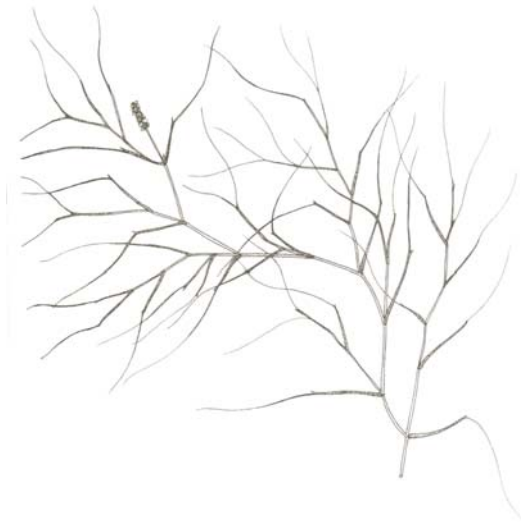

Genetische Variabilität und Differenzierung
von limnischen und marinen Populationen
des Kamm-Laichkrautes
Potamogeton pectinatus L.



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Georg Nies

Max-Planck-Institut für Limnologie
Plön 2003

Gliederung

Zusammenfassung	3
Abstract.....	5
1 Einleitung	7
1.1 Grundlagen der Populationsgenetik.....	7
1.2 Molekulare Methoden in der Populationsbiologie	7
1.3 Die Rolle von Habitatsstrukturen für den Genaustausch	8
1.4 Hypothesen	10
1.5 Zielart: <i>Potamogeton pectinatus</i>	11
1.6 Gliederung der Arbeit	13
2 Identifizierung und Charakterisierung von Mikrosatelliten-Markern bei <i>Potamogeton pectinatus</i>	15
2.1 Einleitung.....	15
2.2 Etablierung einer angereicherten DNA-Bibliothek	17
2.2.1 Methode	17
2.2.2 Ergebnisse	21
2.2.3 Überprüfung der Mikrosatelliten.....	22
3 Einfluss somatischer Mutationen auf intraklonale Variation und Populationsstrukturen	24
3.1 Einleitung.....	24
3.2 Material und Methode	27
3.3 Ergebnisse	29
3.4 Diskussion	33
4 Klonale und genetische Diversität in Populationen von <i>Potamogeton pectinatus</i>	39
4.1 Einleitung.....	39
4.2 Material und Methode	43
4.2.1 Material	43
4.2.2 Datenauswertung.....	46
4.3 Ergebnisse	47
4.4 Diskussion	51
5 Vergleich des Genflusses zwischen limnischen und marinen Populationen.....	56
5.1 Einleitung.....	56
5.2 Material und Methode	58
5.2.1 Material	58
5.2.2 Datenauswertung.....	59
5.3 Ergebnisse	61
5.3.1 Genfluss innerhalb der Habitatstypen	61
5.3.2 Genfluss zwischen den beiden Habitatstypen.....	64
5.4 Diskussion	65
6 Literatur.....	70
Anhang	81

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die genetische Populationsstruktur von limnischen und marinen Populationen des Kamm-Laichkrautes *Potamogeton pectinatus* L. vergleichend untersucht. Die übergreifende Hypothese lautete, dass die Kontinuität (Meer) bzw. Verinselung (Süßwasserseen) des Lebensraumes einen tiefgreifenden Einfluss auf genetische Diversität und Differenzierung haben sollte. Die 14 marinen und 12 limnischen Populationen wurden annähernd auf den gleichen geografischen Längen- und Breitengraden beprobt. Die Analyse der Populationsstrukturen erfolgte mit DNA-Mikrosatelliten. Die Entwicklung dieses hochvariablen Markersystems erfolgte durch die Erstellung von angereicherten DNA-Bibliotheken.

Die Detektion von populationsgenetischen Strukturen wurde durch somatische Mutationen erschwert. Durch drei Allele an einem Genort und einer zweigipfelige Verteilung bei der Häufigkeitsverteilung der paarweisen Unterschiede zwischen Genotypen konnten somatische Mutationen nachgewiesen werden, zumal somatische Mutationen häufiger in Populationen mit vermehrter klonaler Reproduktion zu finden waren. Diese somatischen Mutationen veränderten die detektierbare Variabilität, jedoch ist aufgrund der ungerichteten Änderung bei einer genügend großen Stichprobe kein Einfluss auf die genetische Differenzierung zwischen Populationen zu erwarten.

Bei der genetischen Variabilität **innerhalb** von Populationen zeigte sich der Einfluss der nacheiszeitlichen Wiederbesiedlung. Entsprechend der geografischen Entfernung von den eiszeitlichen Rückzugsgebieten nahm die genetische Diversität in limnischen Populationen nach Osten hin ab. Dagegen blieb die genetische Diversität bei den marinen Populationen konstant. Da die Ostsee ein kontinuierlicher Lebensraum ist, konnte nach einer erfolgreichen Erstbesiedlung der Ostsee eine rasche Ausbreitung im gesamten Lebensraum erfolgen. Diese rasche und einheitliche Besiedlung minimierte den Einfluss zufälliger Änderungen durch Gründereffekte und genetische Drift, welche bei limnischen Populationen die genetische Variabilität veränderten.

Der Gradient der klonalen Diversität mit dem Längengrad war etwas differenzierter zu betrachten. Innerhalb der marinen Populationen war die klonale Diversität im

westlichen Teil der Ostsee geringer als im Osten (gemessen als Simpsons's Index). Vermutlich war durch die höhere Salinität die Verbreitung von *Potamogeton pectinatus* limitiert und bei ungünstigen Lebensbedingungen erfolgte häufiger eine klonale Vermehrung. Das Gegenteil konnte bei den Seen beobachtet werden. Die klonale Diversität in den östlichen Seen Norddeutschlands war geringer und *Potamogeton pectinatus* kam wesentlich seltener vor als in den westlichen Seen. Reduzierte sexuelle Reproduktion war die Folge von niedrigen Bestandsdichten, da genetisch andere Individuen seltener waren. Die Ursachen für die niedrigen Bestandsdichten waren jedoch unklar und sollten im Rahmen weitere Untersuchungen geklärt werden.

Der Vergleich der genetischen Differenzierung **zwischen** Populationen zeigte, dass bei gleicher geografischer Distanz limnische Populationen genetisch wesentlich weiter entfernt waren als vergleichbare marine Populationen. Die Vergleiche beider Habitatstypen zeigte eine signifikante Korrelation der genetischen Distanz gegen die geografische Distanz (= Isolation durch Distanz), jedoch war die Steigung bei der Regressionsgeraden bei limnischen Populationen doppelt so hoch wie bei marinen Populationen, was den höheren Genfluss im kontinuierlichen Habitat verdeutlicht. Die Überbrückung der Isolationsbarriere Land reduzierte den Genfluss deutlich, während durch den großen Austausch von Wassermassen der genetische Austausch für marine Populationen fast unlimitiert möglich war.

Abstract

This dissertation investigates the genetic population structure of the pondweed species *Potamogeton pectinatus* L. in northern Germany. The overarching hypothesis was that continuity (marine habitat) or isolation (freshwater lake habitat) of the habitat will have a profound effect on genetic diversity and differentiation. The sampling design comprised 14 Baltic Sea populations and 12 lake populations that span across approximately the same range of longitude and latitude. The analysis of genetic population structure was done using DNA microsatellites that were developed using enriched DNA libraries.

The detection of population structure was influenced by somatic mutations. Findings of three alleles at one gene locus, and a bimodal distribution of pairwise genotype mismatch distribution suggested the occurrence of somatic chimeras, in particular in those populations that showed extensive clonal propagation. These somatic mutations changed the detectable genetic variation. Nevertheless, inferences on systematic differences of population structure between habitats will still be valid because there was not any specific habitat bias.

The influence of the postglacial recolonisation was detectable in the genetic variation within populations (as heterozygosity and number of alleles). In lake populations, the genetic diversity decreased from the putative refugial sites in the west towards eastern populations. This was not true for marine populations where genetic diversity remained constant throughout the study area. Since the Baltic Sea is a continuous habitat, its recolonisation by *P. pectinatus* has probably not suffered as much from founder effects than the lake populations did.

The longitudinal gradient of clonal diversity was more complex. While in marine populations, the clonal diversity increased from west to east, the inverse was true for the lake populations. In the Baltic Sea, sexual reproduction was probably limited in more western sites that are more saline and hence more stressful than the eastern sampling sites. In the lake populations, the overall population density decreased towards the east, suggesting some ecological limitation to the occurrence of pondweeds that may have been correlated with the concomitant decrease of sexual reproduction towards the east.

A comparison of genetic differentiation between populations showed that at similar geographic distances, lake populations were markedly stronger differentiated than marine populations. Both habitat types showed a significant isolation-by-distance relationship. The slope of the regression line in lake habitats was twice as steep as among the marine populations, indicating higher gene flow in the continuous habitat. In conclusion, I have demonstrated that the isolation barrier 'land' between isolated lake habitats markedly reduces gene flow.

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Populationsgenetik

Variabilität in erblichen Merkmalen gilt als Voraussetzung für die Anpassungsfähigkeit von Tier- und Pflanzenbeständen an ihre sich ständig ändernde Umwelt (Mayr, 1967). Die genetische Variabilität innerhalb von Populationen und genetische Differenzierung zwischen Populationen einer Art wird dabei beeinflusst durch die Faktoren Mutation, Selektion, Genetische Drift und Genfluss zwischen Populationen. Genetische Variabilität wird durch Mutationen erzeugt, und Selektion (gerichtet) und genetische Drift in endlichen Populationen (ungerichtet) sorgen für eine Differenzierung zwischen Populationen. Genfluss zwischen Populationen wirkt dieser Differenzierung entgegen. Die Stärke des Genflusses ist daher ausschlaggebend für die genetische Differenzierung zwischen Populationen, wobei niedriger Genfluss die Artbildung fördert (Slatkin, 1987). Entscheidend für die Stärke des Genflusses sind zum Beispiel Fortpflanzungssystem, Verbreitungsmechanismus, Effektivität des Transportes durch Vektoren (Übersichtsartikel Loveless & Hamrick, 1984) und die räumliche Struktur des Lebensraums (Übersichtsartikel Manel *et al.*, 2003). In dieser Dissertation beschäftige ich mich vor allem mit dem Einfluss der Struktur des Lebensraumes auf den Genaustausch.

1.2 Molekulare Methoden in der Populationsbiologie

Der Austausch von Individuen zwischen Populationen lässt sich mit ökologischen Methoden wie beispielsweise dem Markieren von Samen oder wandernden Tieren teilweise erfassen. Jedoch ist die korrekte Erfassung von Migranten methodisch sehr schwierig bis unmöglich. So ist es beispielsweise nicht möglich, bei allen potenziellen Vektoren wie Wasservögeln Mageninhaltsuntersuchungen durchzuführen, um deren

Einfluss auf Populationsstrukturen von Wasserpflanzen zu erfassen. Eine bessere Möglichkeit zur Beantwortung entsprechender Fragestellungen bieten populationsgenetische Untersuchungen, bei denen ein Austausch von Genen zwischen Populationen mit Hilfe von selektiv neutralen Erbinformationen, so genannten genetischen Markern, gemessen werden (Avice, 1994). Diese Marker ermöglichen zwar nur eine indirekte Messung des genetischen Austausches, dafür geht in weitere Berechnungen jedoch nur der tatsächliche, effektive Genfluss ein. Am besten geeignet für Untersuchungen von Genfluss innerhalb und zwischen Populationen einer Art sind dabei solche Marker, die Unterschiede feinskalig detektieren können und selektiv neutral sind. Mikrosatelliten erfüllen genau diese Kriterien, werden darüber hinaus noch kodominant vererbt und lassen Rückschlüsse auf Inzucht und Auskreuzungseffekte zu (Bierne *et al.*, 1998; Pemberton *et al.*, 1999; Reilly *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 1996). Als Nachteil der Methode ist anzuführen, dass vor der Nutzung dieses Markersystems zuerst eine zum Teil schwierige Etablierung stattfinden muss.

1.3 Die Rolle von Habitatsstrukturen für den Genaustausch

Ein Vergleich zwischen Populationen einer Art in unterschiedlichen Lebensräumen ermöglicht eine Abschätzung über die Bedeutung der Struktur des Lebensraumes, unabhängig von anderen, den Genfluss beeinflussenden Faktoren wie Fortpflanzungssystem, Blütenaufbau oder Bestäubungsmechanismus. Aquatische Ökosysteme stellen dafür einen besonderen Lebensraum dar, und ein Vergleich limnischer und mariner Populationen sollte Unterschiede im Genfluss aufzeigen. Aus populationsgenetischer Sicht stellen Seen ein interessantes Habitat dar. Zum einen sind Seen Ökosysteme, die sich klar von anderen Lebensräumen abgrenzen lassen. Zum anderen können Seen als Inseln in einem terrestrischen Meer angesehen werden. Eine Besiedlung von Seen bedarf erst der erfolgreichen Überbrückung eines andersartigen Ökosystems. Wie es zur Überbrückung der nicht besiedelbaren Zwischenräume und somit der Verbreitung zwischen Seen kommen kann, hat bereits Darwin (1859) fasziniert. So stellte dieser in seinem Buch „The origin of species by means of natural selection“ die floristische und faunistische Ähnlichkeit von Seen über Länder und Kontinente hinweg fest. Darwin (1859) stellte dabei Überlegungen

an, wie die Besiedlung stattgefunden haben könnte. Versuche mit Sedimenten aus Seen zeigten ihm, dass schon sehr wenig „Matsch“ sehr viele Wasserpflanzen hervorbringen kann. Da Sediment zum Beispiel an Füßen von Enten haften bleiben kann und Enten zwischen Seen migrieren, müsse es schon ein merkwürdiger Zufall sein, wenn dadurch keine Übertragung von Arten in andere Seen stattfinden würde. Mittlerweile ist bekannt, dass Pflanzensamen oder Knollen nicht nur äußerlich durch Tiere transportiert werden können, sondern zum Beispiel auch Knollen vom Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* nach der Darmassage bei Wasservögeln erfolgreich auskeimen können (Santamaría *et al.*, 2002).

Wie erfolgreich der Transport durch Vektoren sein kann, lässt sich bei einem Vergleich von Populationen überprüfen, die unterschiedliche Verbreitungsmöglichkeiten haben. Marine Wasserpflanzen haben zusätzlich zum Transport über Vektoren noch die Möglichkeit des Transportes durch den Wasserkörper. Das Meer kann als ein kontinuierlicher Lebensraum ohne Barrieren angesehen werden. Durch horizontalen Wasseraustausch ist ein Verdriften von Fragmenten, Ausläufern, Samen und Früchten über große geografische Distanzen hinweg möglich (Palumbi, 1992). Seen dagegen sind diskrete Lebensräume, bei denen ein Austausch über Fließsysteme nur begrenzt möglich ist (Mort & Wolf, 1986). Der genetische Austausch muss daher vermehrt über Vektoren stattfinden. Folglich sollte die genetische Differenzierung zwischen limnischen Populationen größer sein als bei vergleichbaren marinen Populationen (Abbildung 1.1).

Betrachtet man die genetische Variabilität innerhalb von Populationen, so spielt der verminderte Genfluss bei limnischen Populationen ebenfalls eine Rolle. Ein intensiver Genfluss zwischen Populationen minimiert lokale Differenzierung, die durch Selektion oder genetische Drift entstanden ist. Darüber hinaus sind limnische Populationen durch die Habitatsgrößen in ihrer effektiven Populationsgröße kleiner, was die Bedeutung der genetischen Drift erhöht. Bei einem Vergleich limnischer und mariner Populationen sollte daher die genetische Differenzierung innerhalb von Populationen in Seen größer sein als in marinen (Abbildung 1.1).

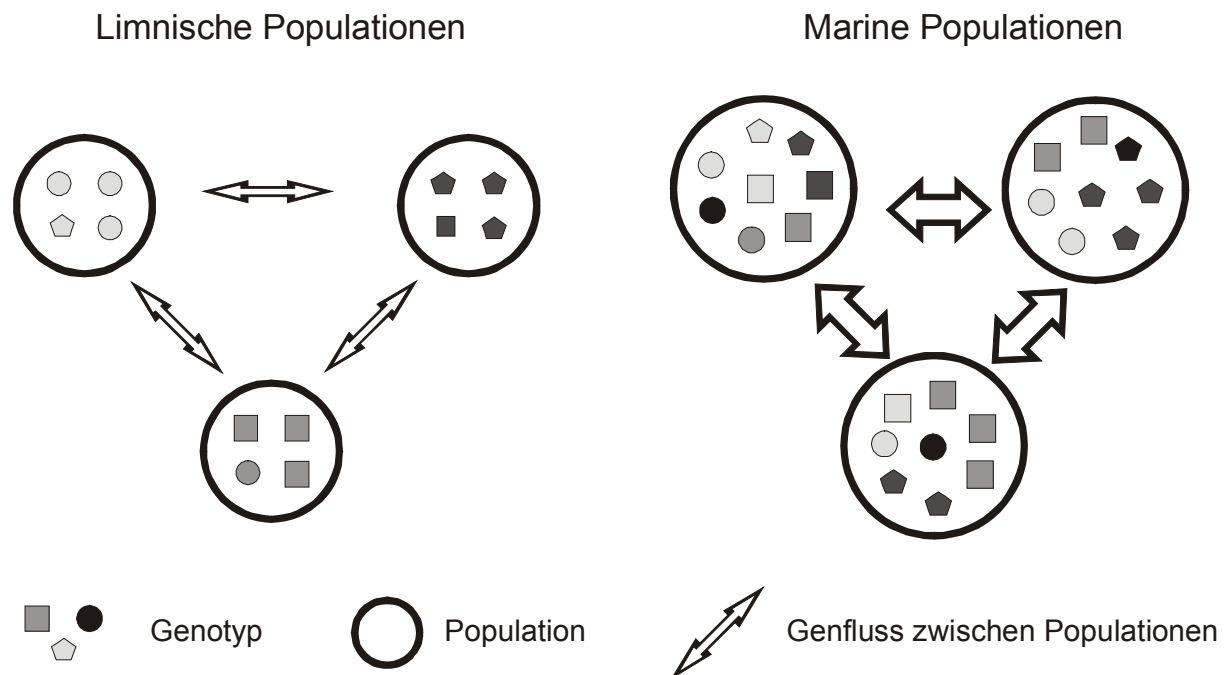


Abbildung 1.1: Konzept der genetischen Variabilität zwischen und innerhalb von Populationen. Bei limnischen Populationen ist im Vergleich zu marinen Populationen der Genfluss zwischen Populationen kleiner (kleinere Pfeile) und die effektive Populationsgröße geringer (kleinere Populationskreise und weniger Genotypen in den Populationen). Dadurch ist die genetische Differenzierung zwischen Populationen größer, die genetische Variabilität innerhalb von Populationen jedoch geringer.

1.4 Hypothesen

Ein Vergleich limnischer und mariner Populationen sollte daher die folgenden Muster zeigen:

- (1) Die genetische Differenzierung zwischen limnischen Populationen ist größer als bei vergleichbaren marinen Populationen. Oder anders formuliert: Bei gleicher geografischer Distanz ist die genetische Distanz bei limnischen Populationen größer als bei marinen Populationen. Sollte der genetische Austausch durch Vektoren jedoch sehr effektiv sein, so könnte die Alternativhypothese lauten: Durch den effektiven Transport von Genen durch Vektoren wie Wasservögel ist eine unterschiedliche genetische

Differenzierung zwischen limnischen und marinen Populationen nicht feststellbar. Die beobachteten Muster werden maßgeblicher von anderen Faktoren wie dem Fortpflanzungssystem, dem Blütenaufbau oder dem Bestäubungsmechanismus überlagert.

- (2) Die genetische Diversität innerhalb von Populationen ist bei limnischen Habitaten geringer als bei marinen. Darüber hinaus könnten andere Prozesse wie unterschiedliche Habitatsbedingungen oder nacheiszeitliche Wiederbesiedlung Einfluss auf Populationsstrukturen haben und erwartete Muster überlagern. In diesem Falle könnte die Alternativhypothese lauten: Durch andere Prozesse verliert die effektive Populationsgröße an Einfluss auf populationsgenetische Strukturen und die genetische Differenzierung innerhalb von Populationen ist bei limnischen und marinen Habitaten gleich.

1.5 Zielart: *Potamogeton pectinatus* L.

Das für diese Studie ausgewählte Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* ist besonders dazu geeignet, den Einfluss von Habitatsstrukturen und Struktur des Lebensraumes auf genetische Diversität zu erforschen. Diese limnische, submerse Makrophytenart ist weltweit verbreitet und toleriert Salzgehalte bis 15 ‰ problemlos (Orth *et al.*, 1979; Verhoeven, 1980), wobei auch Werte bis zu 53 ‰ dokumentiert sind (Hammer & Heseltine, 1988). Sie kommt damit sowohl in der Ostsee als auch den ostseenahe Seen vor. Dies ermöglicht den Vergleich der beiden Habitatstypen, da von einer ähnlichen historischen Wiederbesiedlungsgeschichte nach der letzten Eiszeit ausgegangen werden kann und Unterschiede auf die Habitatstypen und nicht auf unterschiedlich lange Lebenshistorien zurück zu führen sind.

Wie die meisten limnischen und marinen Angiospermen ist auch *Potamogeton pectinatus* in der Lage, sich durch Fragmente, Ausläufer oder Dauerknospen asexuell zu verbreiten (Casper & Krausch, 1980; Denhartog, 1970). Die oberirdische Biomasse von *P. pectinatus* ist annuell, genetisch gesehen stellen die Pflanzen aber langlebige Organismen dar. *Potamogeton pectinatus* überwintert in unseren Breitengraden im Sediment als Knollen (Abbildung 1.2). Diese vegetativen Organe dienen sowohl der Vermehrung und Verbreitung als auch der Überbrückung

ungünstiger Klimabedingungen. Im Frühsommer, bei steigenden Wassertemperaturen, treiben die Knollen zu Pflanzen aus. Aus jeder Knolle entsteht zunächst eine Pflanze. Die Wurzeln verbreiten sich im Boden und bilden in regelmäßigen Abständen neue Pflanzen, so dass eine Art Wiese entsteht, deren Pflanzen untereinander über Wurzeln verbunden sind. An jedem neuen Austrieb werden auch neue Knollen gebildet. Zusätzlich dazu werden bei optimalen Bedingungen und genügend langer Saison an einzelnen Zweigen Blüten gebildet. Die Pflanzen sind Hermaphroditen, und die Blüten wachsen bis zur Wasseroberfläche. Der freigesetzte Pollen schwimmt an der Wasseroberfläche und wird so zu anderen Blüten verdriftet. Nach erfolgter Befruchtung können sich die daraus entstandenen Früchte im Sediment ansiedeln. Eine neue Pflanze bildet ebenfalls Knollen und breitet sich durch die Wurzelbildung mit neuen Pflanzentrieben aus. Am Ende der Vegetationsperiode sterben alle Pflanzenteile ab und nur die Knollen überleben den Winter. Stellenweise können an einzelnen Standorten auch die Wurzeln überwintern, im Regelfall jedoch nur die Knollen (Abbildung 1.2).

Physikalisch und physiologisch eigenständigen Pflanzentriebe werden als Rameten bezeichnet (Harper, 1977). Die Gesamtheit aller Pflanzentriebe, die aus einer Pflanze durch Ausläufer im Laufe einer Wachstumsperiode oder aus Knospen hervorgegangen sind, gehört zu einem Klon, ist genetisch identisch und wird als Genet bezeichnet. Wenn sie über Wurzeln miteinander verbunden sind, ist eine Zuordnung von Rameten zu Geneten einfach. Da aber die Wurzeln im Winter absterben, können genetisch identische Triebe einer Pflanze physiologisch getrennt sein.

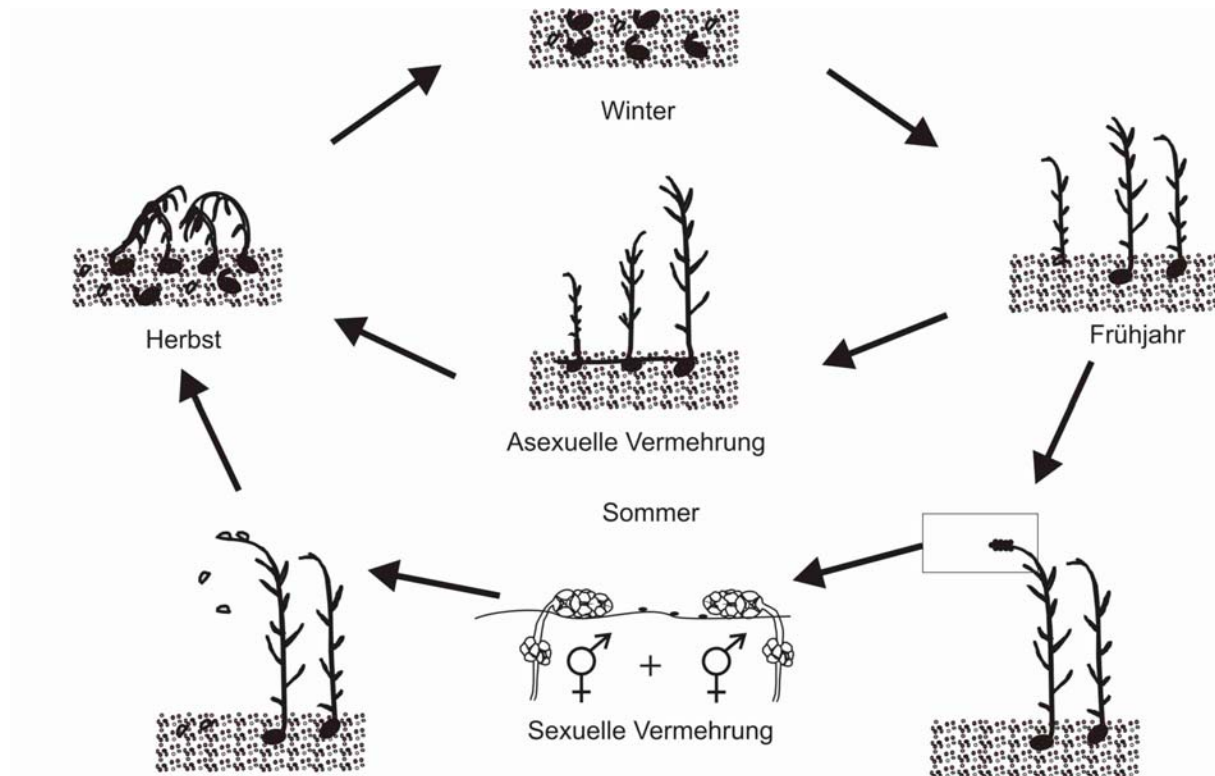


Abbildung 1.2: Lebenszyklus von *Potamogeton pectinatus*. *Potamogeton pectinatus* überwintert im Sediment als Knollen. Nach dem Wachsen der Pflanzen im Frühjahr kommt es entweder zur asexuellen oder sexuellen Vermehrung, bevor die Pflanzentriebe im Herbst absterben. Die Einzelheiten sind im Text erklärt.

