

# **Genetische Populationsvergleiche mit gengekoppelten und anonymen Mikrosatelliten: auf der Suche nach Markern unter Selektion**



## **Diplomarbeit**

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von Katharina Oetjen

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR LIMNOLOGIE, PLÖN

April 2006

**Genetische Populationsvergleiche mit  
gengekoppelten und anonymen Mikrosatelliten:  
auf der Suche nach Markern unter Selektion**

**Diplomarbeit**

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von Katharina Oetjen

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR LIMNOLOGIE, PLÖN

April 2006

**Referent: Prof. Dr. Thorsten Reusch**

Plant Evolutionary Ecology  
Institute of Evolution and Biodiversity  
Hüfferstr. 1  
48149 Münster

**Korreferent: Prof. Dr. Günther Hartl**

Institut für Haustierkunde  
Zoologisches Institut  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Am Botanischen Garten 1-9  
24118 Kiel

---

# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Die Suche nach den Spuren der Selektion	6
1.2 Genome Scans mit Hilfe von Mikrosatelliten	10
1.3 <i>Zostera marina</i> im nordfriesischen Wattenmeer	13
1.4 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit	16
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Die untersuchten Populationen	19
2.2 Probennahme und DNA- Extraktion	20
2.3 Entwicklung der Mikrosatelliten	22
2.3.1 Anonyme Mikrosatelliten	22
2.3.2 Gengekoppelte Mikrosatelliten	22
2.4 PCR und genetische Analyse	25
2.5 Datenanalyse	26
2.5.1 Genetische Differenzierung der Seegras-Populationen	26
2.5.2 Vergleich der Populationsdifferenzierung anonymer und gengekoppelter Mikrosatelliten	28
2.5.3 Identifizierung von einzelnen Mikrosatelliten-Loci unter Selektion	29
2.5.4 Das Problem der multiplen statistischen Tests	33
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Genetische Differenzierung der Seegras-Populationen	35
3.2 Vergleich anonymer und gengekoppelter Mikrosatelliten	39
3.3 Identifizierung von Mikrosatelliten-Loci unter Selektion	41
<b>4 Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1 Genetische Differenzierung der Seegras-Populationen	49
4.2 Vergleich anonymer und gengekoppelter Mikrosatelliten	52
4.3 Identifizierung von Mikrosatelliten-Loci unter Selektion	54
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>73</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>77</b>
<b>9 Stellungnahme</b>	<b>79</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Suche nach den Spuren der Selektion

Natürliche Selektion ist der Schlüsselprozess der Evolution. Diese Erkenntnis wurde erstmals von Charles Darwin (1859) formuliert. Er bezeichnete mit dem Begriff Selektion den Vorgang, durch den Individuen aufgrund unterschiedlicher genetischer Ausstattung und darauf beruhender phänotypischer Merkmale zu einem unterschiedlichen Fortpflanzungserfolg gelangen. Natürliche Selektion kann somit als unterschiedlicher Beitrag verschiedener genetischer Varianten zum Genpool nachfolgender Generationen definiert werden (Aquadro *et al.* 2001). Natürliche Selektion setzt demnach am Phänotyp von Individuen an, was die Frage aufwirft, auf welche Weise Genotyp und Phänotyp zusammenhängen. Dies ist die zentrale Frage der modernen Evolutionsbiologie. Obwohl Beschreibungen selektiver Vorgänge in der Literatur zahlreich sind, ist diese Frage immer noch weitgehend ungeklärt. Die Rolle der Selektion ist bei der Betrachtung molekulargenetischer Polymorphismen keineswegs so eindeutig zu bestimmen wie auf der Ebene des Phänotyps. Der Selektion wird traditionell von den Selektionisten, die sich im Ursprung auf die selektive Theorie der Evolution von Darwin (1859) berufen, eine große Bedeutung für die evolutive Veränderung von Populationen, Arten und Kladen zugeschrieben. Dagegen steht die von Kimura (1983) formulierte Theorie der Neutralisten, die besagt, dass der Großteil der molekulargenetischen Polymorphismen neutral (oder beinahe neutral) ist und somit die genetische Architektur den Erfolg von Individuen nicht immer maßgeblich beeinflussen muss. Inzwischen wurde die Debatte zwischen Selektionisten und Neutralisten jedoch durch die Frage abgelöst, unter welchen Umständen Selektion als die treibende Kraft genetischer Umgestaltung wirkt (Ford 2002). Auch die Mechanismen, welche die Adaptation von Arten als Reaktion auf Umwelteinflüsse bewerkstelligen, sind größtenteils noch nicht entdeckt (Orr 2005). Besonders über die genetische Basis selektiver Prozesse und wie Genotyp und Phänotyp

ursächlich verbunden sind, ist bislang wenig bekannt. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, wie z.B. der genetischen Grundlagen einiger Krankheiten, Pathogenresistenzen und einiger agronomisch bedeutender Eigenschaften von Nutzpflanzen (Zusammenfassung in Ford 2002), fehlt das Wissen über die Verknüpfung von ökologischen und genetischen Veränderungen.

