufnahmen lag entsprechend bei 1,5–3,5 %, bzw. 2,5–4,0 %.

Bezieht man die jeweils nicht fokussierten Aufnahmen mit ein, so liegt der Variationskoeffizient entsprechend bei 7–8,5 %, bzw. 6–9 %.

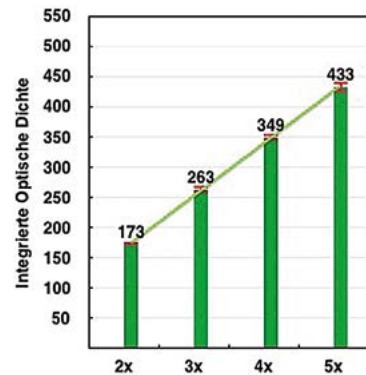


Abb. 7: Trendlinie der gemessenen Proben. Die grünen Balken stellen gemessene einzelne Mittelwerte von Proben dar oder sind der Mittelwert von mehreren Proben gleichen Ploidiegrades (siehe 3x).

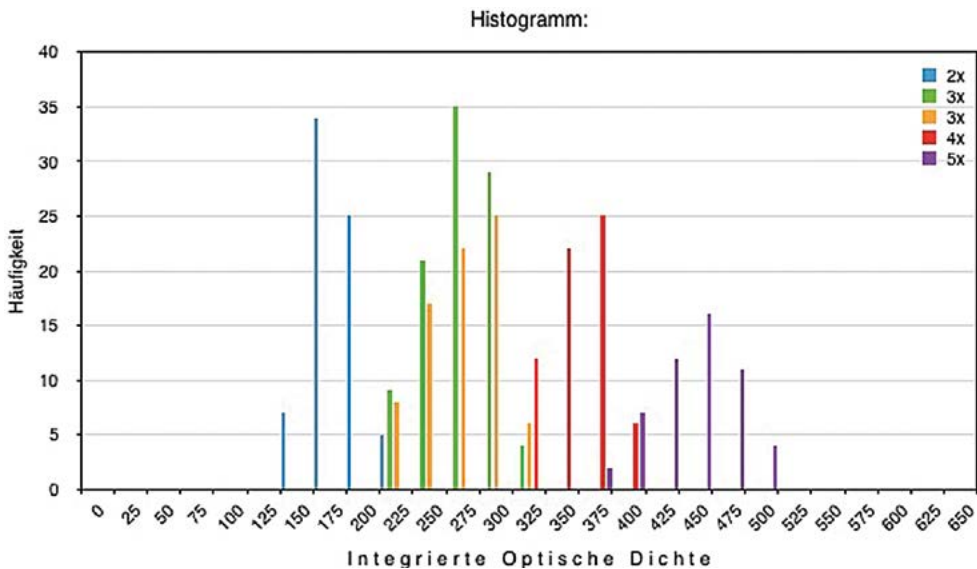


Abb. 8: Histogramme der gemessenen Werte der einzelnen Proben dieses Versuches. Die Streuung nimmt mit höheren Ploidiegraden etwas zu.

Zum Vergleich: der Variationskoeffizient der Messwerte der Stichproben liegt bei allen Ploidiestufen bei gerundet 6–11 % (s. Tab. 3); der Variationskoeffizient der Mittelwerte der Stichproben liegt bei 0,8–1,2 %.

Dank

Wir danken Frau Mag. Dr. Eva Tensch, Department für Botanik und Biodiversitätsforschung, Wien, und Herrn Prof. Dr. Wilfried Bennert, Ennepetal, für wertvolle Beratung, Literatur und Diskussion sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Literatur

- BÄR, A. & ESCHMÜLLER, A. 1984: Diploide *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins im Allgäu. – Mitt. Naturwiss. Arbeitskr. Kempten **26(2)**: 7-20.
- BÄR, A. & ESCHMÜLLER, A. 1985: Tetraploide und pentaploide *Dryopteris* × *tavelii* – jetzt im Allgäu bestätigt. – Mitt. Naturwiss. Arbeitskr. Kempten **27(1)**: 57-68.
- BÄR, A. & ESCHMÜLLER, A. 1986: Sporenmessungen an diploider und triploider *Dryopteris affinis* sowie an Kreuzungen mit *Dryopteris filix-mas* (*Dryopteris* × *tavelii*). – Ber. Bay. Bot. Ges. **57**: 137-146.
- BÄR, A. & ESCHMÜLLER, A. 2006: Farnstudien: Der tetraploide Bastard *Dryopteris filix-mas* × *Dryopteris affinis* subsp. *affinis* (*Dryopteris* × *complexa* Fraser-Jenkins 1987). – Ber. Bay. Bot. Ges. **76**: 53-84.
- BÄR, A. & ESCHMÜLLER, A. 2007: Aktuelle Taxonomie und Übersicht unserer Funde von *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins und von Bastarden mit *Dryopteris filix-mas*. – Mitt. Naturwiss. Arbeitskr. Kempten **42(1/2)**: 21-35.
- BÄR, A. & ESCHMÜLLER, A. 2010: Farnstudien: Einige pentaploide Bastarde von *Dryopteris filix-mas* mit triploiden Vertretern der *Dryopteris affinis*-Gruppe. – Ber. Bay. Bot. Ges. **80**: 119-140.