1.6 Gliederung der Arbeit

Diese Arbeit vergleicht die genetischen Strukturen von limnischen und marinen Populationen des Kamm-Laichkrauts *Potamogeton pectinatus*. Um Aussagen über Populationsstrukturen und Genfluss zwischen Populationen treffen zu können, wurden dafür zunächst Mikrosatelliten etabliert. Dies geschah mit Hilfe von DNA-Bibliotheken, die für Mikrosatelliten-Motive angereichert wurden. Dieses zum Teil recht langwierige Verfahren ist in Kapitel 2 in seinen wesentlichen Schritten dargestellt. Dort ist auch der technische Ablauf der Mikrosatellitenanalyse für die weiteren Kapitel beschrieben.

Bei der Analyse der Daten zeigten sich dann ungewöhnliche Muster, die nicht nur von normalen Mutationen erzeugt werden konnten. Aufgrund von Besonderheiten im Lebenszyklus von *Potamogeton pectinatus* spielen somatische Mutationen eine größere Rolle. Der Nachweis somatischer Mutationen und deren Einfluss auf Populationsstrukturen ist daher in Kapitel 3 dargestellt.

Im vierten Teil wird dann ein Vergleich der genetischen Strukturen innerhalb von limnischen und marinen Populationen durchgeführt. Dabei betrachte ich den Verlauf der genetischen und klonalen Diversität längs des vermuteten nacheiszeitlichen Besiedlungsweges von West nach Ost. Da sich Diversität bei asexuellen Arten auf den Ebenen der klonalen Diversität und der genetischen Diversität widerspiegeln können, wird dabei auf beide Ebenen eingegangen.

Thema des fünften Kapitels ist der Vergleich der genetischen Differenzierung zwischen limnischen und marinen Populationen als indirekter Indikator für den Genfluss zwischen Populationen in den jeweiligen Habitaten. Wie effektiv der Transport durch Vektoren in Relation zum Austausch über den Wasserkörper sein kann, wird dort aufgezeigt.

2 Identifizierung und Charakterisierung von Mikrosatelliten-Markern bei *Potamogeton pectinatus* L.

2.1 Einleitung

Wasserpflanzen haben in See-Ökosystemen eine besondere Bedeutung. Neben ihrer Funktion als „Kinderstube“ für Jungfische konnte nachgewiesen werden, dass Wasserpflanzen das Aufwirbeln von Bodenmaterial reduzieren (James & Barko, 1990), als Rückzugsgebiet von phytoplankton-fressendem Zooplankton vor Fischen genutzt werden (Hosper, 1989) oder eine Nährstoffkonkurrenz für Algen darstellen können (van Donk *et al.*, 1990). Somit können Wasserpflanzen einen entscheidenden Einfluss auf die Trübung von Seen haben (Scheffer *et al.*, 1993).

Das Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* ist eine weltweit verbreitete Makrophyte, die in vielen Seen bestandbildend ist. Als solche ist sie von großer Bedeutung im Ökosystem See.

Neben der ökologischen Bedeutung stellt *Potamogeton pectinatus* aus populationsgenetischer Sicht eine interessante Art dar. Zum einen vermehrt sich das Kamm-Laichkraut sowohl sexuell als auch asexuell, wobei die Bedeutung und Häufigkeit der asexuellen Vermehrung bisher unbekannt ist. Auch Variationen bei unterschiedlichen Lebensbedingungen sind ungeklärt. Ein weiterer Aspekt von *Potamogeton pectinatus* für populationsgenetische Studien liegt in der Habitatstoleranz. Das Kamm-Laichkraut ist eine der seltenen Arten, die sowohl in limnischen als auch in marinen Habitaten vorkommen. Die Analyse von Unterschieden im Genfluss zwischen Populationen der verschiedenen Habitatstypen lassen direkte Schlüsse auf die Bedeutung der Beschaffenheit des Lebensraumes auf populationsgenetische Strukturen zu.

Um solche Untersuchungen durchzuführen, sind genetische Methoden wie die Analyse von Mikrosatelliten notwendig, die eine Identifizierung auf Individuen-Ebene ermöglichen. Mikrosatelliten bestehen aus einfachen DNA Sequenzmotiven von

einem bis sechs bp Länge - etwa $(CA)_n$ oder $(GATA)_n$ -, die sich tandemartig wiederholen (Tautz, 1989). Typischerweise folgen etwa 10 bis 50 dieser Bausteine aufeinander (Ellegren *et al.*, 1992). Dabei erreichen Mikrosatelliten selten eine Länge von über 100 Basenpaaren, was vorteilhaft für die PCR-Amplifikation ist (Rassmann *et al.*, 1991). In der Populationsgenetik werden Mikrosatelliten wegen ihres hohen Polymorphiegrades als höchstauflösende Methode gerne zur Differenzierung und Charakterisierung von Populationen benutzt (Bruford & Altmann, 1993; Dow *et al.*, 1995; Palumbi, 1996; Reusch *et al.*, 1999b). Dies liegt zum einen daran, dass Mikrosatelliten zur funktionslosen, nichtkodierenden DNA des Genoms gehören, bei der es für die Einführung und den Erhalt von Sequenzänderungen wenige Beschränkungen gibt. Dies gilt ,solange nicht wichtige Funktionen wie zum Beispiel die Chromosomenstruktur davon beeinträchtigt werden (Selektive Neutralität). Zum anderen wird die hohe Mutationsrate durch die Struktur der repetitiven Sequenzen begründet: Infolge einer Fehlpaarung durch Strangverschiebung (slipped-strand-mispairing, Levinson & Gutman, 1987) kann es bei der Replikation zur Verkürzung oder Verlängerung von meist einer Wiederholungseinheit kommen (sog. „stepwise mutation model“). Dabei sind Expansionen häufiger als Kontraktionen (Amos *et al.*, 1996), allerdings nur bis zu einer bestimmten Maximal-Länge, bei deren Überschreitung Mikrosatelliten vermutlich kollabieren. Bei allen Allelen eines Mikrosatelliten handelt es sich somit um Längenvarianten, die sich in der Anzahl der wiederholten Einheiten unterscheiden.

Die Mutationsrate liegt bei 10^{-4} bis 10^{-5} pro Gamet (Dallas, 1992; Edwards *et al.*, 1992; Schlotterer & Tautz, 1992; Weissenbach *et al.*, 1992), was hoch genug ist, um informativ zu sein, aber niedrig genug, um eine weitgehend stabile Vererbung der Längenallege zwischen den Generationen voraussetzen zu können. Den höchsten Polymorphiegrad zeigen die perfekten (nicht unterbrochenen und nicht zusammengesetzten) Mikrosatelliten, die mindestens 12 Wiederholungseinheiten lang sind (Weber, 1990). Normalerweise haben Mikrosatelliten viele Allele (oft über 10) und Heterozygotiegrade von 40 bis 90% (Beckmann & Weber, 1992; Dallas, 1992; Hughes & Queller, 1993).

Mikrosatelliten sind im gesamten eukaryotischen Kerngenom verteilt (Hamada *et al.*, 1982; Tautz & Renz, 1984) und etwa alle 6000 Basenpaare sind beim Menschen entsprechende Regionen zu finden (Beckmann & Weber, 1992). Die Häufigkeit variiert jedoch von Art zu Art sehr stark und zum Teil sind sie wesentlich seltener als

beim Menschen. Die Etablierung von Mikrosatelliten kann ein langwieriger Prozess sein, bei dem Standardprotokolle zum Teil stark modifiziert werden müssen, bis geeignete Mikrosatelliten zur Verfügung stehen.

Da vor allem bei Pflanzen Mikrosatelliten im Genom relativ selten sind, werden bei der Suche nach Mikrosatellitenloci die gewünschten DNA-Bereiche angereichert. Grundprinzip der Anreicherung ist eine Koppelung der Ziel-DNA an Oligonukleotide mit Mikrosatellitenmotiven, die ihrerseits an magnetische Partikel, so genannte Beads, gebunden werden. Über einen Magneten kann dann die DNA gezielt zurückgehalten werden, während in den Waschschrritten unspezifisch angebundene und nicht gebundene DNA entfernt wird. Dadurch ist eine effektive Suche nach Mikrosatelliten möglich.

2.2 Etablierung einer angereicherten DNA-Bibliothek

2.2.1 Methode

Zunächst wurden größere Mengen DNA mit der CTAB Methode (Doyle & Doyle, 1987) isoliert, wobei eine Isolation mit dem QiaQuick Plant Isolation Maxi Kit (Qiagen) ebenfalls möglich war. Die gesamte DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A geschnitten und in einen doppelsträngigen Adapter ligiert.

Der benutzte Adapter wurde aus zwei komplementären Oligonukleotiden (Adapter F 5'-TTGCTTACGCGTGGACTC-3'; Adapter R 5'-GATCGAGTCCACGCGTAAGCAA-3') hergestellt, so dass ein Überhang zur Ligation an die geschnittene DNA vorhanden war. Die anligierten Adapter stellten gleichzeitig bekannte Ansatzstellen für PCR-Primer dar, mit deren Hilfe über eine PCR (Mullis *et al.*, 1986) größere Mengen Ausgangs-DNA erstellt werden konnten (Tabelle 2.1). Als Primer wurden dazu nur der Adapter F benutzt, weil der Adapter selbst-komplementär war.

Tabelle 2.1: PCR Bedingungen für die PCR-Reaktion vor der Anreicherung. Angegeben sind die benutzten Reagenzien mit ihren Konzentrationsangaben, das Reaktionsvolumen sowie die Dauer D und Temperatur T der PCR Schritte sowie die Anzahl der Wiederholungen W der Schritte 2 bis 4.

Reagenz	Volumen [μ l]
Puffer [10x]	5
BSA [1%]	5
dNTPs [1mM]	5
MgCl ₂ [50mM]	3
Primer [10 μ M]	1
Ligationsmix [15ng DNA]	1
Taq [5U]	0,5
Wasser	25,5
Total	50

	T	D	W
1. Denaturierung	94° C	4 min	
2. Denaturierung	94° C	1 min	
3. Primer-Hybridisierung	57° C	1 min	26 x
4. Polymerisation	72° C	2 min	
5. Finale Polymerisation	72° C	30 min	

Die folgende Anreicherung erfolgte im wesentlichen nach den Protokollen von Kijas *et al.* (1994) sowie Hamilton *et al.* (1999). Als Oligonukleotide wurden 5'-Biotin-markierte (CA)₁₃ und (GA)₁₃ verwendet. Da nur eine verschwindend kleine Fraktion von DNA-Fragmenten in der Anreicherung verbleibt, erfolgte nach der Anreicherung eine weitere PCR. Das PCR-Produkt wurde dann mit Hilfe einer TA-Klonierung in einen geeigneten Vektor ligiert und in kompetente Zellen transformiert. Die Transformation erfolgte in ultracompetente *E. coli*-Zellen (XL2-Blue MRF', Stratagene). Erhaltene Klone wurden mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche) getestet und positive Bakterienklone wurden mit dem BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems) auf einem ABI 3100 (Applied Biosystems) sequenziert.

Zur weiteren Verwendung waren Sequenzen mit den folgenden Eigenschaften geeignet:

- Einwandfreie Sequenzen ohne unbekannte Basen am Rand der Mikrosatelliten
- Mikrosatelliten lagen in der Mitte der Sequenz mit flankierenden Regionen von mindestens 25 Basenpaaren (bp)
- Mikrosatelliten waren nicht unterbrochen von anderen Sequenzen
- Mikrosatelliten bestanden aus mindestens 10 Wiederholungseinheiten
- Die Sequenz enthielt nicht die Sequenz des Adapters

Für alle Sequenzen mit solchen Eigenschaften wurden Primer mit dem online Programm Primer 3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) entworfen. Dabei wurden für die Primer wichtigen Eigenschaften festgelegt und nach Möglichkeit auch nur solche Primer bestellt, die nachfolgende Kriterien erfüllten:

- Länge der Primer zwischen 20bp und 25bp, optimal 20bp
- Länge des PCR-Produktes zwischen 100bp und 250bp
- Primer-Hybridisierungs-Temperatur von 60°C
- Temperaturdifferenz im Schmelzpunkt der Primerpaare von maximal 1°C
- GC Gehalt der Primer von 50%, möglichst zwischen 40% und 60%.

Die gefundenen Primer wurden am 5'-Ende mit einem Farbstoff markiert, durch den eine optische Detektion nach Fluoreszenzanregung in einem Genetischen Analyser (ABI 3100) möglich war. Durch Optimierungen der Reaktionsbedingungen war ein Poolen von bis zu 3 Primern bereits in der PCR möglich. Nach erfolgreicher PCR (Tabelle 2.2) wurden die Fragmentlängen auf einem ABI 3100 nach elektrophoretischer Größenauftrennung bestimmt. Absolute Fragmentlängen (in Basenpaaren) konnten relativ zu einem internen Standard errechnet werden (Rox 350, Applied Biosystems), welcher in jeder Probe mitgeführt wurde. Mit der Software GENESCAN (Applied Biosystems) wurden die Fragmentlängen ermittelt. Bei der anschließenden Analyse mit der Software GENOTYPER (Applied Biosystems) wurden Fragmentgrößenklassen gebildet, die den Allelen der jeweiligen Loci

entsprechen. Im Anhang befindet sich eine Tabelle mit den Allelkategorien. Jedes Allel aller Loci wurde einer Klasse zugeordnet und die Ergebnisse aller Loci wurden je Ramet in Tabellen exportiert. In EXCEL (Microsoft) erfolgte eine Zuordnung und Aufbereitung der Daten für andere Programme wie GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996 - 2002).

Tabelle 2.2: PCR Bedingungen für alle gefundenen Mikrosatellitenloci. Angegeben sind die benutzten Reagenzien mit ihren Konzentrationsangaben, das Reaktionsvolumen sowie die Dauer D und Temperatur T der PCR Schritte sowie die Anzahl der Wiederholungen W der Schritte 2 bis 4.

Reagenz	Volumen [μ l]
Puffer [10x]	2
BSA [1%]	2
dNTPs [1mM]	2
MgCl ₂ [50mM]	2
Primer 1 [10 μ M]	1
Primer 2 [10 μ M]	1
DNA	1
Taq [1U]	0,15
Wasser	8,85
Total	20

	T	D	W
1. Denaturierung	94° C	4 min	
2. Denaturierung	94° C	1 min	
3. Primer-Hybridisierung	57° C	1 min	26 x
4. Polymerisation	72° C	2 min	
5. Finale Polymerisation	72° C	30 min	

Um zu überprüfen, wie viele Primer zur Identifizierung von Geneten (=Klonen) notwendig sind, wurde für eine Population der folgende Test durchgeführt. Zunächst wurde die Anzahl von identifizierbaren unterschiedlichen Individuen mit zwei Primern berechnet. Dies geschah mit allen möglichen Kombinationen von Primern. Danach wurde das Gleiche mit 3 Primern getestet und im nächsten Schritt mit 4, bis man mit allen Primern testete. Die Berechnung wurde mit allen Populationen durchgeführt und am Ende als relative Häufigkeit der detektierten Genotypen gegen die Anzahl der zur Identifikation genutzten Primer graphisch dargestellt. Diese Darstellung

zeigte eine Sättigungskurve. Die Asymptote dieser Kurve beschreibt die Zahl der Loci, bei der alle Genotypen detektiert worden sind. Der Einsatz einer größeren Anzahl von Primern führt zu keiner weiteren Verbesserung der erhaltenen Informationen.

2.2.2 Ergebnisse

Die Suche nach geeigneten Mikrosatelliten stellte sich bei *Potamogeton pectinatus* als sehr langwierig und schwierig heraus. Der Grund dafür könnte die relative Seltenheit von Mikrosatelliten im Genom vom Kamm-Laichkraut sein. Nach verschiedenen Modifikationen konnten am Ende mit dem oben beschriebenen Protokoll Mikrosatelliten gefunden werden. Insgesamt wurden 26 DNA-Bibliotheken erstellt und 7400 Bakterien untersucht, bis am Ende 10 Mikrosatellitenloci (Tabelle 2.4) für *Potamogeton pectinatus* erfolgreich eingesetzt werden konnten.

Tabelle 2.4: Mikrosatellitenloci, deren Vorwärtsprimer (F) und Rückwärtsprimer (R), die Länge der sequenzierten Wiederholungseinheit, das bestellte ABI Prism-Label am 5'-Ende sowie der Pool, in dem der Mikrosatellitenloci gemeinsam mit anderen mit einer PCR analysiert werden konnte.

Genort	Primer (5' zu 3')	Wiederholungseinheit	Label	Pool
Potpect 24	F: TCA GTG AAA GAA AGC CAG GA R: GGG CTT ATG GCG TTA TCA A	(GA) ₁₃	NED	3
Potpect 26	F: GTA TAG GCG AGG TGC GAG AG R: CTT CAT GTC GAC CAC CTT CC	(CT) ₁₃	FAM	2
Potpect 28	F: TCG TTT CCT CCA TTC GTA GG R: AAA TAA AAA GGG CCC AGA CC	(GA) ₁₃	FAM	1
Potpect 32	F: CAG CAA ACG AAA CAA CCA AA R: AAA AGA AGC CGT TGT TTA CAG AG	(GA) ₁₉	HEX	1
Potpect 34	F: GTA AGG CAA GCA GCG TCA AC R: GTT TGT GAG CTA GCG GGA AG	(GA) ₁₂	FAM	1
Potpect 37	F: CAC TTC CTC TGT GCT GCT TG R: GCG TGC TCT TCC TGA GTT CT	(CT) ₁₉	HEX	3
Potpect 38	F: TCT CAC GTT TCG GTC AAG AG R: TGT ATT CTT CAC AAC CCT ATG TTG A	(GA) ₁₄	HEX	
Potpect 39	F: TCA CAA CAC CTC ACC CAG AA R: CCA TTT CCA TTC CTC ACT GC	(GA) ₁₄	HEX	2
Potpect 40	F: AAA TCT CCA AAT ATT TCC ACT GTT G R: CAA AGA TTG AGC TCC CCA AA	(GA) ₁₅	NED	2
Potpect 42	F: TTA GCA AGT GGG TGG GTT TC R: TGC ACT CGT GTG TCT CTT CC	(CT) ₁₂	NED	1

2.2.3 Überprüfung der Mikrosatelliten

Insgesamt wurden 859 Rameten aus 12 limnischen und 14 marinen Populationen analysiert (Kapitel 4). Zwischen 6 und 17 Allele konnten an den einzelnen Loci beobachtet werden, wobei die beobachtete Heterozygotie zwischen 0,32 und 0,67 lag (Tabelle 2.5).

Bei den dem Kamm-Laichraut *Potamogeton pectinatus* nah verwandten Arten *Potamogeton filiformes*, *Potamogeton perfoliatus*, *Ruppia cirrhosa* und *Zannichelia palustris* war eine Amplifikation mit den Primern nicht möglich. Sequenzierungen der ITS-Region zeigten ebenfalls große Unterschiede zwischen diesen Arten. Die gemeinsamen Sequenzen der ITS-Region lagen zwischen *Potamogeton pectinatus* und *Zannichelia palustris* bei 77% gleichen Basenpaaren und zwischen *Potamogeton pectinatus* und *Ruppia cirrhosa* bei 52% gleichen Basenpaaren. Dies spricht für eine taxonomisch langzeitliche Separation der Arten.

Tabelle 2.5: Anzahl der beobachteten Allele pro Genort, die beobachteten Allellängen bei der Analyse von 859 Rameten sowie die beobachtete Heterozygotie H_o berechnet über alle Populationen.

Genort	Anzahl beobachteter Allele	Beobachtete Allellängen [bp]	Heterozygotie H_o
Potpect 24	14	149 - 185	0,63
Potpect 26	17	222 - 278	0,64
Potpect 28	10	161 - 187	0,56
Potpect 32	14	220 - 254	0,33
Potpect 34	15	224 - 256	0,32
Potpect 37	15	143 - 179	0,39
Potpect 38	6	135 - 159	0,50
Potpect 39	18	226 - 278	0,64
Potpect 40	15	180 - 216	0,67
Potpect 42	15	184 - 210	0,59

Die Überprüfung, wie viele Primer zur Identifizierung von Geneten notwendig sind, wurde für alle Population durchgeführt (Abbildung 2.1). Eine Sättigung ist bei 9 Primern zu erkennen, so dass bei den weiteren Untersuchungen 9 Loci genügend Informationen zur Detektierung der Geneten liefern.

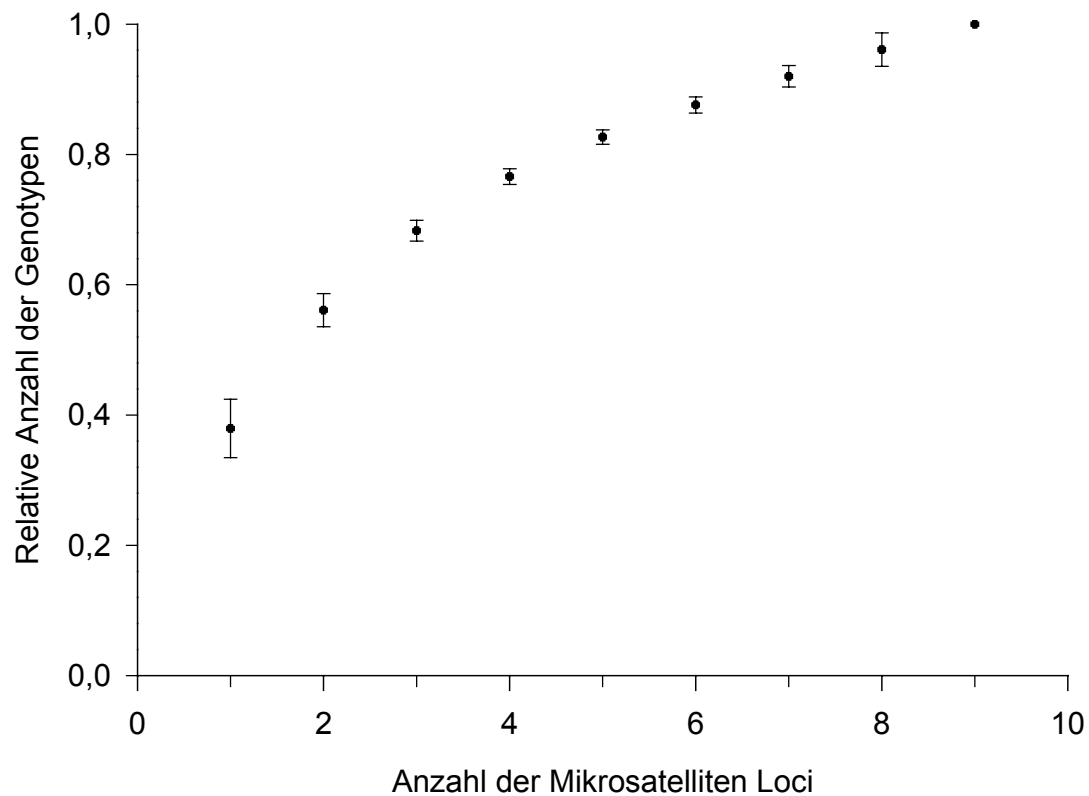


Abbildung 2.1: Anzahl der detektierbaren Genotypen analysiert mit unterschiedlicher Anzahl von benutzten Mikrosatellitenloci. Für jede Population wurde jeweils berechnet, wie viele Genotypen bei welcher Anzahl benutzter Mikrosatellitenloci detektiert werden können. Zur Normierung wurde die relative Anzahl je Population aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung zwischen den einzelnen Populationen.

3 Einfluss somatischer Mutationen auf intraklonale Variation und Populationsstrukturen

3.1 Einleitung

Unter Mutationen versteht man eine zeitliche Veränderung der genetischen Information. Sie lassen sich unterteilen in Genmutationen, die Veränderungen in der Primärstruktur bewirken und einzelne Genorte betreffen, in Strukturmutationen, die Chromosomenabschnitte verändern, und in Chromosomenmutationen mit Änderungen in der Anzahl der Chromosomen. Mutationen sind für die Entstehung von genetischer Variabilität in Individuen und somit auch in Populationen ursächlich verantwortlich. Als zwei Hauptklassen von Mutationen lassen sich somatische Mutationen und gametische Mutationen unterscheiden. Gametische Mutationen, häufig auch meiotische Mutationen genannt, sind Änderungen der genetischen Informationen während der meiotischen Teilung. Somatische Mutationen dagegen sind Änderungen der DNA während der mitotischen Teilung. Der fundamentalste Unterschied zwischen diesen beiden ist die Weitergabe entsprechender Änderungen an Nachkommen. Für Organismen mit sexueller Fortpflanzung spielen meiotische Mutationen die entscheidende Rolle für die genetische Variabilität, da Veränderungen sich direkt auf Nachkommen auswirken und sich in einer Population etablieren können. Somatische Mutationen bewirken zunächst nur eine größere genetische Variabilität innerhalb eines Individuums. Es existieren dann innerhalb eines Organismus genetisch unterschiedliche Zelllinien, die auch als Chimären bezeichnet werden. Die Weitergabe entsprechender Mutationen an die Nachkommen ist nicht zwangsläufig wie bei meiotischen Mutationen. Jedoch können Fehler, die in der DNA-Replikation während der mitotischen Teilung auftreten und nicht während der vegetativen Wachstumsphase ausselektiert werden, weitergereicht werden an die Gameten (Klekowski, 1997). Unter diesen Voraussetzungen könnten somatische Mutationen einen entscheidenden Einfluss auf populationsgenetische Strukturen haben. So führen somatische Mutationen zur Änderung von Allelfrequenzen

innerhalb von Populationen (Orive, 2001), Änderung der Heterozygotie (Gill *et al.*, 1985), Änderung von historischen Mustern wie Inzuchtdepressionen und Evolution des Fortpflanzungssystems (Morgan, 2001) sowie zur Produktion einer adaptiven Variabilität innerhalb von Pflanzentrieben (Antolin & Strobeck, 1985; Walbot, 1986; Whitham & Slobodchikoff, 1981).