Das kürzlich entstandene Forschungsgebiet ‚functional genomics‘ versucht diese fehlende Verknüpfung zu erstellen, wenn auch bislang der Schwerpunkt auf Spezies von wirtschaftlichem Interesse liegt (Überblick z.B. in White 2001; Jackson *et al.* 2002; Feder und Mitchell-Olds 2003; aber siehe Hofmann *et al.* 2005). Der Ansatz, zu Zwecken der Grundlagenforschung und des Naturschutzes Einblicke in die komplexe genetische Architektur der ökologischen Eigenschaften einiger Arten zu ermöglichen, wird in dem Gebiet ‚ecological genomics‘ verfolgt (siehe z.B. Moran 2002; van Tienderen *et al.* 2002; Feder und Mitchell-Olds 2003).

Heute bietet die Verfügbarkeit zahlreicher genetischer Methoden Evolutionsbiologen ein umfassendes Repertoire für die Untersuchung molekularer Polymorphismen und damit auch selektiver Prozesse auf der Ebene des Genotyps. Viele Autoren vertreten die Ansicht, dass Polymorphismen an Allozymen und vor allem an molekularen Markern wie beispielsweise Mikrosatelliten, SSCP (single stranded conformational polymorphism) und AFLP (amplified fragment length polymorphism) als selektiv neutral betrachtet werden können (siehe z.B. Eanes 1987; McKay und Latta 2002). Diese Annahme ist die Voraussetzung für die Verwendung genetischer Marker, um Genfluss, phylogenetische Beziehungen und genetische Substrukturierung von Populationen abzuschätzen. Allerdings wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass Abweichungen von dieser Neutralität bei Allozymen (z.B. Storz und Nachman 2003; Storz und Dubach 2004) und molekulargenetischen Markern (z.B. Wilding *et al.* 2001; Rogers und Bernatchez 2005) auftreten. Während in populationsgenetischen Studien die mangelnde Selektionsneutralität mancher Markerloci ein Problem darstellt, kann natürlich auch aus der Not eine Tugend gemacht werden. Sofern ausreichend große Stichproben von Markerloci zur Verfügung stehen, können

molekulare Marker für die Suche nach den Spuren von Selektion und Adaptation in natürlichen Populationen verwendet werden. Der Grundgedanke ist dabei, dass sich Loci, die selektiven Einflüssen unterworfen sind, anders verhalten als neutrale Loci. Während demografische Prozesse, Migration und genetische Drift sich in gleicher Weise auf das gesamte Genom auswirken, werden selektive Einflüsse nur spezifisch an den betroffenen Loci wirksam (Cavalli-Sforza 1966).

Ein Gen, das unter disruptiver Selektion steht, weil sich die beiden entsprechenden Subpopulationen in einem Umweltgradienten befinden, wird im Vergleich verschiedener Populationen eine größere Divergenz zeigen als selektiv neutrale Loci. Ein Gen, welches unter dem Einfluss stabilisierender Selektion steht, sollte dagegen eine geringere Divergenz zeigen als unter Neutralität erwartet. Um Selektionseinflüsse nachzuweisen, brauchen die genetischen Marker nicht direkt unter Selektion zu stehen. Eine ausreichend enge physische Kopplung, die zu einem genetischen Kopplungsungleichgewicht führt, genügt (sog. Hitchhiking-Effekt, Maynard Smith und Haigh 1974; Barton 2000). Dieser Effekt führt dazu, dass genetische Marker, die in räumlicher Nähe eines Gens auf dem Genom lokalisiert sind, dasselbe Verhalten zeigen wie das untersuchte Gen. Die Stärke des Hitchhiking-Effekts ist unter anderem abhängig von der Rekombinationsrate zwischen unter Selektion stehendem Locus und neutralem Marker, dem Alter des Polymorphismus am Genmarker, sowie von der Stärke der Selektion (Maynard Smith und Haigh 1974). Auf diese Weise ist es möglich, das Signal der Selektion im Genotyp aufzuspüren, um damit Aussagen über den Wirkmechanismus und die Bedeutung bestimmter Gene für die Fitness des Phänotyps möglich zu machen.

Ein erster Neutralitätstest für einzelne Marker-Loci wurde von Lewontin und Krakauer (1973) entwickelt. Dieser Test beruht auf der Varianz von Parametern, die eine Populationsdifferenzierung abschätzen, wie der von Wright (1951) eingeführte Fixationskoeffizient  $F_{st}$  und seine Quantifizierung (siehe z.B. Weir und Cockerham 1984; Cockerham und Weir 1993). Wenn die  $F_{st}$ -Werte einzelner Loci aus dem Vertrauensbereich der erwarteten Varianz herausfallen, kann eine neutrale Nullhypothese abgelehnt werden. Der