- BÄR, A. & ESCHMÜLLER, A. 2014: Beitrag zur Kenntnis der mitteleuropäischen Farnsippen aus der *Dryopteris affinis*-Gruppe (Fraser-Jenkins 2007) und von Bastarden mit *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott – Naturkundl. Beiträge Allgäu **49**: 11-34.
- BÄR, A., BENNERT, H.W., CZICHOWSKI, H.-J., FUCHS, J., GAUSMANN, P., IVANOVA, D., JÄGER, W., NEUROTH, R., THIEL, H., THIEMANN, R. & ZENNER, G. 2020: Der *Dryopteris affinis*-Komplex (*Dryopteridaceae*) im Harz – Identifizierung, Verbreitung, Ökologie. – Tuexenia **40**: 345-371.
- BÖCKING, A., 1990: DNA-Zytometrie und Automation in der klinischen Diagnostik. – Beiträge zur Onkologie **38**: 298-347.
- CHURCH, A.R., EVANS, A.J., GOLDING, R., RUMSEY, F.J. & VIANE, R.L.L. 2019: *Dryopteris affinis* subsp. *cluthensis*: a new taxon in the *Dryopteris affinis* complex (*Dryopteridaceae*). – The Fern Gazette **21 (2)**: 87-97.
- DÖPP, W. 1932: Die Apogamie bei *Aspidium remotum* Al. Br. – Planta **17**: 86-152.
- DÖPP, W. 1939: Cytologische und genetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Dryopteris*. – Planta **29**: 481-533.
- EKRT, L., TRÁVNÍČEK, P., JAROLÍMOVÁ, V., VÍT, P. & URFUS, T. 2009: Genome size and morphology of the *Dryopteris affinis* group in Central Europe. – Preslia **81**: 261-280.
- ESCHMÜLLER, A. 1972: *Dryopteris pseudomas* (Wollaston) Holub et Pouzar – Typen und Fundorte im südlichen Allgäu. – Ber. Naturforsch. Ges. Augsburg **27**: 45-65.
- ESCHMÜLLER, A. 1985: Vorläufige Fundortliste „kritischer“ Wurmfarnsippen in Vorarlberg. – Mitt. Naturwiss. Arbeitskr. Kempten **27(1)**: 69-78.
- ESCHMÜLLER, A. & ESCHMÜLLER, H. 1996: Verbreitung des *Dryopteris affinis*-Komplexes im bayerischen Alpen- und Voralpenraum – Ber. Bay. Bot. Ges. **66/67**: 195-207.
- FEULGEN, R. & ROSSENBECK, H. 1924: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. – Biol. Chem. **135**: 203-248.
- FRASER-JENKINS, C.R. 1987: Taxonomic and nomenclatural notes 5, *Dryopteris*. in DERRICK, L.N., JERMY, A.C. & PAUL, A.M.: Checklist of European Pteridophytes. Sommerfeltia **6**: x-xiii.
- FRASER-JENKINS, C.R. 1996: A reaffirmation of the taxonomic treatment of *Dryopteris affinis* (*Dryopteridaceae*: *Pteridophyta*) – The Fern Gazette **15(3)**: 77-81.
- FRASER-JENKINS, C.R. 2007: The species and subspecies in the *Dryopteris affinis* Group. – The Fern Gazette **18(1)**: 1-26.
- FRASER-JENKINS, C.R. & REICHSTEIN, T. 1984: *Dryopteris*. – In: HEGI, G. (Begr.): Illustrierte Flora von Mitteleuropa. Band I Teil 1: *Pteridophyta*. 3. Aufl.: 136-169. Parey, Berlin.
- FREIGANG, J. & ZENNER, G. 2007: Die Verbreitung von *Dryopteris affinis* (Lowe) Fraser-Jenkins (*Pteridophyta*, *Dryopteridaceae*) im baden-württembergischen Alpenvorland mit einer Anleitung zur Bestimmung ihrer hier aufgefundenen Sippen. – Ber. Bot. Arbeitsgem. Südwestdeutschland **4**: 37-64.
- GIBBY, M. 1985: Cytological observations on Indian subcontinent and Chinese *Dryopteris* and *Polystichum* (*Pteridophyta*, *Dryopteridaceae*). – Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.) **14(1)**: 1-42.
- GREILHUBER, J. 1986: Severely distorted Feulgen-DNA amounts in *Pinus* (*Coniferophytina*) after non additive fixations as a result of meristematic self-tanning with vacuole contents. – Can. J. Genet. Cytol. **28**: 409-415.
- GREILHUBER, J., VOGLMAYR, H., TEMSCH, E.M., OBERMAYER, R. & KRISAI, R. 1999: Genomgrößenvariation bei Moospflanzen – Methoden, Probleme, biologische Bedeutung. – Abh. Zool.-Bot. Ges. Österreich **30**: 5-15.
- GREILHUBER, J. 2008: Cytochemistry and C-values: the less-well-known world of nuclear DNA amounts. – Ann. Bot. **101**: 791-804.