Die wirkliche Bedeutung somatischer Mutationen ist jedoch unklar und ihr Beitrag zur adaptiven Variabilität innerhalb von Pflanzentrieben ist Gegenstand von Diskussionen. In der Regel ist die überwiegende Mehrzahl somatischer Mutationen (wie auch meiotischer Mutationen) bei transkribierten Abschnitten schädlich und führen zur Ausselektion oder Lebensunfähigkeit entsprechender Träger. Treten somatische Mutationen jedoch bei nicht-transkribierten Regionen auf, so sind sie ohne selektive Folgen für den Organismus und können in der Population verbleiben. Dies ist vor allem von Bedeutung, wenn die Populationsstruktur mit Hilfe von hochpolymorphen DNA-Markern untersucht werden soll. Wegen der sehr hohen Mutationsrate und der selektiven Neutralität ist die Mikrosatellitenanalyse eine Methode, die besonders für das Detektieren von somatischen Mutationen geeignet ist. So konnten Franks *et al.* (2002) bei der Weinrebe *Vitis vinifera*, die seit ca. 9000 bis 8000 Jahren durch Menschenhand selektiert und kloniert wird (Eynard & Dalmasso, 1990), somatische Mutationen durch das Vorhandensein von mehr als zwei Allelen je Locus nachweisen.

Spielen somatische Mutationen bei populationsgenetischen Untersuchungen mit Mikrosatelliten eine Rolle, so erzeugen sie eine Reihe von ungewöhnlichen Mustern. Hauptproblem ist eine Überschätzung der klonalen Diversität. Somatische Mutationen erzeugen zusätzlich zu den normalen, populationsgenetischen Faktoren einen Unterschied zwischen eigentlich genetisch identischen Individuen. Zusätzlich dazu werden mehr Heterozygote detektiert, da ursprünglich Homozygote durch das Auftreten von somatischen Mutationen als Heterozygote aufgezeigt werden. Ursprünglich Heterozygote wiederum können durch somatische Mutationen 3 Allele an einem Genort bekommen. Dadurch können sich Heterozygotiegrade ändern (Gill *et al.*, 1985), was schlussendlich eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bewirken kann.

Langlebige Pflanzen mit zum Teil häufiger asexueller Vermehrung stellen die Organismengruppe dar, bei der es am besten möglich sein sollte, somatische Mutationen nachzuweisen (Klekowski & Godfrey, 1989). Pflanzen können zum Teil

sehr alt werden. Dokumentiert sind zum Beispiel 2000 Jahre alte Klone von *Carix curvula* (Steinger *et al.*, 1996) oder einzelne Klone des Baums *Populus tremuloides* über eine Fläche von 81 ha bei einem Alter von mehr als 10.000 Jahren (Kemperman & Barnes, 1976). Für aquatische Pflanzen konnten Reusch *et al.* (1999a) beim Seegras *Zostera marina* einen Klon mit einer Größe von 160 x 40 Metern mit einem geschätzten Alter von über 1000 Jahren identifizieren. Die lange Lebensdauer kann zur Akkumulierung von somatischen Mutationen führen und asexuelle Vermehrung führt zur Weitergabe der somatischen Mutationen. So konnte für eine Reihe von Pflanzen innerhalb natürlich vorkommender Klone eine genetische Variation innerhalb von Individuen detektiert werden (Capossela *et al.*, 1992; Schaal & Learn, 1988; Tuskan *et al.*, 1996).

Tritt eine somatische Mutation direkt am Anfang des Wachstums einer Pflanze im apikalen Spitzenmeristem auf, so ist deren Einfluss auf die gesamte Pflanze sehr groß. Tritt die somatische Mutation zu einem sehr späten Zeitpunkt auf, so sind nur wenige Bereiche z. B. ein Ast davon betroffen. Dafür ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Mutation auftritt, in einer späteren Wachstumsphase größer als zu Beginn (Klekowski, 1997).

Ein bekanntes Beispiel für somatische Mutationen ist bei *Rhizophora mangle*, einem Mangrovenbaum, zu finden. Bedingt durch somatische Mutationen können einzelne Äste einer Pflanze mit einer geringeren Menge oder sogar ganz frei von Chlorophyll sein (Klekowski & Godfrey, 1989). Da nur einzelne Äste, nicht jedoch die gesamte Pflanze davon betroffen ist, müssen somatische Mutationen für dieses Phänomen verantwortlich sein.

Das Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* L. ist eine Pflanze, bei der einige Besonderheiten im Lebenszyklus die Bedeutung von somatischen Mutationen erhöhen. Die oberirdische Biomasse von *P. pectinatus* ist annuell, genetisch gesehen stellen sie aber langlebige Organismen dar. Die Kombination aus häufiger asexueller Vermehrung und dem jährlichen apikalen Spitzenwachstum beim Auskeimen der Knollen erhöht die Wahrscheinlichkeit somatischer Mutationen.

Bei populationsgenetischen Untersuchungen an *Potamogeton pectinatus* zeigen die dabei verwendeten Mikrosatelliten zum Teil ein Genotypen-Muster auf, welches nicht einem diploiden Erbgang entspricht. Gleichzeitig zeigen die entwickelten Marker extremes Kopplungsungleichgewicht sowie eine starke Abweichung vom Hardy-

Weinberg-Gleichgewicht. Im Folgenden soll untersucht werden, ob diese Muster durch somatische Mutationen hervorgerufen werden könnten.

3.2 Material und Methode

Für die Untersuchung wurden insgesamt 859 Pflanzenproben von *Potamogeton pectinatus* analysiert. Die Pflanzen stammten aus 12 Seen und 14 marinen Standorten in Norddeutschland (Tabelle 4.1). Die Analyse erfolgte mit 9 Mikrosatelliten (Tabelle 2.4).

Der Nachweis somatischer Mutationen ist recht schwierig und sollte im Idealfall durch direkte Experimente erfolgen. Dies war im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch nicht möglich. Eine indirekte Möglichkeit Variationen eines Klons nachzuweisen, die durch somatische Mutationen entstanden sind, wird von Douhovnikoff & Dodd (2003) vorgestellt. Dazu wurden paarweise Ähnlichkeiten zwischen Rameten erstellt und ein Grenzwert berechnet, ab dem detektierte Rameten einem Klon zugeordnet werden. In ähnlicher Weise wurde auch im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von somatischen Mutationen detektiert, wobei im Folgenden eine Reihe von Ergebnissen vorgestellt werden, die somatische Mutationen als Ursache für die beobachteten Genotypenmuster und Verteilungen wahrscheinlich erscheinen lassen.

Somatische Mutationen führen innerhalb einer Population zu Gruppen von Rameten desselben Klons, die sich in nur ein bis drei Allelen unterscheiden. Um einzelne Abweichungen zwischen Individuen einer Population festzustellen, wurde ein selbst entwickeltes Computerprogramm DIFFS benutzt (NIES, KRAMBECK & REUSCH unpubliziert). Dieses Programm berechnete die Anzahl unterschiedlicher Allele zwischen Individuen einer Population. Dazu wurden die Allele an einem Genort auf Ungleichheit untersucht und über alle Genorte aufsummiert. Dadurch wurde ein einfaches Distanzmaß (Anzahl der ungleichen Allele) erzeugt. Dieser Vergleich wurde jeweils paarweise durchgeführt zwischen allen Individuen einer Population. Eine Aufsummierung aller Vergleiche aller Individuen aller Populationen war ein Gesamtmaß für die genetische Verwandtschaft. Trägt man die Summe aller gleichnaher Verwandten (als Summe der relativen Häufigkeitsfrequenzen) gegen die Anzahl der ungleichen Allele auf, so sollte bei normalen Populationen eine Normalverteilung entstehen, deren Maximum bei einem Wert liegt, der dem

Heterozygotiegrad entspricht. Lagen jedoch somatische Mutationen vor, so war eine zweigipfelige Verteilung zu erwarten. Die sich durch wenige somatische Mutation voneinander unterscheidenden Genotypen, die eine Variation eines Klons sind, sollten zu einem zweiten Maximum bei einer geringen Anzahl von Unterschieden führen. Das Minimum zwischen den beiden Maxima stellte analog zu Douhovnikoff & Dodd (2003) den Grenzwert da, ab dem Variationen eines Klons durch somatische Mutationen erzeugt wurden.

Darüber hinaus könnten somatische Mutationen zu einem Kopplungsungleichgewicht führen. Zwei aus demselben Klon hervorgegangene Rameten, die sich nur an einem Genort unterscheiden, liefern für alle anderen untersuchten Orte jeweils ein Kopplungsungleichgewicht. Und sehr viele Nahverwandte erhöhen den Effekt, so dass ein Kopplungsungleichgewicht signifikant wird, obwohl es nicht physikalisch erzeugt worden ist. Der Test auf Kopplungsungleichgewicht wurde mit dem Programm GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) durchgeführt.

Des Weiteren führen nicht aufgedeckte somatische Mutationen zur Verwechslung von Homozygoten und Heterozygoten und zur Änderung des Heterozygotiegrades (GILL *et al.*, 1985). Die Folge ist dann eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG). Die Erfüllung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes ist Voraussetzung für die Berechnung weiterer populationsgenetischer Parameter. Der Test auf HWG erfolgte mit dem Programm GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den berechneten Kopplungsungleichgewichten und Hardy-Weinberg-Ungleichgewichten um Beobachtungen handelt, die auf somatische Mutationen zurückzuführen waren, wurden genetisch nahe Verwandte zu Gruppen zusammengefasst. Diese Zusammenfassung erfolgte nach folgenden Regeln:

- 1.) Die zusammengefassten Rameten mussten sehr nah miteinander verwandt sein. Die maximale Anzahl von unterschiedlichen Allelen betrug 4.
- 2.) Die Rameten bildeten Gruppen, die untereinander sehr eng miteinander verwandt waren, jedoch unterschieden sich diese Gruppen deutlich von anderen Populationsmitgliedern.

Von jeder Population wurde ein Phenogramm erstellt. Dazu wurde als Distanzmaß die Anzahl ungleicher Allele, erstellt mit dem Programm DIFFS, benutzt. Die Stammbäume selbst wurden mit der Software PHYLIP (Felsenstein, 1993) berechnet. Als Methode der Stammbaumerstellung wurde UPGMA (unweighted pairgroup method with arithmetic mean, Sneath & Sokal, 1973) gewählt. Der Vorteil

dieser besonderen Clusteranalyse ist die Erstellung von Stammbäumen durch das arithmetische, ungewichtete Mittel der Distanzdaten. Dies ermöglicht eine Erstellung von Phenogrammen auch innerhalb von Populationen, da außer gleichen Evolutionsraten keine weiteren Voraussetzungen erfüllt sein müssen.

Eine erneute Berechnung für das Kopplungsungleichgewicht und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sollte den Einfluss der somatischen Mutationen zeigen. Da eine Reduktion des Datensatzes ein Stichprobenproblem bewirken kann, wurden die Tests auf HWG und Kopplungsungleichgewicht mit einem auf die gleiche Datengröße reduzierten Datensatz noch mal berechnet, wobei die Reduktion des zweiten Datensatzes zufällig geschah.

Über das Verhältnis detektierter Rameten zu somatischen Variationen eines Klons lässt sich abschätzen, wie häufig somatische Mutationen in einzelnen Populationen vorkommen. Dieses Verhältnis wird berechnet durch die Anzahl der Rameten minus Anzahl der Variationen eines Klons minus eins geteilt durch die Anzahl der Rameten. Dieses Verhältnis kann Werte zwischen 0 und eins annehmen, wobei Populationen mit einem Verhältnis von eins nur aus Varianten bestehen, die durch somatische Mutationen aus einem Klon entstanden sind, während in Populationen mit einem Verhältnis von 0 gar keine somatischen Mutationen vorkommen. Das Verhältnis variiert zwischen Populationen stark und sollte vermehrt in Populationen mit häufiger asexuellen vorkommen. Zur Überprüfung wurde daher die Korrelation zwischen dem Verhältnis detektierbarer somatischer Variationen eines Klones und der klonalen Diversität (als Simpson's Index, siehe Kapitel 4) berechnet.

3.3 Ergebnisse

Von *Potamogeton pectinatus* wurden insgesamt 859 Rameten analysiert. Bei 23 Proben waren 3 deutliche Allele an einem Genort zu erkennen. Dies entspricht 2,6% der analysierten Pflanzen (Tabelle 3.1). Um zu überprüfen, ob es sich um PCR Artefakte handelt, wurden die Ergebnisse an 10 Proben, die zuvor 3 deutliche Allele gezeigt hatten, verifiziert. Es konnte bei keiner der Proben eine Änderung festgestellt werden.

Tabelle 3.1: In diesen Probenorten wurden 3 Allele an einem Genort detektiert. Neben dem Probenort und der Zuordnung, ob es sich um einen limnischen oder marinen Standort handelt, ist auch noch angegeben, wie viele Rameten an welchen Genorten betroffen waren.

Standort	Art des Standortes	Häufigkeit	Genort
Bojendorf	Marin	1	37
Dobbersdorfer See	Limnisch	1	39
Großer Plöner See	Limnisch	2	26+39
Gustrower Wiek	Marin	1	37
Gustrower Wiek	Marin	1	37
Harving	Marin	2	26
Kellersee	Limnisch	2	34
Kellersee	Limnisch	2	34
Kellersee	Limnisch	2	34
Kolpinsee	Limnisch	1	37
Schweriner See	Limnisch	1	26
Schweriner See	Limnisch	1	26
Schoritzer Wiek	Marin	1	28
Schoritzer Wiek	Marin	1	39
Schoritzer Wiek	Marin	1	42
Trammer See	Limnisch	1	34
Trammer See	Limnisch	1	34
Wamper Wiek	Marin	1	24

Der Vergleich paarweiser Unterschiede zwischen Genotypen zeigte deutlich eine zweigipfelige Verteilung (Abbildung 3.1) und stützte damit die Vermutung, dass sich ursprünglich genetisch identische Rameten durch somatische Mutationen in verschiedene Genotypen ausdifferenzieren. Das erste Maximum bei einem Unterschied und das Minimum bei 3 bis 4 Unterschieden wurde von Gruppen sehr nahe Verwandter erzeugt, für die somatische Mutationen verantwortlich sein könnten. Das zweite Maximum lag bei 8 unterschiedlichen Allelen und entsprach dem durchschnittlichen Heterozygotiegrad. 8 von 18 möglichen Allelen ergab einen Quotienten von 0,44, die durchschnittliche beobachtete Heterozygotie lag bei den Proben bei 0,48 (Kapitel 4). In der Verteilung war noch ein drittes Maximum bei 16 unterschiedlichen Allelen zu sehen. Dies wurde verursacht durch ein seltenes Migrationsereignis in der limnischen Population Großer Plöner See. Die nächsten Verwandten dieser Immigranten waren in der marinen Population Großenbrode zu finden. Dadurch waren innerhalb der Population des Großen Plöner Sees weitere Abstände (16) zu beobachten, als es bei allen anderen Populationen der Fall war.

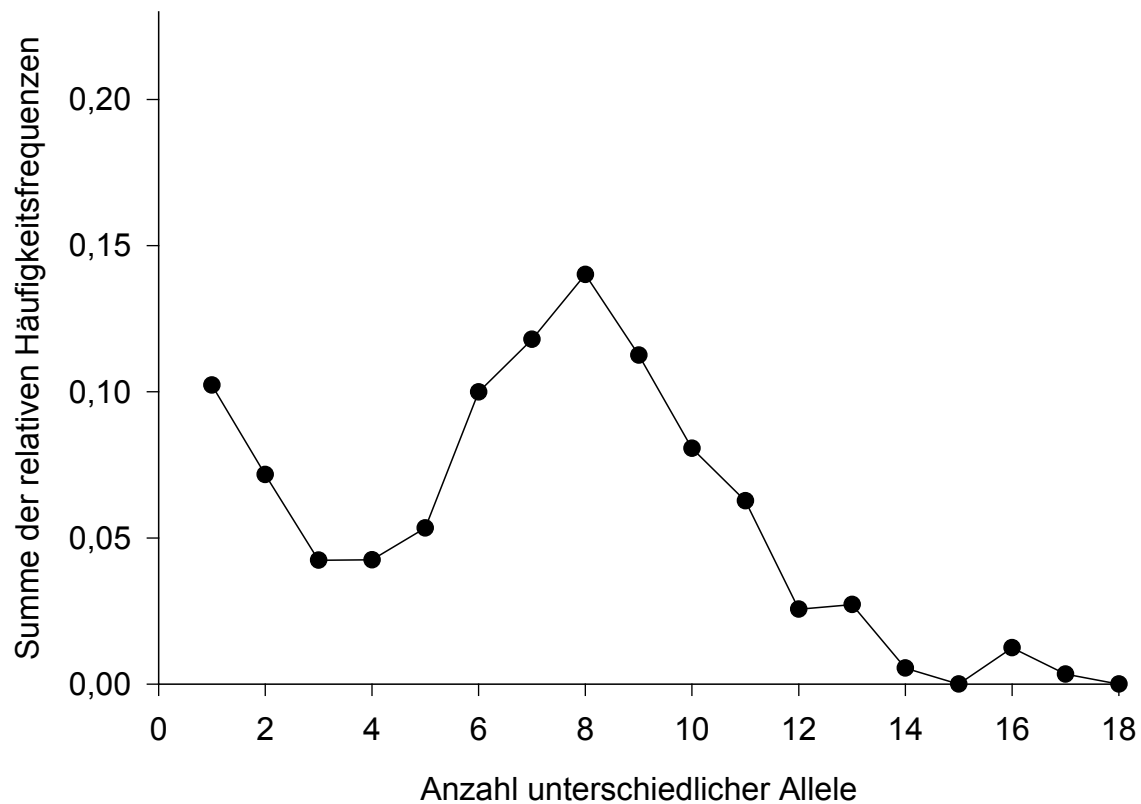


Abbildung 3.1: Häufigkeitsverteilung der paarweisen Unterschiede zwischen Genotypen innerhalb von 26 Populationen von *Potamogeton pectinatus*. Dazu wurden die paarweisen Vergleiche aller Rameten einer Population durchgeführt und die relativen Häufigkeitsfrequenzen jeder Population berechnet und über alle Populationen aufsummiert. Dies wird der Anzahl der berechneten Unterschiede gegenübergestellt.

Der Test auf Kopplungsungleichgewicht mit dem Programm GENEPOP (BELKIR *et al.*, 1996) erbrachte bei den meisten Vergleichen ein Kopplungsungleichgewicht. Nur bei 3 Vergleichen ist kein Ungleichgewicht feststellbar (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Signifikanzniveaus des paarweisen Tests auf Kopplungsungleichgewicht. Genorte, die nicht signifikant aneinander gekoppelt sind, sind fett markiert. PP 26 bis PP 42 bezieht sich auf die Bezeichnungen der Mikrosatellitenloci (siehe Kapitel 1).

Genort	PP26	PP28	PP32	PP34	PP37	PP39	PP40	PP42
PP 24	0,00	0,00.	0,00	0,00	0,00.	0,00	0,00	0,00
PP26	X	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
PP28		X	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PP32			X	0,00	0,14	0,07	0,01	0,00
PP34				X	0,21	0,00	0,00	0,00
PP37					X	0,00	0,04	0,00
PP39						X	0,00	0,00
PP40							X	0,00

Der Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zeigte eine große Anzahl von Populationen, die sich nicht im Gleichgewicht befinden. 5 von 14 marinen Populationen und 8 von 12 limnischen Populationen waren nicht im HWG (Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3).

Die Reduktion des Datensatzes durch Zusammenfassen der somatischen Genotypen eines Klons zu einem Geneten ergab bei der Neuberechnung des Kopplungsungleichgewichtes und des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes deutliche Veränderungen. Bei dem Kopplungsungleichgewicht gab es danach keine einzige signifikante Kopplung mehr. Berechnet man das Kopplungsungleichgewicht mit einem zufällig reduzierten Datensatz, so waren 16 der ursprünglich 33 Vergleiche immer noch im Kopplungsungleichgewicht. Dies bedeutet, dass ein Teil der Verbesserung des Kopplungsungleichgewichtes auf eine Reduktion des Datensatzes und damit einem Stichprobenproblem zurückzuführen war.

Im Bezug auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bewirkte die Reduktion des Datensatzes, dass eine von 12 limnischen Populationen und keine der marinen Populationen nicht im HWG waren. Beim zufällig reduzierten Datensatz waren es immerhin 3 marine und 6 limnische Populationen, die nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht waren. Auch hier wurde ein Teil dieses Effektes durch Stichprobenprobleme erzeugt.

Beim Verhältnis detektierbarer somatischer Genotypen eines Klons zu der klonalen Diversität (als Simpson's Index) zeigte sich eine signifikante Korrelation ($R = 0,45$, $P = 0,019$). In Populationen mit häufiger asexueller Vermehrung und damit einem geringen Simpson's Index waren mehr somatische Genotypen eines Klons zu finden (Abbildung 3.2)

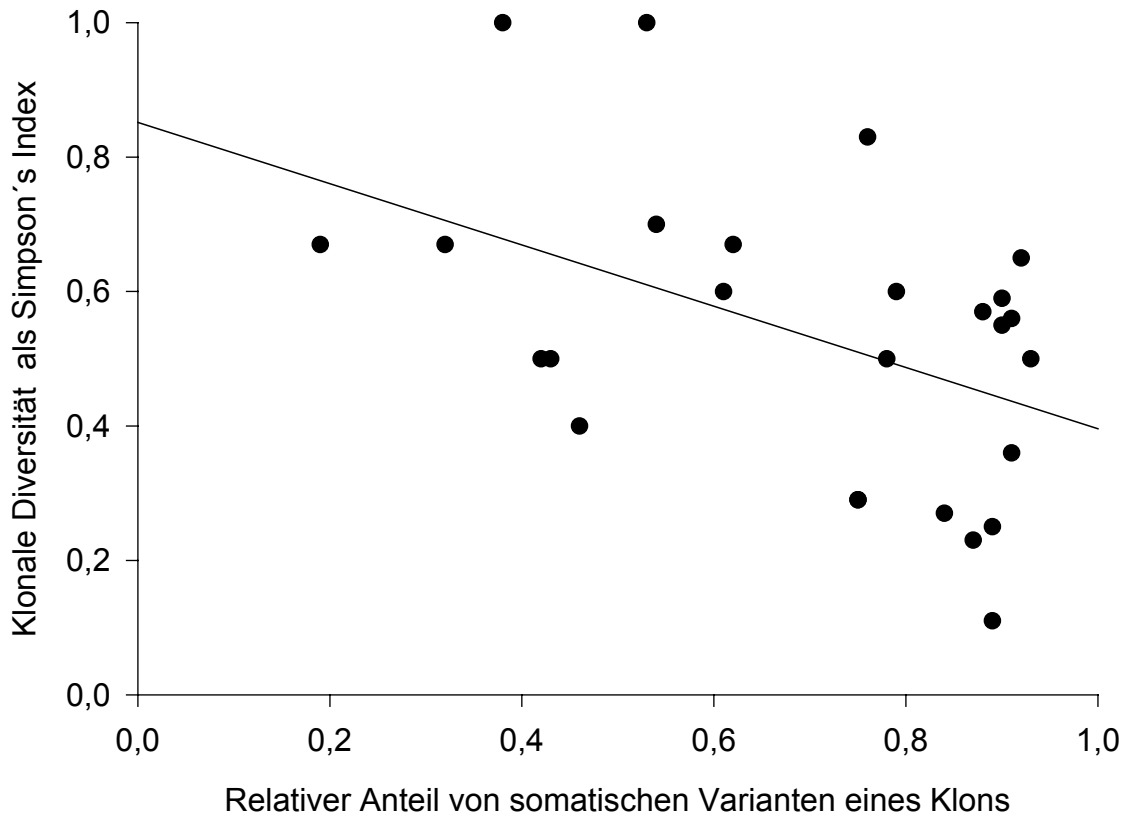


Abbildung 3.2: Korrelation von klonaler Diversität (als Simpson's Index) gegen den relativen Anteil von somatischen Varianten eines Klones. Dazu wurde zunächst das Verhältnis von Rameten zu somatischen Varianten eines Klons berechnet, wie es im Methodenteil erklärt wurde. Auf die Berechnung des Simpson's Index wird in Kapitel 3 eingegangen.

3.4 Diskussion

Die Detektion von Populationsstrukturen von *Potamogeton pectinatus* wird deutlich durch das Auftreten von somatischen Mutationen erschwert. Drei Allele in einem Genom lassen zwei Möglichkeiten zu. Die eine Möglichkeit ist, dass die Muster durch den sechsfachen Chromosomensatz von *Potamogeton pectinatus* produziert werden. Das Kamm-Laichkraut ist ein hexaploider Organismus mit einem Chromosomensatz von $2n = 78$. Ob sich mehr als ein bi-alleler Erbgang zeigt, ist abhängig von dem Zeitpunkt der Polyploidisierung. Bei *Potamogeton pectinatus* scheint die Polyploidiebildung schon vor langer Zeit entstanden zu sein. Andernfalls würde man zum

Beispiel mehr als 3 Allele, zum Teil bis zu 6 Allele finden müssen. Auch sollten alle Loci davon betroffen sein und nicht nur jeweils ein Locus pro Ramet.