Schwachpunkt dieses Tests besteht in der Annahme, dass sich  $F_{st}$  streng nach der neutralen Theorie verhält. Durch Migration und Ereignisse in der Populationsgeschichte können andere Varianzen unter den  $F_{st}$ -Werten der Loci verursacht werden, als durch neutrale Prozesse vorhergesagt. So können beispielsweise Korrelationen der Allelfrequenzen zwischen Subpopulationen entstehen. Robertson (1975) bemerkt folgerichtig, dass der Test nur bei einer großen Zahl von Populationen ohne phylogenetische Struktur verwendet werden darf. Verbesserte Ansätze, die auf der Grundidee des Lewontin-Krakauer-Tests aufbauen, wurden von Bowcock *et al.* (1991) und später von Beaumont und Nichols (1996) entwickelt. Letzterer wurde in meiner Arbeit verwendet und beinhaltet ein strukturiertes Koaleszenz-Modell. Dieses generiert Nullverteilungen von  $F_{st}$  in Abhängigkeit von der Heterozygotie der Loci auf der Basis des nach Heterozygotie gewichteten Mittels aller  $F_{st}$ -Werte der Loci. Zugrunde gelegt werden unterschiedliche Mutationsraten, um eine breitere Verteilung zu simulieren, die den natürlichen Gegebenheiten entspricht. Vorausgesetzt wird ein Gleichgewicht zwischen Mutationen und genetischer Drift und Migration zwischen den einzelnen Populationen. Außerdem wird ein symmetrisches Inselmodell als Grundlage der Kolonisierung verwendet. Aufgrund dieser starren Annahmen, und weil das Modell auf nur wenigen Parametern beruht, sind nur relativ grobe Vorhersagen möglich. Dennoch zeigten sich die erzielten Simulationen als erstaunlich robust gegenüber einer Reihe von Modifikationen wie veränderter Populationsstruktur und Abweichungen vom Gleichgewicht zwischen Migration und Drift zwischen den Einzelpopulationen (Beaumont und Nichols 1996).

Der Ansatz, die Suche nach Ausreißern anhand von Paaren von Populationen durchzuführen, wird in der Literatur zur Verbesserung der Methode empfohlen (Robertson 1975), um das Problem der ‚unendlich vielen Parameter‘ bei der Simulation von Populationsentwicklungen zu kontrollieren.

Dem entsprechend entwickelten Vitalis *et al.* (2001) einen Ansatz, der auf Schätzungen der Entfernung von Paaren von Subpopulationen beruht. Das von ihnen entwickelte Modell wird ebenfalls in dieser Arbeit verwendet. Dieses Modell stützt sich zur Vereinfachung auf ein Szenario, in dem ausschließlich

genetische Drift für die Differenzierung von Subpopulationen verantwortlich ist. Die zugrunde liegende Annahme ist, dass sich eine Population zu einem Zeitpunkt in zwei Populationen aufgespaltet hat, die anschließend nicht mehr in Kontakt standen, zwischen denen also keine Migration stattfindet. Diese Voraussetzung ist zwar in den seltensten Fällen erfüllt, es zeigte sich jedoch, dass das Modell auch robust gegenüber leichter Migration ist (Vitalis *et al.* 2001). In diesem Modell werden die Parameter für die Differenzierung der Populationen,  $F_1$  und  $F_2$ , als Wahrscheinlichkeiten definiert, dass Allele, die in den betrachteten Populationen gefunden werden, identisch sind. Diese Parameter sind abhängig von dem Verhältnis von Divergenzzeit und effektiver Populationsgröße. Das Modell betrachtet die gesamte Verteilung der Schätzungen von  $F_1$  und  $F_2$  in Abhängigkeit von der Zahl der Allele in der gesamten Stichprobe. Diese Verteilung kann dann genutzt werden, um Ausreißer zu identifizieren, die in der Vergangenheit unter Selektion standen. Die Kombination zweier verschiedener Methoden zur Ausreißer-Detektion dient dazu, die Daten bestmöglich auszuschöpfen und alle aberranten Loci zu erfassen. Die auch von Vasemagi *et al.* (2005a) verwendete Kombination der beiden von mir gewählten Methoden ist sinnvoll, weil sie nur eine geringe Überschneidung bei den identifizierten Ausreißern zeigt (Vitalis *et al.* 2001), was die Identifizierung vieler Kandidaten ermöglicht und für eine explorative Studie angemessen ist. Auf der anderen Seite ist auch ein sehr konservativer Ansatz möglich, in dem nur solche Loci als Ausreißer gelten, die in beiden Methoden eine Abweichung vom neutralen Modell zeigen.

## **1.2 Genome Scans mit Hilfe von Mikrosatelliten**

Die Wahrscheinlichkeit, die Spuren von selektiven Einflüssen mit Neutralitätstests zu entdecken, erhöht sich mit der Verwendung möglichst vieler Loci. Heute sind mit relativ geringem technischem und finanziellem Aufwand Multi-Locus-Screens oder ‚Genome Scans‘ an einer großen Zahl von Individuen durchführbar. Diese Techniken werden allgemein unter dem Begriff ‚Genome typing‘ zusammengefasst und ermöglichen eine sehr viel effizientere