- GREILHUBER J. & TEMSCH E.M. 2001: Feulgen densitometry: some observations relevant to best practice in quantitative nuclear DNA content determination. – *Acta Bot. Croat.* **60(2)**: 285-298.
- GREILHUBER, J., DOLEŽEL, J., LYSÁK, M. A. & BENNETT, M.D. 2005: The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'Genome Size' and 'C-Value' to describe nuclear DNA contents. – *Ann. Bot.* **95**: 255-260.
- GREILHUBER, J. & DOLEŽEL, J. 2009: 2C or not 2C: a closer look at cell nuclei and their DNA content. – *Chromosoma* **118**: 391-400.
- HARDIE, D.C., GREGORY, T.R. & HEBERT, P.D.N. 2002: From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. – *J. Histochem. Cytochem.* **50(6)**: 735-749.
- HAROSKE, G., GIROUD, F., REITH, A. & BÖCKING, A. 1998: 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry - Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. – *Anal. Cell. Pathol.* **17**: 189-200.
- HENRY, T.A., BAINARD, J.D. & NEWMASER, S.G. 2014: Genome size evolution in Ontario ferns (*Polyodiidae*): evolutionary correlations with cell size, spore size, and habitat type and an absence of genome downsizing. – *Genome* **57**: 1-12.
- JESSEN, S. 2017: *Dryopteridaceae*. – In: Jäger, E.J. (Hrsg.): *Rothmaler – Exkursionsflora von Deutschland, Gefäßpflanzen: Grundband*, 21. Aufl.: 114-119. Springer, Berlin.
- JESSEN, S., BUJNOCH, W., ZENNER, G. & STARK, C. 2011: *Dryopteris lacunosa* – eine neue Art des *Dryopteris-affinis*-Aggregats (*Dryopteridaceae*, *Pteridophyta*). – *Kochia* **5**: 9-31.
- MANTON, I. 1939: Cytology of the common male fern in Britain. – *Nature* **144**: 291.
- MANTON, I. 1950: Problems of cytology and evolution in the *Pteridophyta*. – Cambridge University Press, Cambridge. 158 S.
- MÜLLER, D. 1966: Erfahrungen mit der Feulgenfärbung für quantitative cytochemische DNS-Untersuchungen. – *Histochemie* **7**: 96-102.
- RASBACH, H., RASBACH, K., REICHSTEIN, T. & SCHNELLER, J. 1983: Tetraploide *Dryopteris x tavelii* Rothm. im nördlichen Schwarzwald. – *Farnblätter* **10**: 1-13.
- RIS, H. & MIRSKY, A.E. 1949: Quantitative cytochemical determination of Desoxyribonucleic Acid with the Feulgen Nuclear Reaction. – *J. Gen. Physiol.* **33(2)**: 125-146.
- SCHNELLER, J.J. 1974: Untersuchungen an einheimischen Farnen, insbesondere der *Dryopteris filix-mas*-Gruppe. 1. Teil. – *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **84**: 195-217.
- SCHNELLER, J.J. 1975: Untersuchungen an einheimischen Farnen, insbesondere der *Dryopteris filix-mas*-Gruppe. 2. Teil. Cytologische Untersuchungen. – *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **85**: 1-17.
- SELL, P. & MURRELL, G. (Hrsg.) 2018: *Flora of Great Britain and Ireland*, Vol. 1. – Cambridge University Press.
- SUDA, J., KRAHULCOVÁ, A., TRÁVNÍČEK, P. & KRAHULEC, F. 2006: Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology. – *Taxon* **55(2)**: 447-450.
- TILQUIN, J.P. 1981: Note on apomixis in ferns. – *Acta Soc. Bot. Poloniae* **50**: 217-222.
- VILHAR, B., GREILHUBER, J., DOLENC KOCE, J., TEMSCH, E.M. & DERMASIA, M. 2001: Plant Genome Size Measurement with DNA Image Cytometry. – *Ann. Bot.* **87**: 719-728.
- VILHAR, B. & DERMASIA, M. 2002: Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. – *Acta Bot. Croat.* **61(1)**: 11-26.
- WIDÉN, C.-J., FRASER-JENKINS, C., REICHSTEIN, T., GIBBY, M. & SARVELA, J. 1996: Phloroglucinol derivatives in *Dryopteris* sect. *Fibrillosae* and related taxa (*Pteridophyta*, *Dryopteridaceae*). – *Ann. Bot. Fenn.* **33**: 69-100.
- ZAHLHEIMER, W.A. 2002: Die Spreuschuppigen Wurmfarne *Dryopteris affinis* ssp. *cambrensis* und ssp. *pseudodisjuncta* bei Griesbach in Niederbayern. – *Mitt. Naturwiss. Arbeitsskr. Kempten* **38(2)**: 83-86.