Somit verbleibt nur die Möglichkeit, dass es sich bei den Rameten mit 3 Allelen um Chimären handelt. Durch somatische Mutationen gibt es innerhalb eines Rameten genetisch unterschiedliche Zellen und die drei Allele zeigen diese innerindividuelle Variabilität an.

Dass somatische Mutationen bei *Potamogeton pectinatus* eine große Rolle spielen, zeigt sich noch an einer Reihe von Indizien wie der zweigipfeligen Verteilung paarweiser Unterschiede zwischen Genotypen. Dieses Muster kann nur durch zwei verschiedene Prozesse erzeugt werden. Das Maximum bei 8 Unterschieden wird durch Rekombination in Verbindung mit genetischer Variation erzeugt, das Maximum bei 1 durch somatische Mutationen. Der Einfluss somatischer Mutationen zeigt sich auch beim Kopplungsungleichgewicht. Durch somatische Mutationen wird eine große Anzahl sehr naher Verwandter erzeugt. Die Folge ist ein Kopplungsungleichgewicht von fast allen Loci. Schließt man Pflanzen mit hypothetischen somatischen Chimären aus dem Datensatz aus, befinden sich alle Genorte im Kopplungsgleichgewicht. Gleiches gilt auch für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Mehr als die Hälfte der untersuchten Populationen sind nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Da nach der Reduktion des Datensatzes fast alle Populationen im HWG sind, ist auch hier der Einfluss somatischer Mutationen erkennbar.

Wird der Vergleich der Unterschiede zwischen den Genotypen einer Population summiert über die Populationen mit vier Populationen vom Großen Seegrass *Zostera marina* durchgeführt, so zeigen sich keine besonderen Effekte, die auf somatische Mutationen zurückzuführen wären (Abbildung 3.3.). Zwar ist auch hier ein minimaler Anstieg bei ein bis zwei Unterschieden feststellbar, jedoch ist dieser Anstieg so gering, dass er in der Grafik nicht deutlich zu sehen ist.

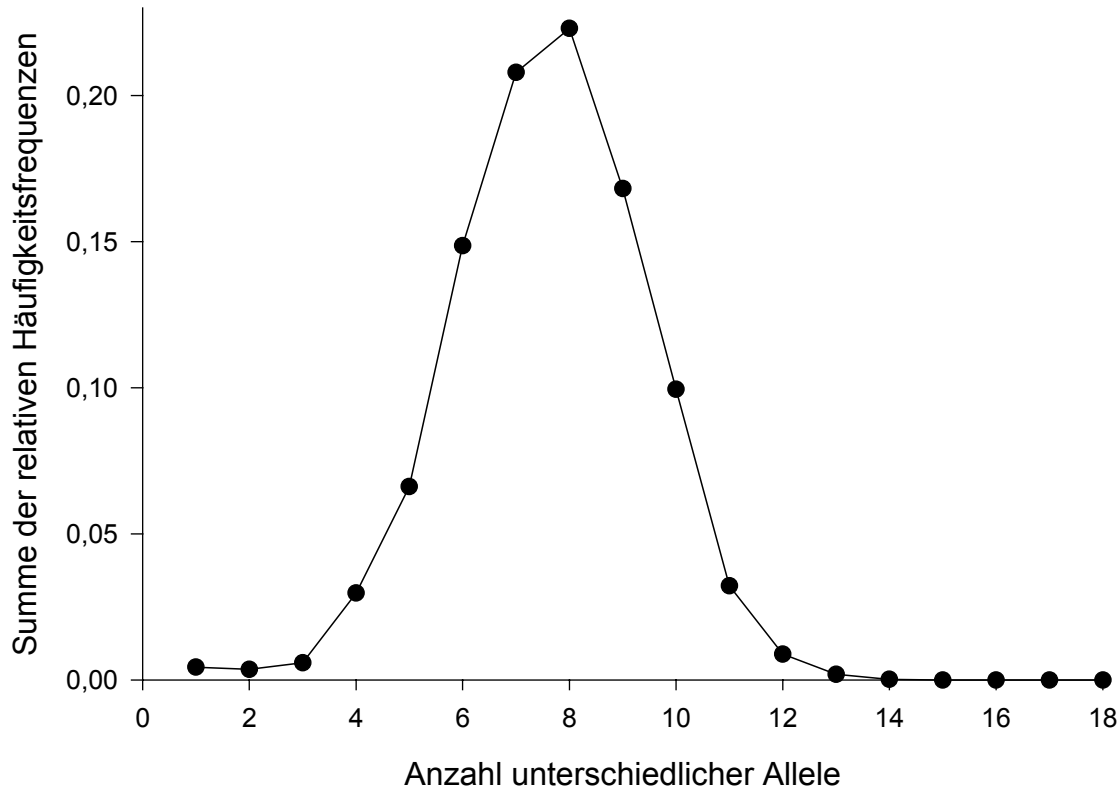


Abbildung 3.3: Häufigkeitsverteilung der paarweisen Unterschiede zwischen Genotypen innerhalb von 4 Populationen von *Zostera marina*. Dazu wurden die paarweisen Vergleiche aller Rameten einer Population durchgeführt und die relativen Häufigkeitsfrequenzen jeder Population berechnet und über alle Populationen aufsummiert. Dies wird der Anzahl der berechneten Unterschiede gegenübergestellt. Berechnet mit Daten von Hämmerli & Reusch (2003b).

Der Unterschied zwischen den beiden Arten liegt in den verschiedenen Lebenszyklen begründet. *Zostera marina* ist zwar ebenfalls ein langlebiger, klonaler Organismus, jedoch mit einem anderen Lebenszyklus. *Zostera marina* besiedelt ein neues Habitat ähnlich wie *Potamogeton pectinatus* mit Wurzelbildung und Aussprossung von Pflanzen bis eine wiesenähnliche Struktur entstanden ist. Zusätzlich findet eine sexuelle Vermehrung mit speziellen Blatttrieben statt. Diese Pflanzenteile sterben jedoch im Winter nicht ab, sondern überdauern das ganze Jahr. Darin liegt der Unterschied zu *Potamogeton pectinatus*. Treten somatische Mutationen auf, so sind von diesen Veränderungen einzelne Bereiche einer Wiese betroffen. Bei *Potamogeton pectinatus* findet dagegen eine Reduktion des

somatischen Gewebes auf wenige Zellen, die Knospen, statt. Dies stellt eine Kombination der beiden für somatische Mutationen entscheidenden Entstehungsfaktoren dar. Bei diesem Lebenszyklus haben somatische Mutationen sowohl eine größere Chance zu entstehen (im Laufe der Saison mit klonalem Wachstum) sowie sich im gesamten Klon zu verbreiten (durch das Wiederauskeimen zu Beginn der nächsten Saison). Ein apikales Spitzenwachstum findet sehr viel häufiger statt als bei anderen Pflanzen. Dadurch gewinnen somatische Mutationen bei *Potamogeton pectinatus* an zusätzlicher Bedeutung.

Diese Häufigkeit ist vermutlich einer von zwei Gründen, warum bei dieser Untersuchung von *Potamogeton pectinatus* somatische Mutationen eine große Rolle spielen. Nur in wenigen anderen Arbeiten wird explizit über somatische Mutationen berichtet. Beim Wein *Vitis vinifera* stellt die anthropogene Beeinflussung durch menschliches Klonieren (Eynard & Dalmasso, 1990) und das Verhindern der sexuellen Fortpflanzung einen wichtigen Faktor dar. Aber auch die verwendete Methode ist sicher einen Grund für die Feststellung somatischer Mutationen. Bei vielen Methoden wie Allozymstudien, RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) oder RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) können somatische Mutationen nicht festgestellt werden. Bei solchen Arbeiten erhöhen sie die Variabilität, ohne das man den Grund feststellen kann. Die extrem hohen Mutationsraten der Mikrosatelliten sorgen bei dieser Studie dafür, dass somatische Mutationen festgestellt werden konnten.

Wie häufig somatische Mutationen sind und welche Bedeutung sie haben können, ist schwierig zu messen. Antolin & Strobeck (1985) schätzen die Bedeutung von somatischen und gametischen Mutationen gemessen als durchschnittliche Heterozygotie mit folgender Formel:

$$H = \frac{4N(u + nmv)}{[1 + 4N(u + nmv)]}$$

wobei H die Heterozygotie ist, N die Populationsgröße, m die Anzahl von Zellteilungen zwischen Zweigen, n die exponentielle Rate der Knospenproduktion, v die somatische Mutationsrate und u die gametische Mutationsrate.

Dies zeigt, dass der Einfluss somatischer Mutationen groß sein kann. Wenn man zum Beispiel wie Antolin & Strobeck (1985) die exponentielle Knospenrate mit 20

annimmt, die Anzahl der Zellteilungen zwischen Zweigen mit 10 und beide Mutationsraten auf 10^{-6} pro Locus und Generation schätzt, so ist die erwartete Heterozygotie ohne somatische Mutation nur 0,002. Mit somatischen Mutationen liegt die Heterozygotie jedoch bei 0,29.

Die Schätzung einzelner Parameter in dieser Formel ist jedoch sehr schwierig. So ist die Abschätzung der Anzahl der Zellteilungen insbesondere bei apikalen Spitzenmeristemen nicht trivial, da eine Zuordnung einzelner Zellen zu den Mutterzellen im lebenden Gewebe diffizil ist. Auch die Mutationsraten sind nicht gleich. So wurden bei Mikrosatelliten-Loci beim Menschen die somatischen Mutationsraten auf $> 3,1 \times 10^{-8}$ Mutationen pro Zelle und Generation geschätzt (Boyer & Farber, 1998), während die Mutationsraten während der Meiose auf $4,5 \times 10^{-4}$ bis $1,6 \times 10^{-6}$ Mutationen pro Gamet und Locus berechnet wurden (Kwiatkowski *et al.*, 1992).

Die Bedeutung von somatischen Mutationen bei *Potamogeton pectinatus* ist mit Hilfe dieser Arbeit nur sehr ungenau zu schätzen. Eine Möglichkeit ist die Berechnung des prozentualen Anteils von potentiell chimären-enthaltenden Pflanzen von der Gesamtzahl der Pflanzen. 21,6 Prozent aller Vergleiche auf Unterschiede zeigten weniger als 4 Unterschiede. Dieser Wert kann als Abschätzung für die Bedeutung somatischer Mutationen dienen.

Eine Abschätzung, wie sich die Heterozygotie ändert, ist leider nicht möglich. Man kann zwar mit dem reduzierten Datensatz die Heterozygotiegrade neu berechnen, begeht damit jedoch einen statistischen Fehler. Bei der Reduktion wählt man einen der ähnlichen Genotypen aus. Dies geschieht zwar zufällig, jedoch ist von der Auswahl die Heterozygotie direkt abhängig. Somit wäre eine Abschätzung mit zu großen Fehlern belastet.

Somatische Mutationen behindern die Detektion von populationsgenetischen Strukturen von *Potamogeton pectinatus*. Da mehr als die Hälfte aller Populationen nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und alle Genorte im Kopplungsungleichgewicht sind, sind einige Aussagen über Populationsstrukturen nur beschränkt möglich.

Zunächst werden die tatsächlichen Klongrößen unterschätzt. Da Genotypen detektiert werden, die tatsächlich jedoch einem Klon angehören, werden mehr Klone angezeigt als tatsächlich vorhanden. Die Klone sind in Wirklichkeit größer.

Die Heterozygotie wird überschätzt. Da Homozygote als Heterozygote detektiert werden, entsteht ein Heterozygotenüberschuss mit einer Steigerung des Heterozygotiegrades. Eine Abschätzung über die Bedeutung ist jedoch nicht möglich. Bei der Differenzierung zwischen Populationen führen somatische Mutationen zu einer größeren Streuung. Da Mikrosatelliten selektiv neutral sind, bewirken somatische Mutationen eine ungerichtete Variabilität, die beim Vergleich zwischen Populationen sowohl zu einer Annäherung als auch zu einer Vergrößerung der genetischen Abstände führen kann. Somit kann die Differenzierung sowohl überschätzt als auch unterschätzt werden. Bei einer genügend großen Stichprobe sollten daher die Effekte für zu treffende Aussagen über die Differenzierung zwischen Populationen neutral sein.

4 Klonale und genetische Diversität in Populationen von *Potamogeton pectinatus* L.

4.1 Einleitung

Bei allen Arten gibt es morphologische und genetische Variationen innerhalb ihrer geografischen Verteilung. Diese Variation bleibt erhalten durch ein Gleichgewicht von Kräften, die eine lokale genetische Differenzierung bewirken und Kräften, die zu einer Homogenität führen. Mutationen, genetische Drift in endlichen Populationen und natürliche Selektion führen zu einer lokalen Differenzierung, während Genfluss durch Gameten oder Individuen dieser Differenzierung entgegenwirkt. Ein wichtiger Faktor ist dabei die Struktur des Lebensraumes. Die Bedeutung wird besonders deutlich beim Vergleich zweier so unterschiedlicher Lebensräume wie Meer und Seen. Limnische Populationen sind räumlich stärker isoliert als marine Populationen. Seen können als negative Inseln in einer terrestrischen Umgebung angesehen werden mit einer Limitierung des Genflusses zwischen Populationen. Da Migrationsereignisse seltener vorkommen, gewinnen einzelne Gründereffekte an Bedeutung und erhöhen die genetische Drift. Des Weiteren sind limnische Populationen aufgrund der räumlichen Limitierung des Lebensraumes kleiner, was wiederum die Bedeutung der genetischen Drift erhöht. Das Meer dagegen ist ein kontinuierlicher Lebensraum mit theoretisch unbegrenztem genetischen Austausch zwischen Populationen. Dieser umfangreiche genetische Austausch führt zusammen mit größeren Populationen (mit weniger genetischer Drift) zu einer geringeren genetischen Variabilität innerhalb von Populationen als im Süßwasser.

Genetische Diversität innerhalb von Populationen hat bei Organismen, die sich sowohl sexuell als auch asexuell vermehren können, zwei Organisationsebenen: die klonale Diversität sowie die genetische Diversität im engeren Sinne. Beide Diversitätsmaße werden von unterschiedlichen, zum Teil von einander unabhängigen Prozessen reguliert. Die genetische Diversität im engeren Sinne ist die Variation von Marker-Genen in genetisch distinkten Individuen. Beeinflusst wird dieses Maß hauptsächlich von Isolations- und Driftprozessen, bei denen Habitatsunterschiede besonders zum Tragen kommen. Die klonale Diversität dagegen detektiert die

Diversität und die räumliche Anordnung genetisch distinkter Individuen (Klone oder Geneten) innerhalb von Populationen. Dabei spielt vor allem der Fortpflanzungsmodus eine entscheidende Rolle, also das Verhältnis von sexueller zu asexueller Reproduktion. Dieses Verhältnis kann innerhalb einer Art variieren. Speziell am Rande der geografischen Verbreitung ist bei klonalen Pflanzen die Produktion von Samen oder anderen Teilen der sexuellen Reproduktion reduziert (Ashton & Mitchell, 1989; Eriksson, 1996), was auf einen Einfluss von ökologischen Faktoren auf das Verhältnis von sexueller zu vegetativer Reproduktion schließen lässt. Eine Reihe von abiotischen und biotischen Faktoren ist direkt oder indirekt dafür bekannt, Samenproduktion, Germination und Samenrekrutierung zu beeinflussen (Abrahamson, 1980; Richards, 1986).

Manchmal ist ein Hauptfaktor zu erkennen. Wasserpflanzen, die ihre Blüten an der Wasseroberfläche ausbilden, können keine Blüten und Samen produzieren, wenn das Wasser zu tief ist (Hutchinson, 1975). Kalte Temperaturen beeinflussen ebenso die Samenproduktion negativ (Pigott, 1981; Pigott & Huntley, 1981). Eine verkürzte Phase optimaler Lebensbedingungen mit genügend Licht und höheren Temperaturen bei nördlichen Populationen von *Potamogeton pectinatus* führt ebenfalls zur Verschiebung zugunsten asexuell produzierter Knollen (Pilon & Santamaría, 2002). Inwieweit sich das Verhältnis von sexueller zu asexueller Vermehrung und damit die klonale Diversität bei *Potamogeton pectinatus* ändert, lässt sich mit Hilfe des Simpson's Index der Diversität (Simpson, 1949) berechnen.

Während sich in der klonalen Diversität überwiegend die Lebensbedingungen widerspiegeln, sind Prozesse wie Genaustausch mit anderen Populationen und genetische Drift die Ursache der genetischen Diversität. Daher sollte bei limnischen Populationen die genetische Diversität geringer sein als bei marinen. Diese erwarteten Populationsstrukturen können von historischen Prozessen überlagert werden. In Nordeuropa hat die nacheiszeitliche Wiederbesiedlung einen entscheidenden Einfluss auf populationsgenetische Strukturen. Vergleiche verschiedenster Taxa zeigen allgemein die Rekolonisation von Europa aus Refugien im Süden (Hewitt, 1996). In diesen Refugien blieb die ursprüngliche genetische Variabilität erhalten bzw. wurde durch die längere Lebensgeschichte wieder aufgebaut. Je weiter die Entfernung vom eiszeitlichen Refugium, um so jünger ist die Population und um so geringer ist die genetische Variabilität innerhalb der Population (Hewitt, 1996). Die in dieser Studie untersuchten Populationen sind

populationshistorisch betrachtet gleich alte Populationen. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Wiederbesiedlung in Europa entsprechend den zunehmenden Temperaturen von den südlichen Rückzugsgebieten aus nach Norden und Osten stattgefunden hat. Die Wiederbesiedlung im Untersuchungsgebiet mit Populationen der südlichen Ostsee und den angrenzenden Seen erfolgte von Westen nach Osten (Hewitt, 1996).

Somit kann die beim Vergleich limnisch-mariner Populationen erwartete geringe genetische Variabilität der Seenpopulationen überlagert werden von der geringer werdenden genetischen Variabilität, entsprechend den Entfernungen von den Rückzugsrefugien. Dies sollte sich insbesondere im normierten Allel-Reichtum (allelic richness) widerspiegeln, und weniger in der Heterozygotie. Der Allelreichtum zeigt im Vergleich zur Heterozygotie eine andere Dynamik und kann eine sehr nützliche Methode zur Identifikation von Populationsreduktionen (Luikart *et al.*, 1998), Mischungen von Populationen (Chakraborty & Weiss, 1988) oder zur Rekonstruktion der nacheiszeitlichen Wiederbesiedlung sein (Comps *et al.*, 2001). Insbesondere bei der Studie von Comps *et al.* (2001) konnte der Allel-Reichtum die durch fossile Pollenuntersuchungen gefundene Wiederbesiedlungsgeschichte besser widerspiegeln als die Heterozygotiegrade.

Das für diese Studie ausgewählte Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* ist besonders dazu geeignet, den Einfluss von Habitatsstrukturen und räumlicher Struktur des Lebensraumes auf genetische und klonale Diversität zu erforschen. Diese weltweit verbreitete, limnische Art ist salzwasser-tolerant und kommt sowohl in der Ostsee als auch den ostsee-nahen Seen vor. Auf der einen Seite sollten sich durch die Unterschiede im Lebensraum mit unterschiedlichen Populationsgrößen und unterschiedlichen Genfluss zwischen Populationen die genetische Diversität zwischen limnischen und marinen Populationen unterscheiden. Auf der anderen Seite sollten die unterschiedlichen Habitatsbedingungen, insbesondere der Gradient im Salzgehalt der Ostsee, deren Einfluss auf die klonale Diversität widerspiegeln.

Bisherige Arbeiten über populationsgenetische Strukturen bei aquatischen Pflanzen zeigten eine geringe genetische Variabilität innerhalb der Arten und eine geringe Differenzierung zwischen ihren Populationen (Wain *et al.*, 1985). Dies gilt auch für die Allozymstudien beim Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* (Hettiarachchi & Triest, 1991; Hollingsworth *et al.*, 1996). Das Hauptproblem bei diesen Studien ist jedoch die Analyse mit Hilfe von Allozymen, die bei aquatischen Pflanzen kaum

Variabilität zeigen. Neuere Arbeiten mit höher auflösenden Markern zeigen signifikante genetische Variabilität (Lokker *et al.*, 1994; Reusch *et al.*, 2000; Waycott, 1998) und konnten interne Substrukturen aufdecken (Gornall *et al.*, 1998; Hämmerli & Reusch, 2003a; Ruckelshaus, 1998).

Mader *et al.* (1998) konnten erstmals für *Potamogeton pectinatus* eine hohe genetische Variabilität nachweisen. Bei dieser Studie wurden von 19 Populationen aus Europa, Amerika und Afrika bis zu 4 Knollen mit Hilfe von RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) und Chloroplasten-RFLP (RFLP = Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) analysiert. Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges von maximal 4 Proben je Population ist eine Aussage über die genetische Variabilität jedoch nicht möglich.

King *et al.* (2002) sammelten aus 40 Populationen der gesamten Ostsee zwischen 2 und 17 Pflanzen und analysierten sie mit ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). Die klonale Diversität gemessen als Simpson's Index lag bei dieser Studie zwischen 0 und 1, der Mittelwert bei 0,66. Demnach scheint die klonale Diversität an die geografische Breite gekoppelt zu sein ($R = -0,356$, $P = 0,011$), was nach Angaben von King *et al.* (2002) jedoch durch intensivere Probennahme bestätigt werden sollte. Auch sollte die klonale Diversität noch genauer untersucht werden, da sehr unterschiedliche Stichprobengrößen einen Vergleich innerhalb von Populationen erschweren.

Die genetische Diversität innerhalb einer einzigen Population wurde von Hangelbroeck *et al.* (2002) untersucht. Mit Hilfe von RAPD Markern (Random Amplification of Polymorphic DNA) wurden 128 Proben von 8 Gruppen innerhalb einer Population analysiert. Das Verhältnis detektierbarer Klone (0,76) und die klonale Diversität (Simpson's Index) bei 0,99 zeigen ein sehr hohes Niveau. Dabei handelt es sich um eine Untersuchung einer einzelnen Population, wobei die Allgemeingültigkeit der hohen genetischen Diversität zu klären ist.

In der vorliegenden Studie war es erstmals möglich, die genetischen Strukturen von *Potamogeton pectinatus* mit Mikrosatelliten zu analysieren. Die Vorteile dieser Kernmarker sind unter anderem die hohe Variabilität, die kodominante Vererbung sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Bei der Probennahme wurde besonderer Wert auf eine räumlich hochauflösende Skalierung gelegt, um detaillierte Angaben über Populationsstrukturen machen zu können.

4.2 Material und Methode

4.2.1 Material

61 Standorte an der deutschen Ostseeküste wurden auf das Vorkommen des Kamm-Laichkrauts *Potamogeton pectinatus* untersucht (Anhang 1 und Anhang 2). Dazu wurde in den meisten Fällen geschnorchelt, seltener getaucht. Unter den 61 Standorten waren 36 Seen und 25 Standorte an der Ostsee. Insgesamt konnte 34 mal *Potamogeton pectinatus* gefunden werden, 17 mal in Seen und 17 mal im Meer. Gesammelt und analysiert wurden 26 Standorte, 12 limnische und 14 marine (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1).

Von jedem Standort wurden im Optimalfall 40 Pflanzen auf einer Fläche von 40 Meter x 2 Meter mit Hilfe einer computererstellten Zufallsverteilung gesammelt. Die 40 Meter wurden parallel zur Uferzone gesammelt, die Begrenzung von 2 Metern Breite ergibt sich bei vielen Standorten durch das begrenzte Wachstum von *Potamogeton pectinatus* mit zunehmender Tiefe. Die genetische Analyse erfolgte mit 9 Mikrosatellitenloci (siehe Kapitel 2).

Tabelle 4.1.: Analyierte Probenorte von *Potamogeton pectinatus*. Aufgeführt sind die Gewässer, der genaue Probenahmeort, die verwendete Abkürzung (Abk.), die geografische Position des Standortes sowie die Zuordnung, ob es sich um einen marinen oder um einen limnischen Standort handelt.