und Erfolg versprechendere Suche nach Spuren von selektiven Einflüssen (Luikart *et al.* 2003). Der entscheidende Vorteil von ‚Genome Scans‘ ist, dass die Selektion im Genotyp von Individuen aufgespürt werden kann, und die Verknüpfung mit Informationen über den Phänotyp und dessen Fitness unter bestimmten Bedingungen möglich wird. In zunehmender Zahl werden solche ‚Genome Scans‘ für die Suche nach Selektion in domestizierten (Vigouroux *et al.* 2002; Casa *et al.* 2005) oder natürlichen (Kohn *et al.* 2000) Populationen verwendet. Neben Studien anhand menschlicher Populationen (Payseur *et al.* 2002; Storz *et al.* 2004) und Modellorganismen (Kauer *et al.* 2003) finden zunehmend auch Untersuchungen an Nicht-Modellorganismen statt, deren Zielsetzung weniger im ökonomische Nutzen als im Gewinn neuer Erkenntnisse über die Grundprinzipien evolutiver Prozesse besteht (z.B. Lexer *et al.* 2005).

In letzter Zeit wird zunehmend die Forderung geäußert, die Ergebnisse von ‚Genome Scans‘ in wiederholten parallelen Ansätzen zu überprüfen (Campbell und Bernatchez 2004; Vasemagi und Primmer 2005). Ein mit einem Neutralitätstest identifizierter Ausreißer ist kein Beleg dafür, dass tatsächlich Selektion auf diesen Locus eingewirkt hat, denn einige Loci liegen per definitionem außerhalb des gewählten Vertrauensintervalls, welches beispielsweise 95 Prozent der Variation abdeckt. Durch parallele Ansätze kann der Kandidaten-Status mehrmals identifizierter Loci gestärkt werden.

Mikrosatelliten (auch SSRs = simple sequence repeats) sind hochgradig polymorphe DNA-Regionen, die in den Genomen aller eukaryotischen Organismen verbreitet sind (Ellegren 2000; Schlotterer 2000). Sie bestehen aus kurzen Basenmotiven, z.B. Di-, Tri- oder Tetranukleotiden, die in vielen Wiederholungen aufeinander folgen. Mutationen an Mikrosatelliten bestehen in der Addition oder dem Wegfallen eines oder mehrerer dieser Wiederholungseinheiten. Mikrosatelliten-Loci sind oft so polymorph (mehr als 10 Allele/Locus), dass bei vielen Spezies schon aufgrund weniger Mikrosatelliten- Loci Individuen voneinander unterschieden werden können. Mit Hilfe von Mikrosatelliten sind Organismen relativ einfach zu genotypisieren, und man geht davon aus, dass der Großteil von ihnen selektionsneutral ist (Schlötterer 2004).

Grundlage der Entwicklung genomischer Mikrosatelliten waren in der Vergangenheit meist angereicherte Genbibliotheken, die auf Zufallsrestriktion der gesamten Erbinformation beruhen. Ohne Kopplungskarte blieb die genaue Lage dieser Markerloci unbekannt. Die auf der Grundlage dieser Bibliotheken entwickelten Mikrosatelliten liegen zufällig auf dem Genom verstreut, sie werden als genomische oder anonyme Mikrosatelliten bezeichnet. Darüber hinaus existieren heute Expressed-Sequence-Tag (EST)-Datenbanken vieler Arten, die auf in komplementäre (complementary = cDNA) DNA umgeschriebener mRNA beruhen. Solche Banken repräsentieren den Teil des Genoms, der unter bestimmten Umständen exprimiert wird. Aus diesen können mit relativ geringem technischem Aufwand Mikrosatelliten entwickelt werden, die sich in der Regel in den 5' oder 3' untranslatierten Regionen befinden. Li (2004) stellte fest, dass bei Vertebraten etwa zehn Prozent und bei Getreidesorten zwischen 1,5 und 7,5 Prozent aller EST-Sequenzen aus SSRs bestehen. Somit ist die Dichte von Mikrosatelliten in unmittelbarer Nähe von Genen deutlich höher als im Durchschnitt über das ganze Genom. Dies stützt die neuere Hypothese, dass nahe bei Genen gelegene Mikrosatelliten möglicherweise an der Expressionsregulation mitbeteiligt sind (Li *et al.* 2004). Da EST-Mikrosatelliten in enger räumlicher Nähe bestimmter Gene auf dem Genom liegen, werden sie deshalb auch allgemein als gekoppelte Marker bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine durch Selektion hervorgerufene Veränderung eines Gens an dem gekoppelten Marker zu entdecken ist, steigt somit aufgrund eines stärkeren Hitchhiking Effects (siehe 1.1, Maynard Smith und Haigh 1974). Laut neueren Studien sind EST-Sequenzen eine viel versprechende Quelle neu zu entwickelnder Mikrosatelliten (Vasemagi *et al.* 2005a).