Gewässer	Ort	Abk.	Breitengrad	Längengrad	Standort
Dänische Wiek	Ludwigsburg	DW	54°06'50''	13°29'00''	Marin
Deviner Bucht	Devin	DB	54°16'20''	13°09'26''	Marin
Deviner See	Devin	DS	54°16'09''	13°10'03''	Marin
Fehmarnsund	Großenbrode	GB	54°23'33''	11°07'00''	Marin
Große Wiek	Bojendorf	BO	54°01'29''	11°31'56''	Marin
Großer Zicker	Thiessow	GZ	54°16'56''	13°42'48''	Marin
Gustower Wiek	Gustow	GU	54°17'46''	13°12'07''	Marin
Harving	Seedorf	HA	54°20'55''	13°39'20''	Marin
Koos	Insel Koos	KO	54°10'02''	13°24'38''	Marin
Riems	Riemserort	RI	54°11'00''	13°20'50''	Marin
Salzhaff	Pepelow	SH	54°02'20''	11°34'44''	Marin
Schleimünde	Maasholm	MAA	54°41'23''	10°00'34''	Marin
Schoritzer Wiek	Zudar	SW	54°15'44''	13°21'28''	Marin
Wamper Wiek	Gustow	WW	54°17'58''	13°11'03''	Marin
Bergsee	Alt Gaarz	BE	53°35'01''	12°30'26''	Limnisch
Dobbersdorfer See	Schlesen	DO	54°19'16''	10°19'40''	Limnisch
Großer Plöner See	Prinzeninsel	GPL	54°08'15''	10°24'46''	Limnisch
Kellersee	Bad Malente	KE	54°10'57''	10°34'18''	Limnisch
Kolpinsee	Schwenzin	KO	53°31'00''	12°36'36''	Limnisch
Lanker See	Schellhorn	LA	54°13'19''	10°17'54''	Limnisch
Pinnower See	Godern	PI	53°36'57''	11°32'30''	Limnisch
Plauer See	Alt Schwerin	PL	53°31'07''	12°19'41''	Limnisch
Schweriner See	Bad Kleinen	SN	53°46'05''	11°28'31''	Limnisch
Selenter See	Seekrug	SEL	54°17'46''	10°30'50''	Limnisch
Trammer See	Tramm	TR	54°10'28''	10°24'32''	Limnisch
Wittensee	Sande	WI	54°23'12''	9°43'30''	Limnisch

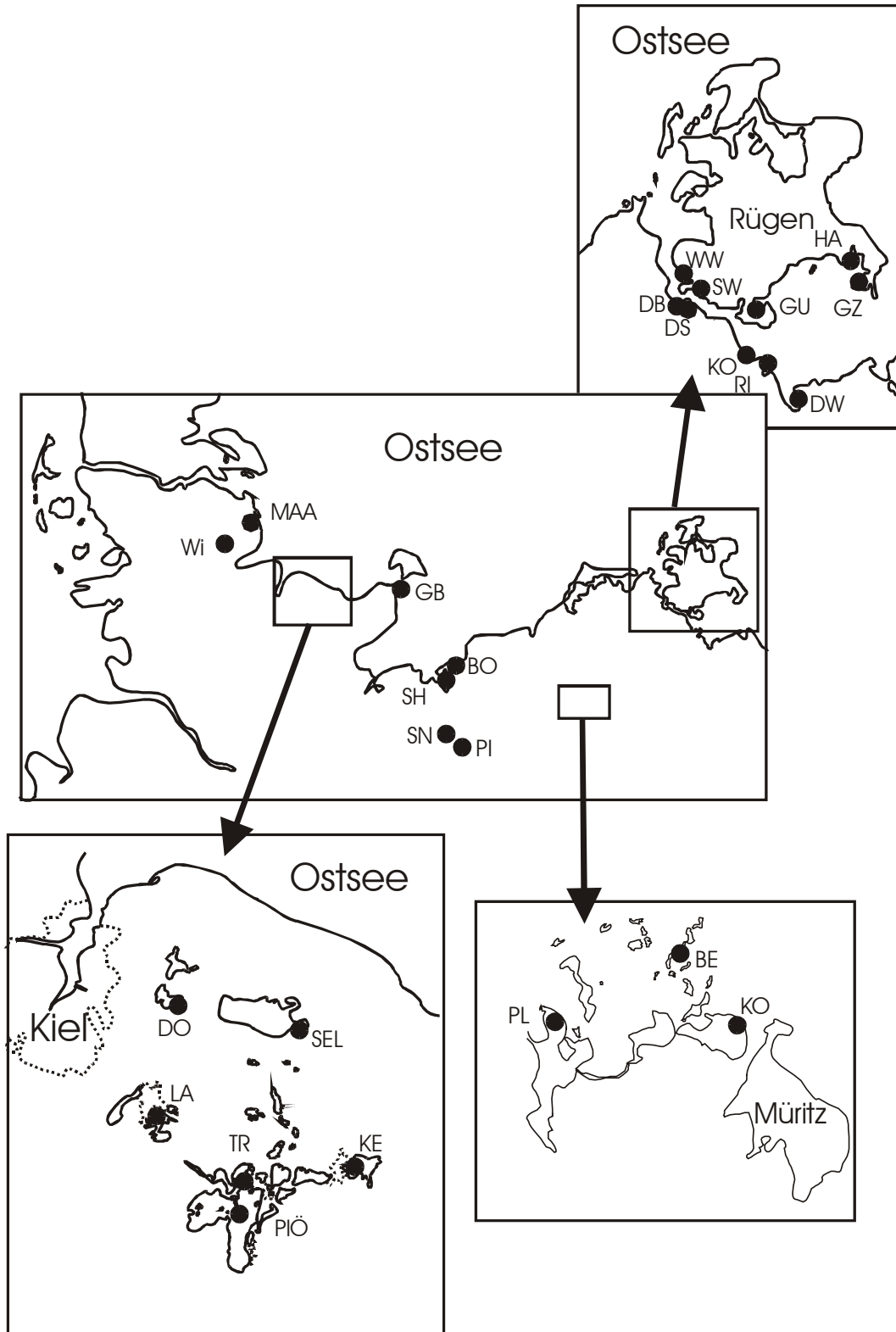


Abbildung 4.1: Probenorte. Der Kartenausschnitt stellt einen Teil Norddeutschlands und der Ostseeküste dar, Probengebiete mit mehreren Probenorte wurden vergrößert dargestellt. Die Probenabkürzungen können Tabelle 4.1 entnommen werden.

4.2.2 Datenauswertung

Da die genetische Diversität von Populationen zwei Organisationsebenen hat, wurde sowohl die klonale Diversität als auch die genetische Diversität berechnet. Für die klonale Diversität wurden das Verhältnis detektierbarer Geneten und der Simpson's Index berechnet. Das Verhältnis der detektierbaren Geneten (Ellstrand & Roose, 1987) wurde als Anzahl gefundener Geneten dividiert durch die Anzahl der gesammelten Rameten berechnet. Mit dem Simpson's Index der Diversität (Simpson, 1949) sind Aussagen über die klonale Diversität möglich. Berechnet wurde dies mit:

$$\text{Simpson's Index} = 1 - \sum (n_i/N),$$

wobei n_i die Anzahl von Rameten des Multilocus-Genotypen i ist und N die absolute Anzahl der gesammelten Rameten. Dieser Index kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei Populationen mit dem Wert 0 nur aus einem einzigen Geneten bestehen und bei einer Population mit dem Wert 1 jeder gesammelte Ramet ein eigener Genet ist. Berechnet wird mit diesem Index das Verhältnis sexueller zu asexueller Vermehrung. In Populationen mit reduzierter sexueller Vermehrung können Klone größere Flächen einnehmen, was zu einer Reduktion des Simpson's Index führt.

Zur Messung der genetischen Diversität innerhalb von Populationen wurde die erwartete und die beobachtete Heterozygotie berechnet. Diese Maße werden genutzt, um historische Prozesse wie Bottlenecks und Wiederbesiedlungshistorie nach der letzten Eiszeit zu rekonstruieren (Hewitt, 1996). Die beobachtete und die erwartete Heterozygotie wurden mit dem Computerprogramm GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995) berechnet.

Bei der Berechnung des Allelreichtums ist die beobachtete Anzahl der Allele sehr stark abhängig von der Stichprobengröße. Um den Index von Hurlbert (1971) für populationsgenetische Untersuchungen zu nutzen, wurde daher nach El Mousadik & Petit (1996) die Stichprobengröße vereinheitlicht, um Vergleiche zwischen unterschiedlich großen Stichproben ziehen zu können (Petit *et al.*, 1998). Die Berechnung wurde mit dem Computerprogramm FSTAT (Goudet, 1995) durchgeführt.

Sowohl für die klonale Diversität als auch für die genetische Diversität im engeren Sinne ist ein Einfluss der geografischen Länge auf die Diversität zu erwarten. Die Wiederbesiedlung nach der letzten Eiszeit fand im Untersuchungsgebiet von West nach Ost statt, so dass mit einer Abnahme der genetischen Diversität von West nach Ost zu rechnen ist. Die Salinität der Ostsee nimmt von Osten nach Westen zu und da Salinität ein bedeutender Umweltfaktor sein könnte, ist eine Abnahme der klonalen Diversität und Zunahme der Klonegröße nach Westen hin möglich.

Um den Einfluss von postglazialer Wiederbesiedlung und Umweltbedingungen auf Populationsstrukturen von *Potamogeton pectinatus* zu erfassen, wurde die lineare Regression der Diversitätsmaße Heterozygotie, Allel-Reichtum und Simpson's Index gegen die geografische Länge als dezimaler Längengrad berechnet.

Darüber hinaus wurde eine Kovarianzanalyse der verschiedenen Diversitätsmaße durchgeführt. Die angegebenen Mittelwerte sind gewichtete Mittelwerte nach der Kovarianzanalyse.

4.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 859 Rameten untersucht, 348 aus Seen und 511 aus marinen Standorten. Dabei wurden 273 Geneten detektiert, 102 in Seen und 171 im Meer. Ein Genet bestand im Durchschnitt aus 3,14 Rameten, wobei die Anzahl mit 2,99 Rameten pro Genet im Meer geringer war als bei den Seen mit 3,41. Klone in den Seen waren also im Durchschnitt größer als an den marinen Standorten.

Das Verhältnis der detektierbaren Geneten (Tabelle 4.2 und 4.3) lag im Durchschnitt bei 0,347. Die Werte schwankten in Bereichen zwischen 0,07 in der Population Großenbrode und 0,77 beim Wittensee. Simpson's Index der Diversität (Tabellen 4.2 und 4.3) liegt im Durchschnitt bei 0,70. Die Werte schwanken zwischen 0,92 beim marinen Standort Koos und 0,18 bei Bojendorf.

Tabelle 4.2: Geografische Länge, Anzahl der analysierten Rameten und gefundenen Geneten, deren Verhältnis sowie verschiedene Diversitätsmaße der marinen Populationen. Bei Populationen, die sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden, sind die Heterozygotien **fett** hervorgehoben.

Population	Geografische Länge	Anzahl Rameten	Anzahl Geneten	Verhältnis		Simpson's Index	Allel-Reichtum	
				det. Geneten	Erwartete Heterozygotie			
BO	11,53335	39	4	0,102	0,337	0,417	0,186	1,929
DB	13,15675	39	7	0,179	0,413	0,429	0,321	2,266
DS	13,16039	38	8	0,211	0,470	0,539	0,753	2,459
DW	13,48132	32	16	0,500	0,441	0,407	0,842	2,317
GB	11,11608	39	3	0,077	0,420	0,593	0,418	2,333
GW	13,19979	31	14	0,452	0,487	0,476	0,866	2,418
GZ	13,70795	40	21	0,525	0,446	0,339	0,923	2,260
HA	13,65331	33	9	0,273	0,439	0,461	0,782	2,278
KS	13,40897	37	21	0,568	0,413	0,460	0,925	2,145
MAA	10,00819	34	7	0,206	0,498	0,597	0,619	2,424
RI	13,34563	36	17	0,472	0,486	0,539	0,910	2,318
SH	11,57586	40	11	0,275	0,531	0,616	0,540	2,535
SW	13,35563	36	15	0,417	0,501	0,574	0,906	2,458
WW	13,18252	36	18	0,500	0,460	0,537	0,900	2,333
Summe		511	171					
Mittelwert		36,50	12,21					

Tabelle 4.3: Geografische Länge, Anzahl der analysierten Rameten und gefundenen Geneten, deren Verhältnis sowie verschiedene Diversitätsmaße der limnischen Populationen. Bei Populationen, die sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden, sind die Heterozygotien **fett** hervorgehoben.

Population	Geografische Länge	Anzahl Rameten	Anzahl Geneten	Verhältnis		Simpson's Index	Allel-Reichtum	
				det. Geneten	Erwartete Heterozygotie			
BE	12,50545	40	6	0,150	0,407	0,689	0,384	1,867
DO	10,32652	39	15	0,385	0,557	0,624	0,881	2,820
GPL	10,41170	22	11	0,500	0,655	0,571	0,789	3,223
KE	10,58172	17	8	0,471	0,600	0,542	0,754	2,917
KO	12,61358	36	7	0,194	0,578	0,753	0,755	2,589
LA	10,29750	40	13	0,325	0,463	0,444	0,891	2,375
PI	11,53925	11	3	0,273	0,562	0,544	0,430	2,822
PL	12,32352	38	5	0,132	0,364	0,424	0,528	1,815
SEL	10,51341	39	6	0,154	0,493	0,455	0,464	2,443
SN	11,47338	37	6	0,162	0,466	0,556	0,608	2,517
TR	10,40829	16	12	0,750	0,619	0,601	0,898	3,088
WI	9,72393	13	10	0,769	0,570	0,639	0,888	2,793
Summe		348	102					
Mittelwert		29	8,5					

Die klonale Diversität (als Simpson's Index) war in den limnischen Populationen geringer als in den marinen Populationen (Tabelle 4.4). Dagegen verhielt sich die genetische Variabilität nicht wie in der Eingangshypothese formuliert. Die Variabilität sollte bei limnischen Populationen geringer sein als bei marinen. Beim Allelreichtum war der Wert für limnische Populationen größer. Der Unterschied war zwar nicht sehr groß (2,356 zu 2,325), jedoch in der Kovarianzanalyse statistisch signifikant (Tabelle 4.4). Für die Heterozygotiegrade waren die Unterschiede marginal signifikant, die genetische Diversität war hierbei in den limnischen Populationen tendenziell größer als bei den marinen. (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Mittelwerte der unterschiedlichen Diversitätsmaße für limnische und marine Populationen. Unter Erwartet und Gemessen ist aufgeführt, wie der Mittelwert der limnischen Populationen im Vergleich zu den marinen Populationen nach den Hypothesen sein sollte und wie er tatsächlich berechnet wurde.

	Limnisch	Marin	Signifikanz P	Erwartet	Gemessen
Simpson's Index	0,576	0,604	** 0,0012	geringer	geringer
Allelreichtum	2,356	2,325	* 0,0122	geringer	höher
Beobachtete Heterozygotie	0,487	0,454	n.s 0,0869	geringer	höher
Erwartete Heterozygotie	0,593	0,529	n.s. 0,0693	geringer	höher

Beim Vergleich der limnischen und marinen Populationen war die Veränderung der klonalen Diversität mit dem Längengrad deutlich (Kovarianzanalyse, Interaktion Habitatstyp x Längengrad, $P = 0,0013$). Mit steigendem Längengrad nahm die klonale Diversität der limnischen Populationen ab, während sie in den marinen Populationen zunahm (Abbildung 4.2). In marinen Populationen war sexuelle Reproduktion im Osten des Untersuchungsgebietes häufiger als im Westen. Umgekehrt verhielten sich limnische Populationen, bei denen sexuelle Reproduktion im Westen des Untersuchungsgebietes häufiger war.

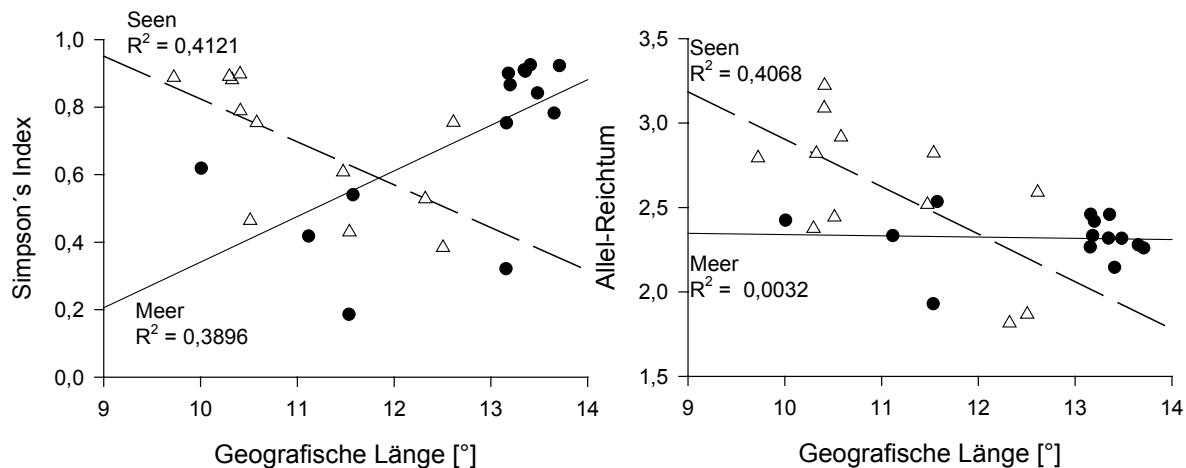


Abbildung 4.2: Darstellung vom Simpson's Index (links) und Allel-Reichtum (rechts) gegen die geografische Länge. Für die beiden Habitats Seen (weiße Dreiecke) und Meer (schwarze Punkte) ist die lineare Regression (Seen unterbrochene Linie, Meer durchgezogene Linie) eingezeichnet sowie der Regressionskoeffizient angegeben.

Die Wiederbesiedlungshistorie spiegelte sich am besten im Allel-Reichtum wider. Mit steigendem Längengrad nahm der Allel-Reichtum ab (Kovarianzanalyse, Faktor Längengrad, $P = 0,0102$). Dabei unterschieden sich die beiden Habitats deutlich (Kovarianzanalyse, Interaktion Habitatstyp x Längengrad, $P = 0,0142$). Während der Allel-Reichtum in den limnischen Populationen mit steigendem Längengrad abnahm, blieb er in den marinen Populationen fast unverändert (Abbildung 4.2).

Nicht ganz so deutlich spiegelte sich die Wiederbesiedlung bei den Heterozygotiegraden wider. Der Einfluss von Faktoren mit zunehmender geografischer Länge war nicht sehr groß und nicht signifikant (Kovarianzanalyse, Faktor Längengrad, $P = 0,6787$ für beobachtete Heterozygotie sowie $P = 0,0787$ für erwartete Heterozygotie). Bei der beobachteten Heterozygotie gab es die Tendenz, dass in marinen Populationen die Heterozygotie mit steigendem Längengrad abnahm und in limnischen Populationen zunahm (Abbildung 4.3), jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant (Kovarianzanalyse, Interaktion Habitatstyp x Längengrad, $P = 0,0674$). Bei der erwarteten Heterozygotie sank tendenziell die Diversität der limnischen Populationen, während die der marinen Populationen annähernd gleich blieben (Abbildung 4.3), jedoch sind auch hier die Unterschiede nicht signifikant (Kovarianzanalyse, Interaktion Habitatstyp x Längengrad, $P = 0,0903$).

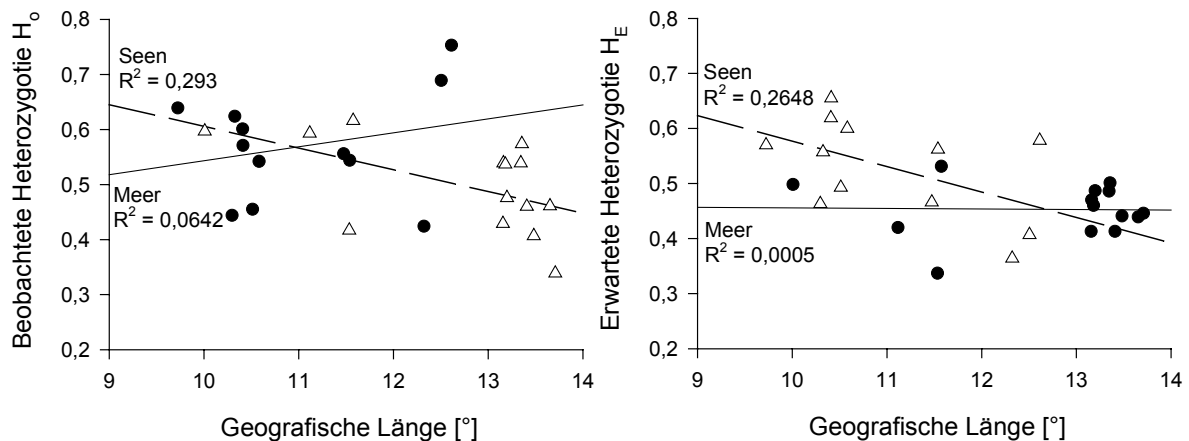


Abbildung 4.3: Darstellung der beobachteten Heterozygotie (links) und erwarteten Heterozygotie (rechts) gegen die geografische Länge. Für die beiden Habitate Seen (weiße Dreiecke) und Meer (schwarze Punkte) ist die lineare Regression (Seen unterbrochene Linie, Meer durchgezogene Linie) eingezeichnet sowie der Regressionskoeffizient.

4.4 Diskussion

Durch die inselartige Verbreitung mit limitiertem Genfluss und kleineren lokalen Populationen mit mehr genetischer Drift sollte die Diversität innerhalb von Populationen in den Seen geringer sein als im Meer. Diese Überlegungen konnten nicht durch die genetische Diversität im engeren Sinne gemessen als Allel-Reichtum und Heterozygotie bestätigt werden.

Beim signifikanten Unterschied im Allel-Reichtum sind die Populationen in den Seen diverser und nicht etwa geringer differenziert. Die Unterschiede bei den Heterozygotien sind gerade nicht mehr signifikant, jedoch besteht auch hier die Tendenz zu diverseren Seenpopulationen im Vergleich zu den marinen.

Als mögliche Ursache kommt die Überlagerung der erwarteten Diversität durch Änderungen in der Diversität verursacht durch Prozesse wie der historischen Wiederbesiedlung nach der letzten Eiszeit in Frage.

Am deutlichsten zeigt sich der Einfluss der nacheiszeitlichen Wiederbesiedlung auf die Populationsstrukturen beim Allel-Reichtum. Auch bei der Untersuchung an der Buche *Fagus sylvatica* von COMPS *et al.* (2001) konnte der Allel-Reichtum die durch fossile Pollenuntersuchungen gefundene Wiederbesiedlungsgeschichte besser

widerspiegeln als die Heterozygotiegrade. Je größer die geografische Entfernung von den Rückzugsrefugien, um so geringer sollte die genetische Diversität innerhalb von Populationen sein. Bei den limnischen Populationen ist dies eindeutig der Fall. Populationen im Westen des Untersuchungsgebietes sind genetisch diverser als solche im Osten. Bei den marinen Populationen ist dies nicht zu beobachten, die genetische Vielfalt ist fast konstant. Da die Ostsee aber ein kontinuierlicher Lebensraum ist, konnte nach einer erfolgreichen Erstbesiedlung der Ostsee eine rasche Ausbreitung über den gesamten Lebensraum erfolgen, was sich in einem einheitlichen Allel-Reichtum widerspiegelt. Bei der Kolonisierung von Seen ist immer die Isolationsbarriere Land zu überbrücken. Gründereffekte und geringe Populationsgrößen mit hoher genetischer Drift sorgen für eine Minimierung der genetischen Diversität und so zu einer Verringerung des Allel-Reichtums mit steigendem Abstand zum Ausgangsrefugium.

Tendenziell ergibt sich ein ähnliches Bild bei den Heterozygotiegraden. Bei den limnischen Populationen nimmt die genetische Diversität von West nach Ost entsprechend der erwarteten Wiederbesiedlung ab, während die Diversität bei den marinen Populationen konstant bleibt (Erwartete Heterozygotie) bzw. nach Osten größer wird (Beobachtete Heterozygotie). Die Unterschiede sind nicht signifikant, deuten aber auf die gleiche Wiederbesiedlungsgeschichte hin wie der Allel-Reichtum. Welche der beiden Maße, Heterozygotie oder Allel-Reichtum, die genauere Abschätzung für die Wiederbesiedlungshistorie liefert, ist auf Grund dieses Datensatzes nicht zu sagen. Unter Umständen ist die gerade nicht mehr signifikante Beziehung von Längengrad zur Heterozygotie aber auf die von COMPS et al. (2001) gefundene ungenauere Abschätzung der Heterozygotie zurückzuführen.

Die Hypothese, dass durch die inselartige Verbreitung mit limitiertem Genfluss und kleineren lokalen Populationen mit mehr genetischer Drift die Diversität innerhalb von Populationen in den Seen geringer sein sollte als im Meer, konnte für die klonale Diversität bestätigt werden. In der klonalen Diversität als Messgröße für das Verhältnis sexueller zu asexueller Vermehrung spiegeln sich hauptsächlich Faktoren wie die Umweltbedingungen wider. Ebenso wie bei der genetischen Diversität ist auch ein Gradient mit der geografischen Länge feststellbar. Schon bei der Beprobung konnte beobachtet werden, dass im Westen des Untersuchungsgebietes *Potamogeton pectinatus* relativ selten im Meer gefunden werden konnte (in 8 von 15 Standorten) und dann ausschließlich in Einstromgebieten von Flüssen, wo die

Salinität infolge des Süßwassereinstroms geringer ist. Im Osten dagegen ist *Potamogeton pectinatus* in der Ostsee sehr häufig anzutreffen und konnte bei 10 von 11 Standorten gesammelt werden. Die Berechnung der Korrelation vom Simpson's Index mit der geografischen Länge ($R = 0,624$, $P = 0,017$) zeigt, dass nicht nur die Verbreitung von *Potamogeton pectinatus* im Westen limitiert ist, sondern auch dass die Klone größer sind als im Osten. Die Lebensbedingungen scheinen im Westen nicht so optimal zu sein, so dass *Potamogeton pectinatus* weniger häufig vorkommt und die sexuelle Reproduktion minimiert ist. Speziell am Rande der geografischen Verbreitung ist bei klonalen Pflanzen die Produktion von Samen oder anderen Teilen der sexuellen Reproduktion reduziert (Ashton & Mitchell, 1989; Eriksson, 1996), wobei eine Reihe von abiotischen und biotischen Faktoren direkt oder indirekt dafür bekannt sind, die Samenproduktion, Germination und Samenrekrutierung zu beeinflussen (Abrahamson, 1980; Richards, 1986). Als möglicher Faktor kommt für *Potamogeton pectinatus* in der Ostsee die Salinität in Frage. Die Ostsee ist ein Brackwassermeer, bei dem die Salinität nach Osten und Norden abnimmt. *Potamogeton pectinatus* ist ursprünglich eine limnische Pflanze, die salzwasser-tolerant ist. Mit zunehmendem Salzgehalt scheint eine erfolgreiche sexuelle Vermehrung oder aber die Ausbreitung von Samen und Früchten aus physiologischen Gründen nicht mehr möglich zu sein. Die Folge ist eine fast ausschließlich klonale Ausbreitung mit einer Reduktion der klonalen Variabilität, was zu größeren Klonen und einem geringeren Simpson's Index führt.

Die gleiche Beobachtung konnte in den Seen gemacht werden, nur in anderer Richtung. In 9 von 10 Seen im Westen des Untersuchungsgebietes konnte *Potamogeton pectinatus* gesammelt werden. Dagegen waren in den östlichen Gebieten nur in 8 von 26 Seen die Pflanzen zu finden. Die Verbreitung von *Potamogeton pectinatus* ist im Osten limitiert und die Klone sind größer als im Westen. Dies zeigt die Berechnung der Korrelation von Simpson's Index mit der geografischen Breite ($R = 0,642$, $P = 0,024$). Klone im Osten sind größer, der Simpson's Index für die klonale Diversität geringer. Die Verbreitung ist also ebenso limitiert wie im Meer, jedoch von West nach Ost. Im Meer ist die Verbreitung nach Westen limitiert, in den Seen nach Osten. Leider kann der Grund für diese geringere Besiedlungsdichte in den Seen nicht so einfach genannt werden wie beim Meer. Eine große Anzahl biotischer und abiotischer Faktoren kann die Verbreitung vom Kamm-

Laichkraut im Osten des Untersuchungsgebietes limitieren. Welche Faktoren dies sein könnten, kann nur eine umfassendere Untersuchung darlegen.

In wieweit häufige klonale Vermehrung genetische Diversität beeinflusst, ist unklar. Bei Vergleichen der genetischen Diversität zwischen sexuellen und dominant klonalen Populationen konnten kaum Unterschiede bei der genetischen Diversität festgestellt werden (Hamrick & Godt, 1996). Diese Studien führen zu dem Eindruck, dass klonale Reproduktion, unabhängig von den theoretischen Konsequenzen, keinen Einfluss auf die genetischen Strukturen von natürlichen Populationen hat. Von Eckert (2001) wird vermutet, dass die Skalierung der Probenahmen innerhalb und zwischen Populationen den Effekt von Klonalität nicht detektiert haben könnten, da die Abschätzung der genetischen Diversität in klonalen Populationen abhängig ist von der Sammelstrategie (Aspinwall & Christian, 1992; Hebert *et al.*, 1988; Widén *et al.*, 1994). Bei anderen Studien konnte sehr wohl ein starker Einfluss auf die genetische Variation innerhalb und zwischen Populationen (Muirhead & Lande, 1997; Silander, 1985), die effektive Populationsgröße und die daraus folgende genetische Drift (Eckert & Barrett, 1992; Gliddon *et al.*, 1987; Handel, 1985; Orive, 1993), die Metapopulationsdynamik (Olivieri & Gouyon, 1997) und die räumliche Verbreitung innerhalb eines geografischen Bereiches (Dorken & Eckert, 2001) festgestellt werden.

Wie es bei Populationen zur ausschließlichen asexuellen Vermehrung kommt, ist unklar, wobei es schwierig ist Ursache und Wirkung zu unterscheiden. Auf der einen Seite könnte ein Fitnessunterschied von sich ausschließlich asexuell vermehrenden und teilweise polyploiden Populationen vorhanden sein. Pflanzenarten, die sich asexuell vermehren können, sind meist weiter verbreitet und kommen in höheren Breitengraden und höheren Gebirgslagen vor als sich ausschließlich sexuell vermehrende Pflanzen bzw. Populationen (Bierzychudek, 1985). So ist von *Butomus umbellatus* dokumentiert, dass triploide, sterile Populationen in Nordamerika weiter nördlich und westlich vorkommen als fertile diploide (Eckert, 2001). Polyploide Populationen haben mehr Genvariationen und können so variabler auf Umweltveränderungen und Extrembedingungen reagieren. Dieser Fitnessunterschied könnte die Erklärung für die Verbreitung polyploider, asexueller Populationen am Rande der Verbreitungsgrenzen sein.

Die zweite Möglichkeit ergibt sich aus einem Gradienten des Verhältnisses von sexueller zu asexueller Reproduktion im Zusammenspiel mit der Bedeutung und

Häufigkeit von somatischen Mutationen. Durch ökologische Faktoren wie Lichtintensität, Temperatur oder Länge der Wachstumsaison (Abrahamson, 1980; Ashton & Mitchell, 1989; Eriksson, 1996; Pigott, 1981; Pigott & Huntley, 1981; Pilon & Santamaría, 2002; Richards, 1986) kommt es zur Verschiebung von sexueller Reproduktion hin zu asexueller. Da sich die Umweltbedingungen kontinuierlich ändern, ist ein Gradient von sexueller hin zu asexueller Reproduktion in Richtung der Verbreitungsgrenzen zu erwarten. Mit zunehmender Asexualität nimmt die Wahrscheinlichkeit und damit auch die Bedeutung von somatischen Mutationen zu. Da eine Veränderung des Chromosomensatzes bei asexuellen Arten durch somatische Mutationen hervorgerufen werden kann (Klekowski, 1997), sind am Rande von Verbreitungsgebieten vermehrt Populationen zu finden, die sich asexuell vermehren und polyploid sind. Verstärkt wird dieser Effekt dadurch, dass polyploide Arten häufig steril sind, denn dauerhafte sexuelle Unfruchtbarkeit kann durch einen Wechsel der Ploidie oder andere chromosomale Unregelmäßigkeiten hervorgerufen werden (Stebbins, 1971). Dadurch werden die Bedeutung und die Häufigkeit von somatischen Mutationen zusätzlich verstärkt.

Welche der beiden Möglichkeiten bei *Potamogeton pectinatus* zutrifft, ist aufgrund dieses Datensatzes nicht zu ermitteln. Jedoch gibt es eine Tendenz zu letzterer Erklärung, da sich die Populationen in Richtung zu schlechter besiedelbaren Habitaten häufiger asexuell vermehren und die Häufigkeit von somatischen Mutationen zunimmt. Veränderungen im Chromosomensatz wären in solchen Populationen zu erwarten. Bisherige Arbeiten zeigen, dass Triploide oder andere sterile Polyploide bei aquatischen Pflanzen nicht selten sind (Les & Philbrick, 1993; Preston & Croft, 1997). Bei *Potamogeton pectinatus*, einer hexaploiden Pflanze, schwankt die Chromosomenanzahl bei verschiedensten Untersuchungen extrem. So wurden Chromosomensätze zwischen 42 und 87 gefunden (Kalkman & Van Wijk, 1984; Les, 1983; Les & Sheridan, 1990; Misra, 1972), wobei die extreme Weite dieser Chromosomenzahlen nicht nur methodisch verursacht worden sein kann. Daher sollten bei weiteren Untersuchungen unter Einbeziehung von Chromosomenzahlen und genetischen Markern überprüft werden, bei welchen Umweltbedingungen das Verhältnis sexuelle zu asexuelle Reproduktion variiert, somatische Mutationen zunehmen und sich die Chromosomenanzahl verändert.

5 Vergleich des Genflusses zwischen limnischen und marinen Populationen von *Potamogeton pectinatus* L.

5.1 Einleitung

Seit fast 80 Jahren untersuchen Populationsgenetiker wie Physiographie und andere landschaftliche Gegebenheiten genetische Variation innerhalb und zwischen Populationen beeinflussen (Manel *et al.*, 2003). Diese Kombination aus Landschaftsökologie und Populationsgenetik, die Landschaftsgenetik genannt wird, soll zeigen, welchen Einfluss Landschaftseigenarten über Prozesse wie Genfluss und lokale Adaptation auf Populationen haben (Manel *et al.*, 2003). Die Stärke des Genflusses ist letztendlich entscheidend dafür, ob sich Teilpopulationen genetisch auseinander entwickeln können, was schließlich zur Artbildung führen kann (Slatkin, 1987). Bei Pflanzen ist aufgrund ihrer individuellen Bewegungsunfähigkeit die Struktur des Raumes zwischen Populationen entscheidend für die Verbreitung von Genen durch Pollen, Samen und vegetativen Produkten. Für terrestrische Pflanzen sind Ozeane oder große Wasserwege natürliche Verbreitungsbarrieren. Umgekehrt gilt für viele aquatische Pflanzen, dass deren Ausbreitungsstadien Landbarrieren zu überwinden haben. Schon Darwin (1859) wunderte sich in „The origin of species by means of natural selection“ über die großräumige Verbreitung einzelner limnischer Arten sowie die floristische und faunistische Ähnlichkeit von Seen über Länder und Kontinente hinweg. Von ihm durchgeführte Experimente zeigten, dass schon wenig Sediment aus Seen viele Pflanzensamen enthalten kann und eine Verbreitung dieser Sedimente durch Wasservögel über große geografische Distanzen möglich ist.

Ein Vergleich zwischen Populationen einer Art in unterschiedlichen Lebensräumen ermöglicht eine Abschätzung über die Bedeutung des Faktors „Struktur des Lebensraumes“ unabhängig von anderen, den Genfluss beeinflussenden Faktoren wie Fortpflanzungssystem, Blütenaufbau oder dem Bestäubungsmechanismus. Der Vergleich limnischer und mariner Populationen vom Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* soll diese Unterschiede aufzeigen. Seen können als insulare

Lebensräume in einer terrestrischen Umgebung betrachtet werden, die nur bedingt über Wassersysteme wie Bäche oder Flüsse miteinander verbunden sind. Ein Austausch von Individuen, Fragmenten, Dauerstadien, Samen oder allgemeiner Genen wird dadurch erschwert und eingeschränkt. Meere sind im Vergleich dazu riesige kontinuierliche Lebensräume mit theoretisch unbegrenztem Austausch zwischen Populationen. Horizontale Austauschprozesse führen zu einer Vermischung der Wassermassen über große Distanzen hinweg.

Ein Vergleich von limnischen und marinen Makrophyten könnte daher das folgende Muster zeigen: Bei gleicher geografischer Distanz könnte die genetische Distanz bei limnischen Populationen größer sein als bei marinen Populationen. Teile der genetischen Differenzierung zwischen Populationen können durch die geografische Isolierung erklärt werden. Das Modell „Isolation durch Entfernung“ (Kimura & Weiss, 1964; Wright, 1943) beschreibt einen kontinuierlichen Anstieg der genetischen Unterschiede zwischen Populationen mit zunehmender geografischer Distanz. Dieses Modell trifft immer dann zu, wenn der Dispersion von Individuen geografische Grenzen gesetzt sind, so dass der Genfluss zwischen Populationen mit zunehmender Entfernung sinkt und sich lokale genetische Unterschiede entwickeln können (Slatkin, 1993). Um die Unterschiede zwischen limnischen und marinen Populationen zu messen, werden die genetischen Distanzen (gemessen als F_{ST} -Werte) gegen die geografische Distanz aufgetragen. Wenn die theoretisch erwarteten Unterschiede feststellbar sind, sollte die Steigung der Korrelation bei marinen Populationen geringer sein als bei limnischen Populationen. In diesem Falle ist der Austausch über den Wasserkörper das Hauptdispersionsmuster. Sollten die Steigungen der beiden Vergleiche jedoch nicht unterschiedlich sein, so ist der Transport von Verbreitungsprodukten durch Vektoren wie Wasservögel so effektiv, dass die theoretische Barriere Land kein Verbreitungshindernis darstellt.

Vergleiche zwischen limnischen und marinen Populationen sind bisher selten durchgeführt worden. Meistens handelt es sich dabei um Übersichtsartikel, die genetische Variation innerhalb und zwischen Populationen bei verschiedenen Arten aus unterschiedlichsten Arbeiten miteinander vergleichen (DeWoody & Avise, 2000; Ward *et al.*, 1994). Bei einem Vergleich von 113 Fischarten konnten WARD *et al.* (1994) zeigen, dass die durchschnittliche genetische Differenzierung zwischen Populationen bei Süßwasserarten bei 0,222 liegt, bei marinen Fischen jedoch nur bei 0,062. Anadrome Fische haben bei diesen Untersuchungen eine durchschnittliche

Differenzierung zwischen Populationen von 0,108. Dies stützt die Hypothese, dass im kontinuierlichen Lebensraum Meer weniger Populationsdifferenzierung zu finden ist als in diskontinuierlichen Süßwasserhabitaten.

Nur sehr wenige Arbeiten vergleichen die genetische Differenzierung innerhalb einer Art. Da die meisten Arten entweder im Meer oder aber im Süßwasser leben, gibt es nur wenige Taxa, die für eine entsprechende Untersuchung geeignet sind.

Der dreistachelige Stichling *Gasterosteus aculeatus* kommt in beiden Lebensräumen vor, so dass Arbeiten mit Vergleichen limnischer und mariner Populationen vorliegen (Rafinski *et al.*, 1989; Reusch *et al.*, 2001; Withler & Mcphail, 1985).

Das Kamm-Laichkraut *Potamogeton pectinatus* eignet sich besonders, um Fragen zur Rolle der Habitatkonfiguration auf den Genaustausch zu untersuchen. Ursprünglich ist das Kamm-Laichkraut eine limnische Pflanze, die auch Salzwasser toleriert. Sie kommt unter anderem in der Ostsee und in den Seen an der Ostseeküste vor, besiedelt also beide Habitate. Ob bei dieser feststehenden und somit nicht so mobilen Art (im Vergleich zu Fischen) die Unterschiede zwischen limnischen Populationen größer sind als bei marinen oder ob der Transport durch Vektoren ebenso effektiv ist wie der Transport durch den Wasserkörper, soll die vorliegende Arbeit klären.

5.2 Material und Methode

5.2.1 Material

Aus 12 limnischen und 14 marinen Populationen von *Potamogeton pectinatus* wurden im Optimalfall 40 Rameten gesammelt. Die Probenorte können Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1 entnommen werden. Die genetische Analyse erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben.

5.2.2 Datenauswertung

Um Unterschiede bei der genetischen Differenzierung zwischen Populationen der beiden Habitatstypen festzustellen, wurden Unterschiede in der Korrelation von genetischer zu geografischer Distanz auf der Grundlage des Modells „Isolation durch Entfernung“ (Kimura & Weiss, 1964; Wright, 1943) ermittelt. Die genetische Distanz wurde als F_{ST} -Wert berechnet, dieser Wert beschreibt die Reduktion der Heterozygotie innerhalb von Subpopulationen im Vergleich zu der gesamten Population aufgrund von genetischer Drift (Wright, 1951). Dieses konventionelle Maß der F-Statistik wurde benutzt, da es vermutlich das bessere Ergebnis im Vergleich zu neueren Modellen liefert, die Informationen der Allelgröße inkorporieren (Goldstein *et al.*, 1995; Slatkin, 1995). Diese neueren Modelle tragen der hohen Mutationsrate der Mikrosatelliten Rechnung. Da aber in dieser Untersuchung der Fokus auf rezent stattfindendem Genfluss lag und dem zu Folge ein evolutionär kurzer Zeitabschnitt betrachtet wurde, spielte der Faktor Mutation eine unbedeutende Rolle (Andersen *et al.*, 1998). Darüber hinaus liefert der F_{ST} -Wert im Vergleich zu anderen Distanzmassen die besseren Abschätzungen bei Berechnungen der effektiven Populationsgröße, wenn sowohl die Probengröße ($n_s < 10$) als auch die Anzahl der Loci ($n_l < 20$) gering sind (Gaggiotti *et al.*, 1999). Die paarweise Berechnung der F_{ST} -Werte wurde mit dem Computerprogramm GENETIX (Belkir *et al.*, 1996) durchgeführt.

Innerhalb der Habitatstypen wurden die paarweisen F_{ST} -Werte verglichen mit der geografischen Distanz. Die geographische Distanz wurde mit Hilfe von Landkarten als direkte Luftlinie gemessen. *Potamogeton pectinatus* wird sowohl über Wasserwege als auch durch Wasservögel, insbesondere Schwäne verbreitet. Da die Flugwege der Wasservögel in dieser räumlichen Skalierung nicht genau verfolgt werden können und auf der anderen Seite nicht alle Gewässer über Fließsysteme verbunden sind, stellt die direkte Luftlinie die bestmögliche Schätzung der geografischen Distanz dar.

Um zu zeigen, wie groß der Einfluss der geografischen Distanz auf die Differenzierung zwischen Populationen beim Kamm-Laichkraut ist, wurde die Korrelation der geografischen mit der genetischen Distanz berechnet. Bei beiden Distanzmassen handelt es sich um Schätzwerte. Die geografische Distanz gemessen als Luftlinie entspricht nicht der tatsächlichen Besiedlung, und für die Berechnung von F_{ST} gibt es Grundvoraussetzungen, die nicht immer erfüllt sind. Daher stellen

beide Größenordnungen nur eine Abschätzung dar. Um die Signifikanz der Korrelation zwischen geografischer und genetischer Distanz zu messen wurde daher ein Mantel-Test (Mantel, 1967) durchgeführt. Die Berechnung der Korrelation mit dem Mantel-Test erfolgte mit dem Computerprogramm GENETIX (Belkir *et al.*, 1996). Da limnische und marine Standorte nahe der Ostsee dicht beisammen liegen, wären obige Betrachtungen hinfällig, sollte ein nennenswerter Queraustausch zwischen beiden Habitatstypen erfolgen. Um zu überprüfen, ob zwischen den beiden Habitatstypen ein genetischer Austausch stattfindet, wurden zunächst die paarweisen F_{ST} -Werte zwischen den marinen und den limnischen Populationen berechnet. Der mittlere F_{ST} -Wert über alle Populationen wurde dann verglichen mit dem maximalen F_{ST} -Wert. Liegt der mittlere F_{ST} -Wert in der Nähe des maximalen F_{ST} -wertes, ist von zwei unabhängigen Metapopulationen auszugehen.

F_{ST} -Werte können theoretisch Werte von 0 bis 1 annehmen. Der F_{ST} -Wert ist 0, wenn in zwei Populationen alle Allelfrequenzen gemeinsam vorkommen, dagegen ist er 1, wenn alle Allele für jede der Populationen fixiert sind. Dies gilt insbesondere für Allozyme und andere gering variable Marker. Für Mikrosatelliten konnten überlappende Sätze von Allelen bei komplett isolierten Populationen festgestellt werden (Paetkau *et al.*, 1997), vermutlich verursacht von einer hohen Anzahl von Wiederholungen und Rückmutationen. Wegen dieser Überlappung eigentlich unabhängiger Allele erreicht das Maximum von F_{ST} beim Vergleich von natürlichen Populationen nicht den Maximalwert von 1, sondern liegt zum Teil deutlich darunter. Nach Hedrick (1999) liegt der maximale F_{ST} -Wert bei Multilocus-Mikrosatelliten Analysen unterhalb von $1 - H_S$ (= der durchschnittlichen Heterozygotie innerhalb von Unterpopulationen). Der H_S Wert wurde mit dem Computerprogramm GENETIX (Belkir *et al.*, 1996) berechnet, um dann den maximale F_{ST} -Wert zu berechnen.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Genfluss innerhalb der Habitatstypen

Der durchschnittliche F_{ST} -Wert aller limnischen Populationen lag bei 0,234 (Vertrauensbereich 0,196 bis 0,277). Dagegen lag der durchschnittliche F_{ST} -Wert aller marinen Populationen bei 0,101 (Vertrauensbereich von 0,068 bis 0,139). Da sich die Vertrauensbereiche nicht überlappen, wird die Ausgangshypothese, dass limnische Populationen bei gleicher geografischer Distanz genetisch weiter entfernt sind als marine Populationen, bestätigt. Die Matrix der geografischen Distanz und der genetischen Distanz der Populationen im limnischen (Tabelle 5.1) und marinen Lebensraum (Tabelle 5.2) dienten als Datengrundlage für die Berechnung der „Isolation durch Distanz“ Korrelation mit dem Programm GENETIX (Belkir *et al.*, 1996).

Tabelle 5.1: Genetische Distanzen und geografische Distanzen zwischen allen limnischen Populationspaaren. Oberhalb der Diagonalen sind die geografischen Distanzen in km aufgetragen, unterhalb der Diagonalen die genetische Distanz als F_{ST} -Wert. Alle **fett** gedruckten F_{ST} -Werte sind nicht signifikant.

Geog. Distanz [km] Genetische Distanz [F_{ST}]	BE	DO	GPL	KE	KO	LA	PI	PL	SN	SEL	TR	WI
Bergsee	x	162	150	142	10	161	63	14	71	152	152	202
Dobbersdorfer See	0,449	x	21	23	174	11	111	157	96	10	17	40
Gr. Plöner See	0,386	0,074	x	12	160	12	93	142	80	19	3	52
Kellersee	0,406	0,182	0,067	x	152	20	88	135	73	14	12	60
Kolpinsee	0,255	0,356	0,270	0,274	x	171	72	19	80	162	161	212
Lancker See	0,516	0,151	0,143	0,211	0,421	x	106	153	92	17	10	41
Pinnower See	0,427	0,070	0,118	0,231	0,329	0,170	x	53	18	101	96	146
Plauer See	0,078	0,466	0,376	0,384	0,236	0,528	0,465	x	63	146	144	195
Schweriner See	0,504	0,151	0,162	0,225	0,415	0,184	0,090	0,544	x	86	82	133
Selentersee	0,505	0,122	0,099	0,170	0,377	0,171	0,171	0,501	0,208	x	16	52
Trammer See	0,406	0,141	0,061	-0,008	0,297	0,162	0,200	0,388	0,197	0,164	x	50
Wittensee	0,450	0,074	0,016	0,120	0,351	0,141	0,153	0,448	0,190	0,095	0,101	x

	BO	DW	DB	DS	GB	GZ	GW	HA	KS	MAA	RI	SH	SW	WW
Bojendorf	X	128	109	110	49	144	113	143	124	122	120	2	122	112
Dänische Wieck	0,231	X	28	27	156	25	28	29	8	233	12	125	19	29
Deviner Bucht	0,267	0,111	X	1	133	36	4	33	21	208	16	107	32	4
Deviner See	0,151	0,026	0,030	X	134	39	4	33	20	209	15	107	31	4
Großenbrode	0,122	0,179	0,121	0,039	X	168	135	165	151	78	147	49	146	134
Großer Zwicker	0,212	0,001	0,151	0,049	0,168	X	33	8	24	243	26	142	23	34
Gustower Wieck	0,144	0,005	0,093	-0,005	0,086	0,031	X	30	20	210	16	110	31	1
Having	0,215	0,018	0,146	0,047	0,204	0,035	0,040	X	26	238	27	141	21	31
Kooser See	0,260	0,003	0,112	0,022	0,175	0,014	0,026	0,054	X	227	5	121	12	22
Maasholm	0,187	0,234	0,231	0,141	0,089	0,236	0,168	0,209	0,244	X	223	123	221	209
Riems	0,258	0,115	0,150	0,112	0,188	0,115	0,106	0,169	0,110	0,281	X	117	9	17
Salzhaff	0,150	0,152	0,218	0,120	0,116	0,124	0,087	0,140	0,169	0,123	0,207	X	120	110
Schoritzer Wieck	0,181	0,012	0,090	-0,008	0,092	0,037	-0,017	0,029	0,021	0,170	0,109	0,098	X	32
Wamper Wieck	0,209	0,084	0,006	0,018	0,064	0,117	0,068	0,117	0,072	0,167	0,140	0,175	0,063	X

Tabelle 5.2: Genetische Distanzen und geografische Distanzen zwischen allen marinen Populationspaaren. Oberhalb der Diagonalen sind die geografischen Distanzen in km aufgetragen, unterhalb der Diagonalen die genetische Distanz als F_{ST} -Wert. Alle **fett** gedruckten F_{ST} -Werte sind nicht signifikant.

Die Korrelation zwischen geografischer und genetischer Distanz war in beiden Habitaten signifikant (Tabelle 5.3). Die lineare Darstellung der geografischen und der genetischen Distanz (Abbildung 5.1) zeigte eine deutlich größere Steigung bei den limnischen Habitaten. Die geringere Steigung der marinen Populationen zeigte die erwartete geringere Isolation durch Distanz als bei den limnischen Populationen. Limnische Populationen waren bei gleicher geografischer Distanz genetisch wesentlich weiter entfernt als vergleichbare marine Populationen.

Tabelle 5.3: Ergebnis des Mantel-Tests für die limnischen und marinen Populationen. Angegeben sind die Gleichungen für die Geraden, die Korrelation R sowie das Signifikanzniveau P nach dem Mantel-Test.

Lebensraum	Gleichung	R	P Mantel
Limnisch	$y = 0,0016 \times X + 0,11$	0,664	0,013
Marin	$y = 0,0008 \times X + 0,05$	0,701	0,015

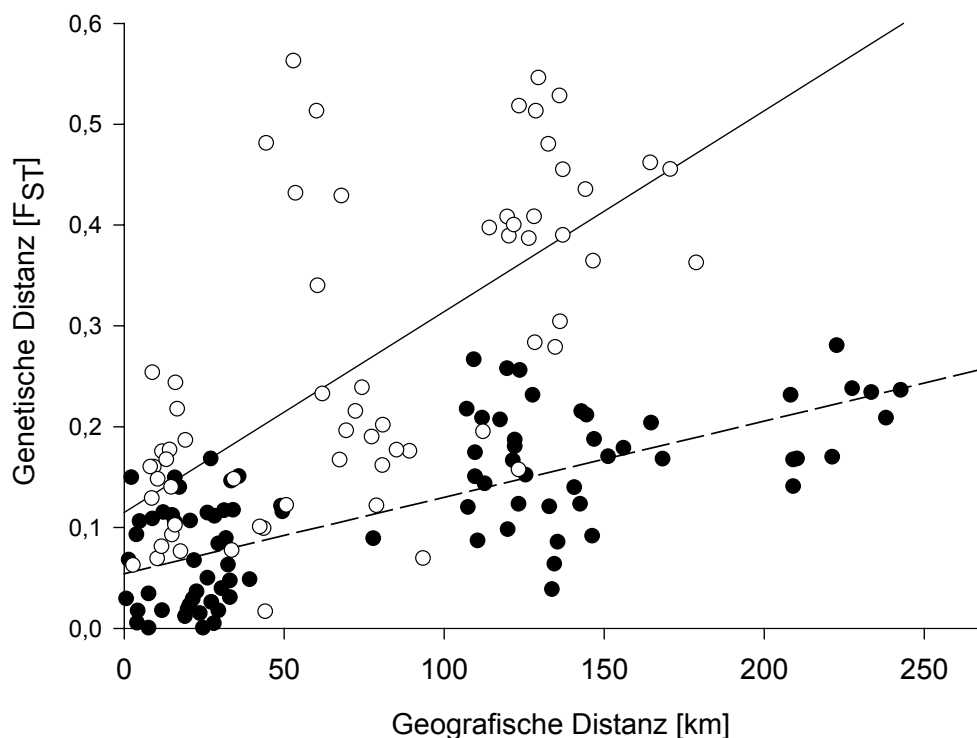


Abbildung 5.1: Vergleich der genetischen Distanz F_{ST} mit der geografischen Distanz. Dargestellt sind die Vergleiche aller limnischen Populationen untereinander (weiße Punkte) sowie der Vergleich aller marinen Populationen (schwarze Punkte) untereinander sowie die Regressionsgerade der beiden Habitatstypen (durchgehende Linie für limnische Populationen; unterbrochene Linie für marine Populationen).