Innerhalb des letzten Jahrzehnts haben sich Mikrosatelliten zu einem der meistverwendeten genetischen Marker entwickelt. Ursprünglich waren groß angelegte ‚Genome Scans‘ mit Mikrosatelliten auf Kopplungskarten-Studien beschränkt. In letzter Zeit stehen jedoch in zunehmender Zahl komplett sequenzierte Genome von Modell- und manchen Nicht-Modell-Organismen zur Verfügung. Im Zuge dessen entwickelt sich ‚Genome Typing‘ mit Mikrosatelliten zu einem bedeutenden Werkzeug zur Untersuchung von

evolutionären Prozessen wie Selektion und Hybridisierung in natürlichen Populationen (Payseur *et al.* 2002; Wootton *et al.* 2002; Schlötterer 2002a; Harr *et al.* 2003). Studien, die außer anonymen auch EST-Mikrosatelliten für ‚Genome Scans‘ verwenden, sind allerdings noch selten (aber siehe Vigouroux *et al.* 2002; Vasemagi *et al.* 2005a). Bei marinen Pflanzen wurde nach meiner Kenntnis noch kein ‚Genome Scan‘ mit EST-Mikrosatelliten durchgeführt.

### **1.3 *Zostera marina* im nordfriesischen Wattenmeer**

Das große Seegras *Zostera marina* gehört zu der polyphyletischen Gruppe der Seegräser, welche zu den Alismatidae gehören, die wiederum zu den Monokotyledonen zählen. Seegräser sind weltweit verbreitete marine Blütenpflanzen (Angiospermen), die auf Weichböden wiesenartige Bestände von oft sehr großen Ausmaßen bilden (den Hartog 1970). Sie sind in der Lage, sich sowohl sexuell als auch asexuell durch klonale Reproduktion zu vermehren. Seegraswiesen stellen bedeutende Ökosysteme mit einer hohen Produktivität dar, welche zahlreichen Fischen und Invertebratenspezies als Habitat und Nahrungsquelle dienen (Hemminga und Duarte 2000). Während der letzten Jahrzehnte wurde jedoch ein Rückgang der weltweiten Seegrasbestände um mindestens 15 Prozent beobachtet, welcher sowohl auf anthropogene als auch auf natürliche Einflüsse zurückzuführen ist (Olsen *et al.* 2004).

*Zostera marina* ist das dominierende Seegras auf der Nordhemisphäre (Reusch *et al.* 2000) und gehört zu den zwei im Wattenmeer der Nordsee vorkommenden Seegrasarten. Im Nordfriesischen Wattenmeer befinden sich drei Viertel des Seegrasbestandes der gesamten Wattenmeerküste. In den letzten Jahrzehnten wurde im gesamten Wattenmeer ein Rückgang der Bestände von *Z. marina* notiert, in Nordfriesland sind die Bestände jedoch in den letzten Jahren weitgehend stabil (Reise *et al.* 1989; Reise 2000). Die Ursache dieses Rückgangs ist nicht eindeutig geklärt und wird dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren wie zunehmender Eutrophierung,

Schadstoffbelastung und veränderter Hydrodynamik zugeschrieben (Reise 2000; Schanz *et al.* 2002).

Im Wattenmeer tritt *Z. marina* an verschiedenen Standorten mit sehr unterschiedlichen Lebensbedingungen auf. Der größte Teil der *Z. marina*-Bestände befindet sich auf offenen Wattflächen. Es kommen jedoch auch in einigen Prielen, die zwischen den Salzwiesen der Halligen und Inseln verlaufen, *Z. marina*- Populationen vor (Reusch 2002 und eigene Beobachtung, vgl. Abb. 1). Diese Priele sind mit Salzwasser gefüllt und stehen zumindest zeitweilig mit dem offenen Meer in Verbindung. Die Populationen auf den Wattflächen sind den wechselnden Wasserständen der Gezeiten ausgesetzt, sie fallen bei Niedrigwasser bis auf einen dünnen Wasserfilm trocken und sind nur zeitweilig vom Wasser bedeckt. Im Gegensatz dazu sind die Pflanzen in den Prielen ständig wasserbedeckt, was möglicherweise für die Lebensvorgänge der Pflanzen vorteilhaft ist.



**Abb.1:** Zwei verschiedene Habitate für *Z. marina* im Wattenmeer: links Wattstandort (Hallig Hooge), rechts Prielstandort (Hallig Langeneß)

Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Habitate möglicherweise in Bezug auf die Verfügbarkeit von Licht und Nährstoffen. Während auf den Wattflächen kein Lichtmangel vorstellbar ist, könnte vor allem für die unteren Blätter der Pflanzen in den Prielen Lichtmangel limitierend sein. Eine relativ starke Wassertrübung und der dichte *Zostera*-Bestand lassen nur wenig Licht bis auf den Grund der etwa einen Meter tiefen Priele dringen. In den Prielen