5.3.2 Genfluss zwischen den beiden Habitatstypen

Die Darstellung der paarweisen F_{ST} -Werte gegen die geografische Länge zwischen jeweils einer limnischen und einer marinen Population zeigte keine signifikante Korrelation (Abbildung 5.2). Alle Werte zeigten eine große genetische Distanz schon bei geringer geografischer Distanz. Die geografischen und genetischen Distanzen sind dem Anhang zu entnehmen. Der Mittelwert aller paarweisen F_{ST} -Werte lag bei 0,42. Der maximale F_{ST} -Wert, berechnet nach Hedrick (1999), lag bei 0,513. Somit ist der genetische Austausch zwischen den beiden Habitatstypen gering und man kann von zwei nahezu unabhängigen Metapopulationen ausgehen.

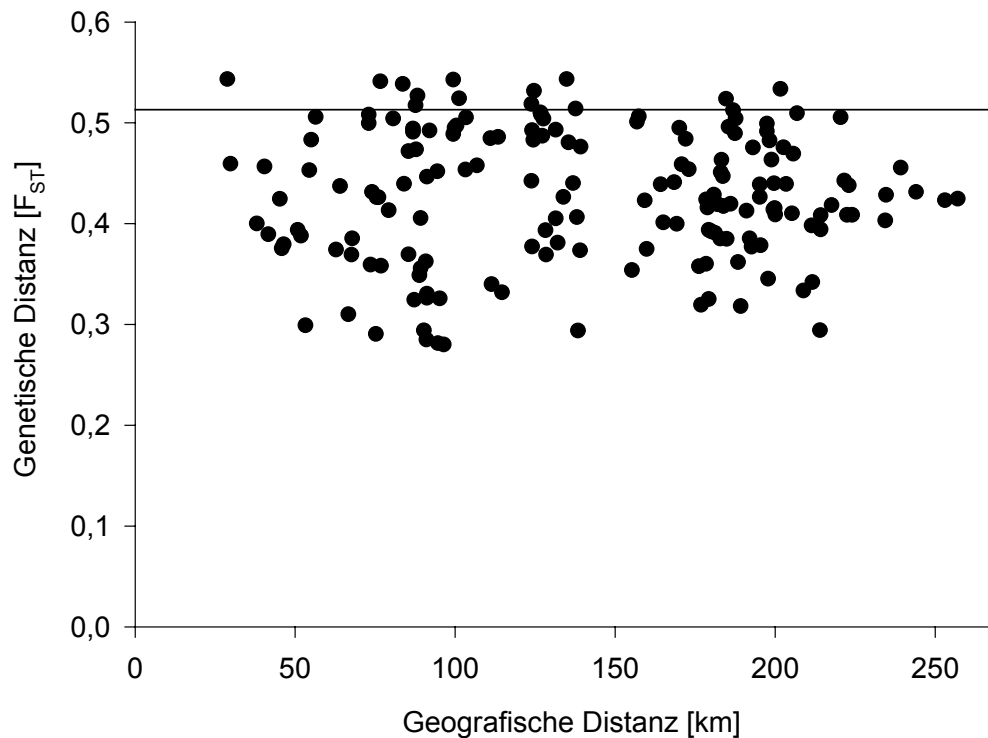


Abbildung 5.2: Vergleich der genetischen Distanz mit der geografischen Distanz zwischen Populationspaaren von limnischen und marinen Beständen von *Potamogeton pectinatus*. Berücksichtigt wurden nur paarweise Vergleiche zwischen jeweils einer limnischen und einer marinen Population. Die Gerade ist der theoretisch maximale F_{ST} -Wert berechnet nach Hedrick (2001).

5.4 Diskussion

Bei gleicher geografischer Distanz sind limnische Populationen genetisch wesentlich weiter voneinander entfernt als vergleichbare marine Populationen. Die Steigung bei der Korrelation ist bei limnischen Populationen ($1,6 \times 10^{-3}$) wesentlich steiler als bei marinen Populationen ($0,8 \times 10^{-3}$). Da keine entscheidenden Veränderungen im Fortpflanzungssystem, Blütenaufbau oder dem Bestäubungsmechanismus im Untersuchungsgebiet zu erwarten sind, reduziert sich der Vergleich der beiden Habitatstypen auf den Unterschied im Genfluss zwischen Populationen verursacht durch die räumliche Struktur des Lebensraumes. Die Überbrückung der Isolationsbarriere Land minimiert den Genfluss deutlich, so dass eine signifikante Isolation bei zunehmender geografischer Entfernung festgestellt werden kann. Durch den großen Austausch von Wassermassen ist für marine Populationen ein genetischer Austausch mit anderen Populationen fast unlimitiert möglich, so dass zwar eine Isolation durch Entfernung feststellbar ist, die jedoch geringer ist als bei limnischen Populationen.

Wie schon Darwin (1859) feststellte, muss es für limnische Pflanzen Möglichkeiten geben, die Isolationsbarriere Land zu überwinden. Die Verbreitung kann erfolgen in Form von Pollen, Samen, Früchten, vegetativen Produkten oder ganzen Pflanzen. Die Verbreitung durch Samen ist bei einem Vergleich limnischer und mariner Populationen von untergeordneter Bedeutung. Pollen sind wichtig für den genetischen Austausch zwischen Individuen eines Standortes, spielen aber für den Austausch von Genen über Standortgrenzen hinweg vermutlich eine untergeordnete Rolle. Um dies jedoch genauer zu quantifizieren, wäre es sinnvoll, die genetischen Differenzierungen innerhalb und zwischen Populationen mit Chloroplasten-DNA zu vergleichen. Unterschiede im Genfluss gemessen mit Mikrosatelliten und mit Chloroplasten-DNA lassen Aussagen über die Migrationsfähigkeiten von Samen bei *Potamogeton pectinatus* zu.

Die Kolonisation neuer Habitate scheint bevorzugt mit sexuell produzierten Samen stattzufinden, während für die Ausbreitung innerhalb des neuen Standortes die klonale Reproduktion vorteilhafter erscheint (Olivieri & Gouyon, 1997). Um die Isolationsbarriere Land zu überwinden, benutzen Pflanzen mobile Tiere. Um zu erkennen, wie sich Wasserpflanzen verbreiten können, machte Darwin (1859) Versuche. Er entnahm Seen oberflächliche Sedimente und zählte die aus diesem

„Matsch“ entstehenden Wasserpflanzen. Da sich Wasservögel in die Seen stellen, haftet sich das Sediment an den Füßen der Vögel fest. Es müsse schon außergewöhnliche Umstände geben, so Darwin (1859), wenn es dadurch nicht zur Verbreitung der Pflanzen kommen würde. Wichtige Vektoren bei der Samenverbreitung sind Tiere, wobei für Wasserpflanzen Transport durch Fische und Vögel von großer Bedeutung ist, während Reptilien und Amphibien eine untergeordnete Rolle zukommt. Da bei anderen limnischen Tieren wie Fischen und Reptilien auch eine Limitierung der Verbreitung durch die Habitatsstruktur gegeben ist, spielen Vögel für weiträumige Verbreitungsmuster die entscheidende Rolle. Dabei können Samen, wie schon von Darwin (1859) vermutet, an der Tieroberfläche anhaften (Endozoochorie) oder aber von den Tieren gefressen und wieder ausgeschieden werden (Epizoochorie). Früchte und Samen von *Potamogeton pectinatus* stellen eine bedeutende Komponente der Nahrung von Wasservögeln dar (Clausen *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2002; Idestam-Almquist, 1998). Speziell Früchte konnten in deren Magen und Darm gefunden werden. Santamariá *et al.* (2002) konnten das erfolgreiche Austreiben von *Potamogeton pectinatus* Früchten dokumentieren, die zuvor den Darmtrakt von Vögeln durchlaufen hatten. Folglich ist eine Verbreitung von Samen und Früchten durch Wasservögel zu erwarten und es kann zur engen Bindung von Pflanze und Tier kommen, so dass koevolutive Effekte (Ehrlich & Raven, 1964) zu beobachten sind. Da viele Wasservögel ein ausgeprägtes saisonales Wanderungsverhalten zeigen, ist mit einer parallelen Ausbreitung von Wasserpflanzen an den Hauptmigrationsrouten von Wasservögeln zu rechnen. Dies vermuteten King *et al.* (2002) bei ihren Untersuchungen über Populationsstrukturen bei *Potamogeton pectinatus*.

Zusätzlich zu dem Genaustausch mit anderen Populationen über Vektoren wie Wasservögel ist bei den marinen Populationen noch ein Austausch durch den Wasserkörper möglich. Durch die großräumige Verdriftung von Wassermassen können Samen, Früchte und vegetative Produkte weiträumig verfrachtet werden und sich in anderen Populationen ansiedeln. Die räumliche Variation von Umweltfaktoren verläuft innerhalb mariner Lebensräume als Gradient, während in Seen diskrete Unterschiede bestehen, auch wenn sie über Fließgewässer verbunden sind.

Durch die weiträumige horizontale Verfrachtung ist ein regelmäßiger Genfluss bei marinen Arten möglich, der einen lokal adaptierten Genpool mit neuen Genen auffrischt und somit eine Differenzierung vermindert. In Seen dagegen leben diskrete

Populationen, bei denen der Austausch von Genen für die meisten Taxa eingeschränkt ist. Durch diese Verringerung des Genflusses erhalten Selektion und genetische Drift eine größere Bedeutung und führen zu lokalen Populationen, deren Genpool sich signifikant von anderen, benachbarten Populationen unterscheiden kann. Dies kann die Entstehung neuer Arten begünstigen.

Die durchschnittliche genetische Differenzierung zwischen den Populationen gemessen als F_{ST} -Wert liegt bei den limnischen Populationen bei 0,234 (Vertrauensbereich von 0,196 bis 0,277). Der Wert für die marinen Populationen liegt mit 0,101 (Vertrauensbereich von 0,068 bis 0,139) erwartungsgemäß deutlich tiefer. Da sich die Vertrauensbereiche nicht überlappen wird die Ausgangshypothese, dass limnische Populationen bei gleicher geografischer Distanz genetisch weiter entfernt sind als marine Populationen, bestätigt. Die bei dieser Studie gefundenen Werte unterscheiden sich nicht deutlich von den Werten des Vergleichs von 113 Fischarten durch Ward *et al.* (1994). Die dort gefundene durchschnittliche genetische Differenzierung lag bei 0,222 (0,031 SD) für limnische Fische und bei 0,062 (0,011SD) für marine. Bei dieser Untersuchung wurden die unterschiedlichsten Arten unabhängig von Lebens- und Fortpflanzungsmechanismus in einem gemeinsamen Vergleich analysiert. Die Nähe der Werte beider Untersuchungen lässt vermuten, dass für die genetische Differenzierung zwischen aquatischen Populationen nicht die unterschiedlichen Lebens- und Fortpflanzungsmechanismen verantwortlich sind, sondern in einem deutlicheren Maße die räumliche Strukturierung zwischen den Populationen.

Die genetische Differenzierung zwischen Populationen von *Potamogeton pectinatus* ist minimal größer als die der gemittelten Werte für Fische. Der Unterschied könnte verursacht werden durch die größere Mobilität von Fischen im Vergleich zu festsitzenden Wasserpflanzen. Bestätigt werden diese Annahmen durch mikrosatelliten-basierende Untersuchungen anderer mariner Pflanzen. Deren durchschnittliche F_{ST} -Werte liegen mit 0,12 bei *Zostera marina* (deutsche und niederländische Probenorte von Reusch *et al.*, 2000) und 0,14 bei *Posidonia oceanica* (Procaccini & Mazzella, 1998) in der Nähe von marinen Populationen von *Potamogeton pectinatus*, jedoch deutlich unter den F_{ST} -Werten von limnischen Populationen.

Die Angabe der durchschnittlichen F_{ST} -Werte kann durch Stichprobengröße und vor allem durch unterschiedliche geografische Probennahme beeinflusst werden. Eine

Angabe der „Isolation durch Distanz“ Korrelation stellt in diesem Fall die bessere Methode zum Vergleich von genetischen Distanzen zwischen Populationen dar. Diesbezüglich sind zur Zeit jedoch noch keine Vergleichsdaten limnischer und mariner Populationen verfügbar.

Der genetische Austausch zwischen den Habitatstypen ist sehr gering, so dass man von zwei nahezu unabhängigen Metapopulationen ausgehen kann. Die Korrelation der F_{ST} -Werte gegen die geografische Länge ist nicht signifikant und der Mittelwert aller paarweisen F_{ST} -Werte liegt mit 0,42 nahe dem maximalen F_{ST} -Wert mit 0,513 (berechnet nach Hedrick, 1999). Zwischen limnischen Populationen ist bei gleicher geografischer Entfernung durch die Vektoren noch ein Genaustausch feststellbar, während es zwischen limnischen und marinen Populationen nur zu einem minimalen Austausch kommt. Warum es zwischen den beiden Metapopulationen zu einem geringen genetischen Austausch kommt, bleibt unklar und sollte in weiteren Untersuchungen erforscht werden. Eine mögliche Ursache könnte in physiologischen Gründen liegen. Ein anderer Salzgehalt als der ursprüngliche könnte die Chance einer erfolgreichen Besiedlung durch Samen oder vegetative Produkte wie Knollen oder Pflanzenteile minimieren. Lokale Adaptation beispielsweise an den Salzgehalt könnte beim Konkurrieren um einen anderen Standort mit anderer Salinität einen Fitnessunterschied ausmachen, der eine Besiedlung unmöglich macht oder zumindest erschwert (Linhart & Grant, 1996; Silander, 1979). Letztendlich könnte diese Entwicklung zur Entstehung einer neuen Art führen. Wenn die unterschiedlichen Salinitäten eine erfolgreiche Besiedlung und somit einen Genfluss zwischen den beiden Habitaten minimieren, können sich Pflanzen durch lokale Adaptation so weit voneinander entfernen, dass ein erfolgreicher Genaustausch bei neutralen Umweltbedingungen nicht mehr möglich ist. Somit käme es zu einer sympatrischen Artbildung.

Noch muss jedoch von einer Art ausgegangen werden, zumal im Einzelfall auch die erfolgreiche Besiedlung im anderen Habitatstyp nachgewiesen werden konnte. So konnten im Großen Plöner See zwei Geneten nachgewiesen werden, deren nächste Verwandte im nah gelegenen marinen Standort Großenbrode zu finden waren (siehe Kapitel 3). Noch findet also ein minimaler Genfluss statt, der über einen langen Zeitraum vielleicht nicht mehr ausreichen könnte, um eine Artbildung zu verhindern. In weiteren Untersuchungen sollte erforscht werden, warum der Genfluss zwischen den Metapopulationen so stark reduziert ist. Physiologische Gründe oder ein

Fitnessdefizit sind denkbar. Ebenso könnte eine Neuansiedlung in einer schon lange existierenden Unterwasserwiese unabhängig vom Habitatstyp eine erfolgreiche Besiedlung verhindern.

6 Literatur

- Abrahamson WG (1980) Demography and vegetative reproduction. In: Demography and Evolution in Plant Populations (ed Solbrig, O.T.) Blackwell, Oxford, 89 – 106.
- Amos W, Sawcer SJ, Feakes RW & Rubinsztein DC (1996) Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genetics* **13**, 390-391.
- Andersen LW, Born EW, Gjertz I, Wiig O, Holm LE & Bendixen C (1998) Population structure and gene flow of the Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the eastern Atlantic Arctic based on mitochondrial DNA and microsatellite variation. *Molecular Ecology* **7**, 1323-1336.
- Antolin MF & Strobeck C (1985) The Population Genetics of Somatic Mutation in Plants. *American Naturalist* **126**, 52-62.
- Ashton PJ & Mitchell DS (1989) Aquatic plants: Patterns and modes of invasion, attributes of invading species and assessment of control programs. In: Biological Invasions: A Global Perspective (ed Drake JA, Mooney HA, Di Castri F, Groves RH, Kruger FJ, Rejmánek & Williamson MH, John Wiley & Sons Ltd., London, 111 –154.
- Aspinwall N & Christian T (1992) Clonal Structure, Genotypic Diversity, and Seed Production in Populations of *Filipendula rubra* (Rosaceae) from the Northcentral United-States. *American Journal of Botany* **79**, 294-299.
- Avise J (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Beckmann JS & Weber JL (1992) Survey of Human and Rat Microsatellites. *Genomics* **12**, 627-631.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N & Bonhomme F (1996 - 2002) GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bierne N, Launey S, Naciri-Graven Y & Bonhomme F (1998) Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* **148**, 1893-1906.

- Bierzuchudek P (1985) Patterns in Plant Parthenogenesis. *Experientia* **41**, 1255-1264.
- Boyer JC & Farber RA (1998) Mutation rate of a microsatellite sequence in normal human fibroblasts. *Cancer Research* **58**, 3946-3949.
- Bruford MW & Altmann J (1993) DNA-Fingerprinting and the Problems of Paternity Determination in an Inbred Captive Population of Guinea Baboons (*Papio hamadryas papio*). *Primates* **34**, 403-411.
- Capossela A, Silander JA, Jansen RK, Bergen B & Talbot DR (1992) Nuclear Ribosomal DNA Variation among Ramets and Genets of White Clover. *Evolution* **46**, 1240-1247.
- Casper SJ & Krausch H-D (1980) Süßwasserflora von Mitteleuropa: Pteridophyta und Anthophyta. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Chakraborty R & Weiss KM (1988) Admixture as a Tool for Finding Linked Genes and Detecting That Difference from Allelic Association between Loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 9119-9123.
- Clausen P, Nolet BA, Fox AD & Klaassen M (2002) Long distance endozoochorous dispersal of submerged macrophyte seeds by migratory waterbirds in northern Europe - a critical review of possibilities and limitations. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **23**, 191-203.
- Comps B, Gomory D, Letouzey J, Thiebaut B & Petit RJ (2001) Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* **157**, 389-397.
- Dallas JF (1992) Estimation of Microsatellite Mutation Rates in Recombinant Inbred Strains of Mouse. *Mammalian Genome* **3**, 452-456.
- Darwin C (1859) *The Origin of Species by Means of Natural Selection*, Murray, London.
- Den Hartog C (1970) The seagrasses of the world. *Verh K Ned Akad Wet Afd Natuurk II* 59: 1-275.
- DeWoody JA & Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous Fishes compared with other Animals. *Journal of Fish Biology* **56**, 461-473.

- Dorken ME & Eckert CG (2001) Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* **89**, 339-350.
- Douhovnikoff V & Dodd RS (2003) Intra-clonal variation and a similarity threshold for identification of clones: application to *Salix exigua* using AFLP molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 1307-1315.
- Dow BD, Ashley MV & Howe HF (1995) Characterization of Highly Variable (GA/CT)_N Microsatellites in the Bur Oak, *Quercus macrocarpa*. *Theoretical and Applied Genetics* **91**, 137-141.
- Doyle JJ & Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**, 11-15.
- Eckert CG (2001) The loss of sex in clonal plants. *Evolutionary Ecology* **15**, 501-520.
- Eckert CG & Barrett SCH (1992) Stochastic Loss of Style Morphs from Populations of Tristylous *Lythrum salicaria* and *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Evolution* **46**, 1014-1029.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT & Chakraborty R (1992) Genetic Variation at 5 Trimeric and Tetrameric Tandem Repeat Loci in 4 Human-Population Groups. *Genomics* **12**, 241-253.
- Ehrlich PR & Raven PH (1964) Butterflies and Plants - a Study in Coevolution. *Evolution* **18**, 586-608.
- Ellegren H, Johansson M, Sandberg K & Andersson L (1992) Cloning of Highly Polymorphic Microsatellites in the Horse. *Animal Genetics* **23**, 133-142.
- Ellstrand NC & Roose ML (1987) Patterns of Genotypic Diversity in Clonal Plant Species. *American Journal of Botany* **74**, 123-131.
- El Mousadik A & Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* **92**, 832-839.
- Eriksson O (1996) Regional dynamics of plants: A review of evidence for remnant, source-sink and metapopulations. *Oikos* **77**, 248-258.
- Eynard I & Dalmasso G (1990) Viticoltura moderna. U. Hoepli, Milano.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP, Phylogeny Inference Package. Department of Genetic, University of Washington, Seattle.

- Franks T, Botta R & Thomas MR (2002) Chimerism in grapevines: Implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 192-199.
- Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K & Gliddon C (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology* **8**, 1513-1520.
- Gill BS, Kammorgan LNW & Shepard JF (1985) An Apparent Meiotic Mutation in a Mesophyll Cell Protoclone of the Russet Burbank Potato. *Journal of Heredity* **76**, 17-20.
- Gliddon C, Belhassen E & Gouyon PH (1987) Genetic Neighborhoods in Plants with Diverse Systems of Mating and Different Patterns of Growth. *Heredity* **59**, 29-32.
- Goldstein DB, Linares AR, Cavallisforza LL & Feldman MW (1995) An Evaluation of Genetic Distances for Use with Microsatellite Loci. *Genetics* **139**, 463-471.
- Gornall RJ, Hollingsworth PM & Preston CD (1998) Evidence for spatial structure and directional gene flow in a population of an aquatic plant, *Potamogeton coloratus*. *Heredity* **80**, 414-421.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Green AJ, Figuerola J & Sanchez MI (2002) Implications of waterbird ecology for the dispersal of aquatic organisms. *Acta Oecologica* **23**, 177-189.
- Hamada H, Petrino MG & Kakunaga T (1982) A Novel Repeated Element with Z-DNA-Forming Potential Is Widely Found in Evolutionarily Diverse Eukaryotic Genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **79**, 6465-6469.
- Hamilton MB, Pincus EL, Di Fiore A & Fleischer RC (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques* **27**, 500.
- Hammer UT & Heseltine JM (1988) Aquatic Macrophytes in Saline Lakes of the Canadian Prairies. *Hydrobiologia* **158**, 101-116.
- Hämmerli A & Reusch TBH (2003a) Genetic neighbourhood of clone structures in eelgrass meadows quantified by spatial autocorrelation of microsatellite markers. *Heredity* **91**, 448-455.

- Hämmerli A & Reusch TBH (2003b) Inbreeding depression influences genet size distribution in a marine angiosperm. *Molecular Ecology* **12**, 619-629.
- Hamrick JL & Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **351**, 1291-1298.
- Handel SN (1985) The Intrusion of Clonal Growth-Patterns on Plant-Breeding Systems. *American Naturalist* **125**, 367-384.
- Hangelbroek HH, Ouborg NJ, Santamaria L & Schwenk K (2002) Clonal diversity and structure within a population of the pondweed *Potamogeton pectinatus* foraged by Bewick's swans. *Molecular Ecology* **11**, 2137-2150.
- Harper GL (1977) Population biology of plants. Academic Press, New York.
- Hebert PDN, Ward RD & Weider LJ (1988) Clonal Diversity Patterns and Breeding-System Variation in *Daphnia pulex*, an Asexual-Sexual Complex. *Evolution* **42**, 147-159.
- Hedrick PW (1999) Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**, 313-318.
- Hettiarachchi P & Triest L (1991) Isozymes in water plants. *Op. Bot. Belg.*, 87-114.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hollingsworth PM, Preston CD & Gornall RJ (1996) Genetic variability in two hydrophilous species of *Potamogeton*, *P. pectinatus* and *P. filiformis* (Potamogetonaceae). *Plant Systematics and Evolution* **202**, 233-254.
- Hosper SH (1989) Biomanipulation, new perspectives for restoration of shallow, eutrophic lakes in the Netherlands. *Hydrobiol. Bull.* **23**, 5-10.
- Hughes CR & Queller DC (1993) Detection of Highly Polymorphic Microsatellite Loci in a Species with Little Allozyme Polymorphism. *Molecular Ecology* **2**, 131-137.
- Hurlbert SH (1971) Nonconcept of Species Diversity - Critique and Alternative Parameters. *Ecology* **52**, 577-&.
- Hutchinson GE (1975) A Treatise on Limnology, Volume III, Limnologica Botany, John Wiley & Sons, New York.
- Idestam-Almquist J (1998) Waterfowl herbivory on *Potamogeton pectinatus* in the Baltic sea. *Oikos* **81**, 323-328.