sind Nährstoffe in Form von Nitraten überreichlich vorhanden, da diese zwischen mit Kühen beweideten Salzwiesen verlaufen. Außerdem sind perennierende Pflanzen in der Lage, mehr Nährstoffe mit ihren Wurzeln aufzunehmen als annuelle (Pedersen und Borum 1993; Hemminga *et al.* 1994). Wahrscheinlich hat *Z. marina* jedoch auch im Watt ausreichend Nährstoffe zur Verfügung, da der Nährstoffeintrag in küstennahen Gewässern durch Erosion an Land meistens so hoch ist, dass das Wachstum der Seegräser generell selten nährstofflimitiert ist (Hemminga und Duarte 2000). Die Standorteigenschaften der zwei unterschiedlichen Habitats haben Auswirkungen auf die Reproduktionsweise und den Phänotyp der Pflanzen. Die Einzelpflanzen in den Prielen sind deutlich größer und kräftiger, sie erreichen eine Höhe von bis zu 100 cm, während die Pflanzen im Watt nur bis etwa 25 cm hoch werden (vgl. Abb. 2). Dies liegt unter anderem daran, dass sich die Seegraspflanzen in den Prielen nicht jedes Jahr neu aussähen. Die Populationen im Watt sind überwiegend annuell, die im Priel perennierend. Daraus folgt, dass die Blütezeit bei den Pflanzen in den Prielen früher im Jahr beginnt als im Watt. Zum Zeitpunkt der Probennahme waren 87,5 Prozent der Pflanzen der Prielpopulationen in der Blüte oder bereits verblüht, dies traf hingegen nur auf 25 Prozent der Pflanzen aus den Wattpopulationen zu. Außerdem breiten sich die Pflanzen in den Prielen nicht nur durch sexuelle



**Abb. 2:** Unterschiede im Phänotyp der zwei *Z. marina*-Formen. Links: Pflanze von einem Prielstandort, Mitte: Pflanze von einem Wattstandort, Rechts: Vergleich der Blätter beider Formen (links Priel, rechts Watt)

Vermehrung, sondern auch durch klonales Wachstum, das heißt durch Sprossbildung über Rhizome aus. Auf den Wattflächen tritt dies nicht auf, dort überwintern die Pflanzen ausschließlich als Samen. So findet man in den Prielen etwa einen Meter durchmessende Klone (Reusch, mündl. Mitteilung), während im Watt nur einzeln stehende Individuen mit jeweils unterschiedlichem genetischem Material vorkommen. Der beschriebene Habitatkontrast und die daraus entstehende morphologische Differenzierung von *Z. marina* tritt an mehreren Orten im Nordfriesischen Wattenmeer auf. Für meine Studie wurden drei Orte ausgewählt, an denen Populationen vorkommen, die geografisch nah beieinander liegen, aber in kontrastierenden Habitaten auftreten.

In der Vergangenheit wurde aus Allozym- Untersuchungen geschlossen, dass *Z. marina*- Populationen genetisch wenig differenziert seien (Gagnon *et al.* 1980; Laushman 1993). Zahlreiche Studien, die sich auf Analysen mit anonymen Mikrosatelliten stützen, entdeckten jedoch einen hohen Grad an Polymorphismen beim großen Seegras (Reusch *et al.* 1999a), wie auch bei zahlreichen anderen Seegrasarten (Procaccini und Mazzella 1998; Alberto *et al.* 2003; Coyer *et al.* 2004). So sind wir heute in der Lage, mit Hilfe von zehn bis 15 Mikrosatelliten Individuen zweifelsfrei zu unterscheiden und die Differenzierung von Populationen genau aufzulösen (Reusch *et al.* 1999b; Reusch *et al.* 2000). Anonyme Mikrosatelliten als variable und hoch auflösende Marker stellen also ein geeignetes Instrument zur genetischen Analyse von *Z. marina*-Populationen dar (Reusch 2001).

#### **1.4 Ziel und Fragestellung dieser Arbeit**

Die zwei im Wattenmeer auftretenden Formen von *Z. marina* bilden aufgrund ihrer Verschiedenartigkeit den Ansatzpunkt meiner Arbeit. Der Kontrast zwischen den Habitaten beider Formen scheint offensichtlich die phänotypischen Unterschiede zwischen diesen zu prägen. Über solche morphologischen Eigenschaften hinaus sind anscheinend auch ‚Life History Traits‘ von der Anpassung an das Habitat betroffen, wie die verschiedenen



Reproduktionsmodi beider Formen belegen. Eine solche umfassende Anpassung an das Habitat könnte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf genetische Veränderungen zurückzuführen sein. Die Untersuchung der zwei Formen wird demnach statt mit einer ökologischen Herangehensweise mit Hilfe eines ‚Genome Scans‘ durchgeführt. In dem Fall, dass sich bestimmte Gene unter dem Einfluss gerichteter Selektion in den unterschiedlichen Habitaten verändert haben, ist es möglich, die Spuren der Selektion mit Neutralitätstests nachzuweisen.

Der große Vorteil des von mir gewählten Ansatzes besteht darin, dass der ‚Genome Scan‘ anhand mehrerer paralleler Populationspaare durchgeführt werden kann, die denselben Habitatkontrast aufweisen. Die Ergebnisse des ‚Genome Scans‘ können durch unabhängige Wiederholungen bestätigt werden.

Die Wahl zweier verschiedener Markertypen ermöglichte es mir außerdem, Aussagen über das unterschiedliche Verhalten von gekoppelten und anonymen Mikrosatelliten bei der untersuchten Spezies zu machen. Meine Vermutung war, dass EST-Mikrosatelliten eventuell eine höhere Differenzierung zwischen Populationspaaren erfahren, da sie direkt an bestimmte Gene gekoppelt sind, die unter Selektion stehen könnten. Dagegen sollten sich anonyme Mikrosatelliten neutral verhalten und somit eventuell eine geringere Differenzierung als gekoppelte Markerloci aufweisen. Die Ergebnisse meiner Untersuchung tragen zur Aufklärung der Fragestellung bei, ob sich anonyme genomische Marker wirklich neutral verhalten, so wie es bei herkömmlichen populationsgenetischen Untersuchungen lange Zeit vorausgesetzt wurde. Außerdem können neue Erkenntnisse zur Verwendung von EST-Mikrosatelliten in Populationsgenetik und Systematik gewonnen werden. Schließlich können die zugehörigen Gene von EST-Mikrosatelliten direkt als potentielle Kandidaten für Gene unter Selektion ermittelt werden, wenn einige der gekoppelten Marker ein von der Neutralität abweichendes Verhalten zeigen sollten.

Zusammengefasst lauteten meine Fragestellungen:

Können aufgrund einer EST-Bibliothek polymorphe Mikrosatelliten-Marker in einer marinen Blütenpflanze entwickelt werden?

Kann mittels dieser Mikrosatelliten-Marker nachgewiesen werden, dass Selektion zur Entstehung der zwei *Z. marina*- Formen beigetragen hat?

H1: Zeigen anonyme Mikrosatelliten-Marker im Mittel eine geringere genetische Differenzierung zwischen Habitatkontrasten als gekoppelte Marker?

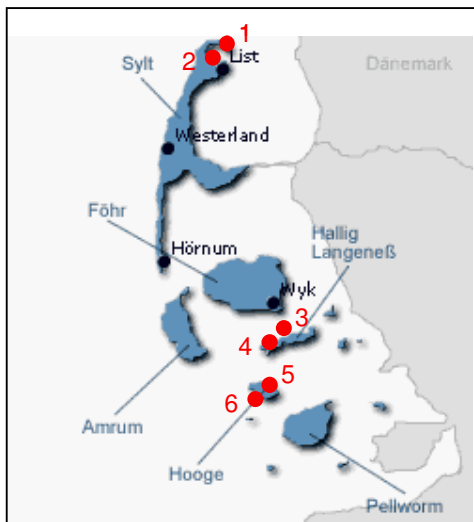
H2: Gibt es anonyme oder gekoppelte Mikrosatelliten-Marker, die eine höhere genetische Differenzierung zwischen Habitatkontrasten zeigen als unter neutralen Nullmodellen?

H3: Sind die beobachtbaren Abweichungen vom neutralen Nullmodell über drei unabhängige Habitatkontraste reproduzierbar?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Die untersuchten Populationen

Die Beprobung der Seegraspopulationen fand zwischen dem 18. Juli und dem 02. August 2005 im nordfriesischen Wattenmeer statt. Es wurden an drei Orten Proben von je zwei zu vergleichenden Populationen genommen. Der wesentliche Unterschied zwischen den Populationen eines solchen Vergleichspaares war, dass sie an Standorten mit unterschiedlichen Lebensbedingungen vorkamen. Es handelte sich jeweils um eine Population von offenen Wattflächen und eine aus den Prielen, die wie Gräben zwischen den Salzwiesen der Halligen oder Inseln verlaufen. Die Auswirkungen des Habitatkontrasts ‚Wattstandort-Prielstandort‘ wurden somit in drei Wiederholungen an unterschiedlichen Orten untersucht.



**Abb.3:** Geografische Lage der sechs beprobten Populationen im Nordfriesischen Wattenmeer.  
 1: Königshafen Priel, 2: Königshafen Watt, 3: Langeneß Watt, 4: Langeneß Priel, 5: Hooge Priel, 6: Hooge Watt

Die Populationspaare stammten von folgenden Orten (vgl. Abb.3): Das erste Paar aus der Bucht „Königshafen“ auf der Insel Sylt, hier wurde eine Wattpopulation aus der „Tonnenlegerbucht“ ( $8^{\circ}25'55''\text{O}/55^{\circ}1'37''\text{N}$ ) nahe des Alfred-Wegener-Instituts List und eine Prielpopulation aus einem Priel auf dem „Ellenbogen“ ( $8^{\circ}24'53''\text{O}/55^{\circ}2'51''\text{N}$ ), dem nördlichsten Teil der Insel Sylt, beprobt. Das zweite Vergleichspaar stammte von der Hallig Langeneß. Dort wurden nördlich der Hallig, etwa auf der Höhe zwischen Ketelswarf und

Kirchwarf, Proben aus einer Wattpopulation entnommen (8°35'48''O /54°38'59''N). Die Vergleichspopulation stammte aus einem Priel im Halliginneren (8°32'29''O /54°37'58''N), der in den großen Hafenpriel entwässert. Auf der Hallig Hooge, dem Ort des dritten Vergleichspaares, stammten die Proben aus dem Watt südwestlich der Hallig (8°31'11''O/ 54°34'06''N), etwa auf der Höhe der Ipkenswarf, sowie aus einem Priel, der entlang der Straße zwischen Ockelützwarf und Hanswarf verläuft (8°32'26''O/ 54°34'06''N).