- James WF & Barko JW (1990) Macrophyte Influences on the Zonation of Sediment Accretion and Composition in a North Temperate Reservoir. *Archiv Für Hydrobiologie* **120**, 129-142.
- Kalkman L & Vanwijk RJ (1984) On the Variation in Chromosome-Number in *Potamogeton pectinatus* L. *Aquatic Botany* **20**, 343-349.
- Kemperman JA & Barnes BV (1976) Clone Size in *American aspens*. *Canadian Journal of Botany* **54**, 2603-2607.
- Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA & Thomas MR (1994) Enrichment of Microsatellites from the Citrus Genome Using Biotinylated Oligonucleotide Sequences Bound to Streptavidin Coated Magnetic Particles. *Biotechniques* **16**, 656.
- Kimura M & Weiss GH (1964) Stepping Stone Model of Population Structure. Decrease of Genetic Correlation with Distance. *Genetics* **49**, 561-&.
- King RA, Gornall RJ, Preston CD & Croft JM (2002) Population differentiation of *Potamogeton pectinatus* in the Baltic Sea with reference to waterfowl dispersal. *Molecular Ecology* **11**, 1947-1956.
- Klekowski EJ (1997) Somatic Mutation theory of clonality. In: The ecology and evolution of clonal plants (ed. de Kroon, H. & van Groenendael, J.), Backhuys Publisher, Leiden., 227-241.
- Klekowski EJ & Godfrey PJ (1989) Aging and Mutation in Plants. *Nature* **340**, 389-391.
- Kwiatkowski DJ, Henske EP, Weimer K, Ozelius L, Gusella JF & Haines J (1992) Construction of a GT Polymorphism Map of Human 9q. *Genomics* **12**, 229-240.
- Les DH (1983) Taxonomic Implications of Aneuploidy and Polyploidy in *Potamogeton* (Potamogetonaceae). *Rhodora* **85**, 301-323.
- Les DH & Philbrick CT (1993) Studies of Hybridization and Chromosome Number Variation in Aquatic Angiosperms Evolutionary Implications. *Aquatic Botany* **44**, 181-228.
- Les DH & Sheridan DJ (1990) Hagström's Concept of Phylogenetic-Relationships in *Potamogeton* L (Potamogetonaceae). *Taxon* **39**, 41-58.
- Levinson G & Gutman GA (1987) Slipped-Strand Mismatching - a Major Mechanism for DNA-Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 203-221.

- Linhart YB & Grant MC (1996) Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 237-277.
- Lokker C, Susko D, Lovettdoust L & Lovettdoust J (1994) Population Genetic Structure of *Vallisneria americana*, a Dioecious Clonal Macrophyte. *American Journal of Botany* **81**, 1004-1012.
- Loveless MD & Hamrick JL (1984) Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**, 65-95.
- Luikart G, Sherwin WB, Steele BM & Allendorf FW (1998) Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* **7**, 963-974.
- Mader E, van Vierssen W & Schwenk K (1998) Clonal diversity in the submerged macrophyte *Potamogeton pectinatus* L. inferred from nuclear and cytoplasmic variation. *Aquatic Botany* **62**, 147-160.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G & Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 189-197.
- Mantel N (1967) Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* **27**, 209-&.
- Mayr E (1967) Artbegriff und Evolution. Parey, Hamburg und Berlin.
- Misra MP (1972) Cytological studies in some Indian Potamogeton and Aponogeton species. *Bulletin of the botanical Society of Bengal*, 47-51.
- Morgan MT (2001) Consequences of life history for inbreeding depression and mating system evolution in plants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**, 1817-1824.
- Mort MA & Wolf HG (1986) The Genetic Structure of Large-Lake Daphnia Populations. *Evolution* **40**, 756-766.
- Muirhead CA & Lande R (1997) Inbreeding depression under joint selfing, outcrossing, and asexuality. *Evolution* **51**, 1409-1415.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273.

- Olivieri I & Gouyon P (1997) Evolution of Migration Rate and other Traits. In: Metapopulation Biology. Ecology, Genetics and Evolution (ed. Hanski, I.A. & Gilpin, M.A.), Academic Press, San Diego., 293-323.
- Orive ME (1993) Effective Population Size in Organisms with Complex Life Histories. *Theoretical Population Biology* **44**, 316-340.
- Orive ME (2001) Somatic mutations in organisms with complex Life Histories. *Theoretical Population Biology* **59**, 235-249.
- Orth RJ, Moore KA & Gordon HH (1979) Distribution and abundance of submerged aquatic vegetation in the lower Chesapeake Bay, Virginia. U.S. Environ. Prot. Agency Rep.600/8-79-029/SAV1. 199 pp.
- Paetkau D, Waits LP, Clarkson PL, Craighead L & Strobeck C (1997) An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* **147**, 1943-1957.
- Palumbi SR (1992) Marine Speciation on a Small Planet. *Trends in Ecology & Evolution* **7**, 114-118.
- Palumbi SR (1996) What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **203**, 75-92.
- Pemberton JM, Coltman DW, Coulson TN & Slate J (1999) Using microsatellites to measure the fitness consequences of inbreeding and outbreeding. In: Microsatellites. Evolution and application (ed. Goldstein DB & Schlotterer C), Oxford University Press, pp. 151-164.
- Petit RJ, El Mousadik A & Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855.
- Pigott CD (1981) Nature of seed sterility and natural regeneration of *Tilia cordata* at the northern limit in Finland. *Ann.Bot.Fennici*, 255 –263.
- Pigott CD & Huntley JP (1981) Factors Controlling the Distribution of *Tilia cordata* at the Northern Limits of Its Geographical Range .3. Nature and Causes of Seed Sterility. *New Phytologist* **87**, 817-839.
- Pilon J & Santamaría L (2002) Clonal variation in morphological and physiological responses to irradiance and photoperiod for the aquatic angiosperm *Potamogeton pectinatus*. *Journal of Ecology* **90**, 859-870.
- Preston CD & Croft JM (1997) Aquatic Plants in Britain and Ireland. Harley Books, Colchester.

- Procaccini G & Mazzella L (1998) Population genetic structure and gene flow in the seagrass *Posidonia oceanica* assessed using microsatellite analysis. *Marine Ecology-Progress Series* **169**, 133-141.
- Rafinski J, Banbura J & Przybylski M (1989) Genetic Differentiation of Fresh-Water and Marine Sticklebacks, (*Gasterosteus-Aculeatus*) of Eastern-Europe. *Zeitschrift Für Zoologische Systematik Und Evolutionsforschung* **27**, 33-43.
- Rassmann K, Schlötterer C & Tautz D (1991) Isolation of Simple-Sequence Loci for Use in Polymerase Chain Reaction-Based DNA Fingerprinting. *Electrophoresis* **12**, 113-118.
- Raymond M & Rousset F (1995) Genepop (Version-1.2) Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Reilly A, Elliott NG, Grewe PM, Clabby C, Powell R & Ward RD (1999) Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture* **173**, 459-469.
- Reusch TBH, Bostrom C, Stam WT & Olsen JL (1999a) An ancient eelgrass clone in the Baltic. *Marine Ecology-Progress Series* **183**, 301-304.
- Reusch TBH, Stam WT & Olsen JL (1999b) Microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations. *Molecular Ecology* **8**, 317-321.
- Reusch TBH, Stam WT & Olsen JL (2000) A microsatellite-based estimation of clonal diversity and population subdivision in *Zostera marina*, a marine flowering plant. *Molecular Ecology* **9**, 127-140.
- Reusch TBH, Wegner KM & Kalbe M (2001) Rapid genetic divergence in postglacial populations of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): the role of habitat type, drainage and geographical proximity. *Molecular Ecology* **10**, 2435-2445.
- Richards AJ (1986) Plant Breeding Systems, George Allen & Unwin, London.
- Ruckelshaus MH (1998) Spatial scale of genetic structure and an indirect estimate of gene flow in eelgrass, *Zostera marina*. *Evolution* **52**, 330-343.
- Sanchez JA, Clabby C, Ramos D, Blanco G, Flavin F, Vazquez E & Powell R (1996) Protein and microsatellite single locus variability in *Salmo salar* L (Atlantic salmon). *Heredity* **77**, 423-432.

- Santamaría L, Charalambidou I, Figuerola J & Green AJ (2002) Effect of passage through duck gut on germination of fennel pondweed seeds. *Archiv Für Hydrobiologie* **156**, 11-22.
- Schaal BA & Learn GH (1988) Ribosomal DNA Variation within and among Plant Populations. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**, 1207-1216.
- Scheffer M, Hosper SH, Meijer ML, Moss B & Jeppesen E (1993) Alternative Equilibria in Shallow Lakes. *Trends in Ecology & Evolution* **8**, 275-279.
- Schlötterer C & Tautz D (1992) Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA. *Nucleic Acids Research* **20**, 211-215.
- Silander JA (1979) Micro-Evolution and Clone Structure in *Spartina patens*. *Science* **203**, 658-660.
- Silander JA (1985) Microevolution in clonal plants. In: Population Biology and Evolution of Clonal Organisms (ed. Jackson JBC, Buss LW & Cook RE, Yale University Press, London, 107–152.
- Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. *Nature* **163**, 688-688.
- Slatkin M (1987) Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* **236**, 787-792.
- Slatkin M (1993) Isolation by Distance in Equilibrium and Nonequilibrium Populations. *Evolution* **47**, 264-279.
- Slatkin M (1995) A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics* **139**, 457-462.
- Sneath PHA & Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Stebbins GL (1971) Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold, London.
- Steinger T, Korner C & Schmid B (1996) Long-term persistence in a changing climate: DNA analysis suggests very old ages of clones of alpine *Carex curvula*. *Oecologia* **105**, 94-99.
- Tautz D (1989) Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Tautz D & Renz M (1984) Simple Sequences Are Ubiquitous Repetitive Components of Eukaryotic Genomes. *Nucleic Acids Research* **12**, 4127-4138.
- Tuskan GA, Francis KE, Russ SL, Romme WH & Turner MG (1996) RAPD markers reveal diversity within and among clonal and seedling stands of aspen in

- Yellowstone National Park, USA. *Canadian Journal of Forest Research* **26**, 2088-2098.
- Van Donk E, Grimm MP, Gulati RD & Breteler JPGK (1990) Whole-Lake Food Web Manipulation as a Means to Study Community Interactions in a Small Ecosystem. *Hydrobiologia* **200**, 275-289.
- Verhoeven JTA (1980) The Ecology of Ruppia-Dominated Communities in Western Europe .2. Synecological Classification - Structure and Dynamics of the Macroflora and Macrofauna Communities. *Aquatic Botany* **8**, 1-85.
- Wain RP, Haller WT & Martin DF (1985) Isozymes in Studies of Aquatic Plants. *Journal of Aquatic Plant Management* **23**, 42-45.
- Walbot V (1986) Inheritance of Mutator Activity in *Zea mays* as Assayed by Somatic Instability of the Bz2-Mu1 Allele. *Genetics* **114**, 1293-1312.
- Ward RD, Woodwark M & Skibinski DOF (1994) A Comparison of Genetic Diversity Levels in Marine, Fresh-Water, and Anadromous Fishes. *Journal of Fish Biology* **44**, 213-232.
- Waycott M (1998) Genetic variation, its assessment and implications to the conservation of seagrasses. *Molecular Ecology* **7**, 793-800.
- Weber JL (1990) Informativeness of Human (Dc-Da)N.(Dg-Dt)N Polymorphisms. *Genomics* **7**, 524-530.
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G & Lathrop M (1992) A 2nd-Generation Linkage Map of the Human Genome. *Nature* **359**, 794-801.
- Whitham TG & Slobodchikoff CN (1981) Evolution by Individuals, Plant-Herbivore Interactions, and Mosaics of Genetic Variability. The Adaptive Significance of Somatic Mutations in Plants. *Oecologia* **49**, 287-292.
- Widén B, Cronberg N & Widén M (1994) Genotypic Diversity, Molecular Markers and Spatial-Distribution of Genets in Clonal Plants, a Literature Survey. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* **29**, 245-263.
- Withler RE & McPhail JD (1985) Genetic Variability in Fresh-Water and Anadromous Sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) of Southern British-Columbia. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **63**, 528-533.
- Wright S (1943) Isolation by Distance. *Genetics* **28**, 114-138.
- Wright S (1951) The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354.

Anhang

Anhang 1: Tabelle mit den untersuchten Seen. In der Spalte Vorhanden ist angegeben, ob *Potamogeton pectinatus* am Standort gefunden werden konnte, in der Spalte Analysiert ist angegeben, ob *Potamogeton pectinaus* gesammelt und analysiert wurde.

Gewässer	Ort	Abk.	Breite	Länge	Standort	Vorhanden	Analysiert
Bergsee	Alt Gaarz	BE	53°35'01''	12°30'26''	L	X	X
Bistensee	Bistensee		54°23'50''	9°42'21''	L	X	
Borgwallsee	Negast		54°15'46''	13°01'39''	L		
Breiter Luzin	Feldberger Hütte		53°21'07''	13°26'49''	L	X	
Cambser See	Zittow		53°40'45''	11°32'04''	L		
Dobbersdorfer See	Schlesen	DO	54°19'16''	10°19'40''	L	X	X
Drewitzer See	Sparow		53°31'07''	12°22'05''	L	X	
Galenbecker See	Galenbeck		53°37'37''	13°42'32''	L		
Goldberger See	Goldberg		53°35'02''	12°06'41''	L		
Großer Plöner See	Prinzeninsel	GPL	54°08'15''	10°24'46''	L	X	X
Großer Sternberger See	Sternberg		53°42'59''	11°50'15''	L		
Keezer See	Keez		53°44'15''	11°38'52''	L		
Kellersee	Bad Malente	KE	54°10'57''	10°34'18''	L	X	X
Kolpinsee	Schwenzin	KO	53°31'00''	12°36'36''	L	X	X
Kraker See	Krakov		53°38'28''	12°17'47''	L		
Kummerower See	Salem		53°47'22''	12°48'42''	L		
Langhagensee	Wooster Teerofen		53°35'01''	12°12'54''	L		
Lanker See	Schellhorn	LA	54°13'19''	10°17'54''	L	X	X
Malchiner See	Dahmen		53°39'45''	12°35'06''	L		
Müritzer See	Klink		53°28'43''	12°37'33''	L	X	
Neustädter Binnenwasser	Neustadt		54°06'41''	10°48'48''	L	X	
Pinnower See	Daren	PI	53°36'57''	11°32'20''	L	X	X
Plauer See	Alt Schwerin	PL	53°31'07''	12°19'41''	L	X	X
Putzer See	Pütte		54°17'32''	12°59'13''	L		
Putzarer See	Putzar		53°42'27''	13°40'14''	L		
Rittermannshagener See	Rittermannshagen		53°37'10''	12°45'40''	L		
Schweriner See	Bad Kleinen	SN	53°46'05''	11°28'31''	L	X	X
Selenter See	Seekrug	SEL	54°17'46''	10°30'50''	L	X	X
Teterower See	Teschow		53°47'27''	12°37'12''	L		
Tollenseesee	Alt Rehse		53°29'52''	13°11'04''	L		
Trammer See	Tramm	TR	54°10'28''	10°24'32''	L	X	X
Trentsee	Plön		54°09'51''	10°24'53''	L		
Vielebecker See	Gremsmühlen		53°52'18''	11°10'44''	L		
Weisdiner See	Weisdin		53°23'58''	13°06'39''	L		
Wittensee	Sande	WI	54°23'12''	9°43'30''	L	X	X
Woserinsee	Woserin		53°40'41''	12°02'40''	L		

Anhang 2: Tabelle mit den untersuchten marinen Standorte. In der Spalte Vorhanden ist angegeben, ob *Potamogeton pectinatus* am Standort gefunden werden konnte, in der Spalte Analysiert ist angegeben, ob *Potamogeton pectinaus* gesammelt und analysiert wurde.

Gewässer	Ort	Abk.	Breite	Länge	Standort vorhanden analysiert	
Binnenhafen	Seekamp		54°20'46''	11°04'11''	M	X
Bottsand	Marina Wendtorf		54°25'37''	10°17'43''	M	
Breitling	Fährdorf		53°58'40''	11°28'17''	M	
Dänische Wiek	Ludwigsburg	DW	54°06'50''	13°29'00''	M	X X
Deviner Bucht	Devin	DB	54°16'20''	13°09'26''	M	X X
Deviner See	Devin	DS	54°16'09''	13°10'03''	M	X X
Eckernförder Bucht	Kiekut		54°26'53''	9°52'08''	M	
Fehmarnsund	Großenbrode	GB	54°23'33''	11°07'00''	M	X X
Glewitzer Wiek	Puddemin		54°16'46''	13°20'04''	M	X
Große Wiek	Bojendorf	BO	54°01'29''	11°31'56''	M	X X
Großer Zicker	Thiessow	GZ	54°16'56''	13°42'48''	M	X X
Gustower Wiek	Gustow	GU	54°17'46''	13°12'07''	M	X X
Harving	Seedorf	HA	54°20'55''	13°39'20''	M	X X
Heiligenhafen	Ortmühle		54°22'17''	11°00'02''	M	X
Kieler Bucht	Surendorf		54°28'51''	10°04'00''	M	
Kieler Förde	Falkenstein		54°24'18''	10°11'31''	M	
Kirchsee	Niendorf		53°59'47''	11°26'47''	M	
Koos	Insel Koos	KO	54°10'02''	13°24'38''	M	X X
Neustädter Bucht	Neustadt		54°05'27''	10°48'11''	M	
Pötenitzer Wiek	Priwall		53°57'11''	10°54'17''	M	X
Riems	Riemserort	RI	54°11'00''	13°20'50''	M	X X
Salzhaff	Pepelow	SH	54°02'20''	11°34'44''	M	X X
Schleimünde	Maasholm	MAA	54°41'23''	10°00'34''	M	X X
Schoritzer Wiek	Zudar	SW	54°15'44''	13°21'28''	M	X X
Wamper Wiek	Gustow	WW	54°17'58''	13°11'03''	M	X X

Anhang 3: Allelkategorien nach Loci

Primer	Allellänge	Bereich		Primer	Allellänge	Bereich		
		von	bis			von	bis	
24	149	148,6	149,4	28	162	161,4	162,2	
	151	150,6	152		163	162,4	163,6	
	153	152,6	154,2		165	164,4	165,6	
	155	154,6	156,2		167	166,4	167,2	
	157	156,6	157,2		168	167,4	168,6	
	159	158,6	160,2		171	170,4	171,6	
	163	162,6	164		173	172,4	173,6	
	167	166,6	167,8		175	174,4	175,6	
	169	168,6	169,8		177	176,4	177,6	
	171	170,4	172		179	178,4	179,6	
	175	174,6	175,8		183	182,4	183,6	
	177	176,6	177,8		185	184,4	185,6	
	179	178,6	179,8		187	186,4	187,6	
	181	180,6	181,6		32	220	219,4	220,4
	183	182,6	183,6			224	223,6	224,4
	185	184,2	185,6			225	224,6	225,4
	26	222	221,4			222,6	226	225,6
230		229,6	230,8	228		227,6	228,4	
232		231,6	232,8	230		229,6	230,4	
234		233,6	234,8	232		231,6	232,4	
236		235,6	236,8	234		233,6	234,4	
238		237,6	238,8	236		235,6	236,4	
240		239,6	240,8	238		237,6	238,4	
242		241,6	242,8	239	239	240,2		
244		243,6	244,8	242	241,6	242,4		
246		245,6	246,8	243	242,6	243,4		
248		247,6	248,8	246	245,6	246,4		
250		249,6	250,8	254	253,6	254,4		
252		251,6	252,8					
254		253,6	254,8					
256	255,6	256,8						
258	257,6	258,8						
264	263,6	264,8						
266	265,4	266,8						
270	269,6	271						
278	277,4	278,8						

Anhang 4: Allelkategorien nach Loci

Primer	Allellänge Bereich			Primer	Allellänge Bereich		
	von		bis		von		bis
34	224	223,8	224,6	40	180	179,6	180,8
	226	225,8	226,6		182	181,6	182,8
	228	227,8	228,6		184	183,6	184,8
	230	229,8	230,6		185	184,6	185
	232	231,8	232,6		186	185,2	186,8
	234	233,8	234,6		188	187,2	188,4
	236	235,8	236,6		190	189,2	190,2
	238	237,8	238,6		191	190,4	191,6
	240	239,8	240,6		193	192,4	193,6
	242	241,8	242,6		195	194,4	195,6
	244	243,8	244,6		197	196,4	197,6
	246	245,8	246,6		199	198,4	199,8
	248	247,8	248,6		201	200,4	202
	254	253,8	254,8		203	202,4	204
	256	255,8	256,6		205	204,4	205,8
	37	143	142,6		144,2	207	206,8
144		143,6	145,2	209	208,8	210	
147		145,6	148,2	211	210,4	212	
149		147,6	150,6	213	212,4	214	
155		153,8	155,2	215	214,4	216	
157		155,8	157,2	42	184	183,4	185,4
159		157,8	159,2		188	187,6	189,4
161		159,8	161,2		190	189,6	191,4
163		162	163,4		192	191,6	192,2
165		164	165,4		193	192,4	193,4
167		166	167,4		194	193,6	194,8
169		168	169,4		196	195,6	196,8
171		170	171,4		198	197,6	198,8
173	172,2	173,2	200		199,6	200,8	
175	174,2	175,2	202		201,6	202,8	
179	178,2	180	204	203,6	204,8		
39	226	224,8	226,5	206	205,6	206,8	
	228	226,8	228,5	208	207,6	208,8	
	230	229	230,5	210	209,6	210,8	
	234	233,4	234,5				
	236	235	236,5				
	238	237	238,5				
	240	239	240,5				
	241	240,6	241,5				
	242	241,6	242,5				
	244	242,8	244,5				
	246	244,8	246,5				
	248	246,8	248,5				
	249	248,8	249,2				
	250	249,4	250,5				
	256	254,8	256,5				
	272	270,8	272,5				
274	272,8	274,5					
278	276,8	278,5					

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Winfried Lampert bedanken, der es mir ermöglicht hat, mich mehrere Jahre intensiv mit einem selbstbestimmten Thema zu beschäftigen. Dies umfasst nicht nur die exzellenten Arbeitsbedingungen am Max-Planck-Institut für Limnologie mit überragender technischer Ausstattung und den Möglichkeiten zum wissenschaftlichen Austausch im eigenen Hause sowie auf Tagungen und Workshops. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Geduld in den schwierigen Wochen, Monaten und Jahren der Mikrosatellitensuche sowie der unkomplizierten Unterstützung bei persönlichen Zeitproblemen.

Ohne die tatkräftige Unterstützung von Dr. Thorsten Reusch wäre diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen. Seine sehr gute Betreuung mit Beratungen in technischen und wissenschaftlichen Problemen waren für mich von unschätzbarem Wert.

Mein besondere Dank gilt Martina Zeller. Die gemeinsame Suche nach Mikrosatelliten bei unterschiedlichen Arten hat uns zu einem Team gemacht, dass sich in guten wie in schlechten Zeiten geholfen hat. Die moralische Unterstützung war einfach spitze. Viele Mitarbeiter am Max Planck Institut haben mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet. Silke Carstensen, Sybille Liedtke, Chaterin Schmuck, Nadine Ryk und Ilka Dankert sei besonders gedankt für die technische und moralische Unterstützung. Bei der immer wiederkehrenden Suche nach Mikrosatelliten waren sie alle eine tolle Hilfe.

All den Mitstreitern und Mitarbeitern am Max-Planck-Institut, die mir den Aufenthalt in den letzten Jahren so angenehm gemacht haben, möchte ich für das exzellente Klima danken. Besonders hervorheben möchte ich die Mitarbeiter vom Rechenzentrum und Werkstatt. Bei vielen Kleinigkeiten waren sie immer Willens und in der Lage mir zu helfen. Bei der Erstellung des Computerprogramms musste Dr. Krambeck einem Nichtmathematiker geduldig erklären, was ein Computer benötigt. Für die viele geopfert Zeit und die perfekte Umsetzung wirrer Biologengedanken noch mal vielen Dank und natürlich „Ein frohes, neues Jahr“.

Beim Sammeln konnte ich auf die Hilfe von Christina Öttmeier, Uli Breitenbach und Björn Meinhardt zurückgreifen. Der tolle Einsatz in und um die Gewässer haben die Probennahme erst ermöglicht.

Für die Erlaubnis, in den Seen und im Meer sammeln und oder Tauchen zu gehen, bedanke ich mich bei den Behörden für die zum Teil sehr unkomplizierten und schnelle Genehmigungen. Dem Amt für Umwelt in Kiel, dem Landesamt für Umwelt, Natur und Geologie in Güstrow und den Staatlichen Ämtern für Umwelt und Natur Schwerin, Lübz, Rostock, Stralsund, Ueckermünde und Neubrandenburg sei hierfür gedankt. Auch die Fischer der einzelnen Seen ließen den komischen Biologen in Ruhe arbeiten und Proben entnehmen.

Jim Coyer, Jeanine Olsen und Wytze Stam waren so großzügig mir zu Beginn der Arbeit bei etlichen Problemen zu helfen. Für die geopferte Zeit und die grundlegenden Diskussionen möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Dies gilt ebenso für Jörn Pilon und Luis Santamaría. Zu Beginn der Arbeit haben sie mich in Nieuwersluis aufgenommen und in die Grundlagen der Kamm-Laichkrauthälterung eingeführt. Die zur Verfügung gestellten Knollen ermöglichten einen guten Einstieg in diese Arbeit.

Für die Diskussionen über meine Arbeit und dem immer wieder Korrekturlesen bedanke ich mich bei Bettina Bölter. Auch wenn es zeitweise sehr erheiternd war, so ist dies doch ein nicht gerade einfacher Job gewesen. Dafür sei ihr nochmals besonders gedankt. In der letzten Phase der Arbeit sei allen Freunden für jede Unterstützung, für Speis und Trank und Bett gedankt, insbesondere Jörn & Anja, Carsten & Sabine und Winfried & Dorothee.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Bei meiner Frau Martina weiss ich gar nicht, womit ich anfangen und womit ich enden soll. Die moralische Unterstützung während der ganzen Zeit, das Ertragen ihres Mannes, das Entbehren einer normalen Familie, die fehlenden Nächte, Wochenenden und Urlaube und so vieles mehr. Der Anteil am Gelingen dieser Arbeit ist so groß und vielschichtig, dass man dies so einfach gar nicht schreiben kann. Korrektur lesen, Diskussionen über den Sinn und die Art und Weise und, und, und..... Danke!

Meinen drei Töchtern möchte ich auch ganz herzlich Danken. Sie waren dem Tempo beim Entstehen dieser Arbeit zwar nicht gerade förderlich. Dafür zeigen die drei einem immer wieder, was wirklich wichtig ist im Leben. Wenn Hannah, Finja und Svea fröhlich und glücklich spielen und toben, vergisst man glatt, das es noch andere Dinge gibt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrern – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist, und dass ich keine als die angegebenen Hilfsmittel oder Quellen verwendet habe. Die Arbeit hat weder ganz noch in Teilen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Bisher wurden auch noch keine Teile dieser Arbeit als Manuskript bei Zeitschriften eingereicht.

Kiel, den

Georg Nies