Auf den Wattflächen betrug der Anteil von *Zostera marina* an den Seegraswiesen meist nur 10-35 Prozent, den übrigen Anteil bildete das Zwerg- Seegras *Z. noltii*. Eine Ausnahme stellte die Seegraswiese vor Langeneß dar, in deren lockerem Bewuchs *Z. marina* deutlich dominierte. In den Prielen hingegen wurden die Seegrasbestände ausschließlich von *Z. marina* gebildet.

## 2.2 Probennahme und DNA- Extraktion

In den Wattpopulationen wurde auf einer Fläche von 20 x 40 Metern ein Zählrahmen geworfen und die Proben daraus entnommen. Diese Fläche wurde als eine Population betrachtet. In den Prielen entnahm ich entlang eines Transekts von mindestens 40 Metern etwa jeden Meter eine Probe, weil die Klone in den Prielen im Allgemeinen nicht größer als ein Meter im Durchmesser sind (Reusch, pers. Mitteilung). Insgesamt beprobte ich im Jahr 2005 in jeder Population zwischen 39 und 50 Pflanzen. Das Pflanzenmaterial stammte von frischen Blättern und wurde in Röhrchen mit Silica- Gel getrocknet.

Zusätzlich untersuchte ich älteres Material von den genannten Orten, um eine breitere Datenbasis zu erhalten und um die Entwicklung der genetischen Marker über einen Zeitraum von mehreren Jahren vergleichen zu können. Es handelte sich um getrocknetes Pflanzenmaterial von der Hallig Hooge, sowohl vom Priel- als auch vom Wattstandort, aus dem Jahr 1999. Bereits extrahierte DNA aus den Populationen von der Hallig Langeneß (Priel- und Wattstandort)

aus dem Jahr 2001 und von der Prielpopulation aus Königshafen/Sylt aus dem Jahr 1997 wurde ebenfalls verwendet.

Insgesamt wurden 485 Proben aus elf Populationen analysiert. Der Begriff ‚Populationen‘ wird im Folgenden für diese elf Beprobungen verwendet, wobei zu beachten ist, dass sich die ‚Populationen‘ teilweise durch den Ort, an dem sie vorkommen, unterscheiden, teilweise jedoch nur durch das Jahr, in dem die Beprobung stattfand (vgl. Tabelle 1). Ich untersuchte insgesamt fünf Paare von geografisch nah beieinander liegenden Populationen, die sich durch ihr Habitat unterscheiden (Hooge 1999 Watt/Priel, Hooge 2005 Watt/Priel, Langeneß 2001 Watt/Priel, Langeneß 2005 Watt/Priel, Königshafen 2005 Watt/Priel). Die Fragestellung dieser Arbeit wurde anhand dieser fünf Paare bearbeitet, wobei jedoch fraglich war, ob die Wiederholungen aus den verschiedenen Jahren an einem Ort zusätzliche Information beinhalten. In jedem Fall stehen aber drei parallele Vergleiche aus dem Jahr 2005 zur Verfügung.

Die gesamte genomische DNA wurde aus dem getrockneten Pflanzenmaterial mit Hilfe des Invisorb DNA Plant HTS 96-Kit/C (Invitex) gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll extrahiert.

**Tabelle 1:** *Zostera marina* (Großes Seegras)-Populationen mit Angabe des Jahres, in dem die Probennahme stattfand

Population Nr.	Abkürzung	Jahr	Ort	Standort	Anzahl Proben (n)
1	H05W	2005	Hallig Hooge	Watt	49
2	H05P	2005	Hallig Hooge	Priel	49
3	H99W	1999	Hallig Hooge	Watt	47
4	H99P	1999	Hallig Hooge	Priel	47
5	L01P	2001	Hallig Langeneß	Priel	38
6	L01W	2001	Hallig Langeneß	Watt	40
7	L05P	2005	Hallig Langeneß	Priel	49
8	L05W	2005	Hallig Langeneß	Watt	50
9	KaP	1997	Königshafen/ Sylt	Priel	27
10	K05P	2005	Königshafen/ Sylt	Priel	39
11	K05W	2005	Königshafen/ Sylt	Watt	50
gesamt					485

## 2.3 Entwicklung der Mikrosatelliten

In meiner Untersuchung wurden zwei Typen von Mikrosatelliten verglichen: Anonyme oder genomische Mikrosatelliten sollten als zufällig im Genom verteilte Marker die durchschnittliche genetische Differenzierung von Populationen repräsentieren. Gengekoppelte Mikrosatelliten stellen dagegen die Differenzierung einzelner, vorher bekannter Gene, an welche sie gekoppelt sind, dar.

### 2.3.1 Anonyme Mikrosatelliten

Die Primer für die elf anonymen Mikrosatelliten waren zu Beginn dieser Untersuchung bereits entwickelt. Sie entstammten einer für Mikrosatelliten angereicherten genomischen Sequenzdatenbank. Zu finden sind sie in der EMBL nucleotide database, (Accession No. AJ249303-AJ249307, AJ009898, AJ009900, AJ009901 and AJ009904), beschrieben in Reusch *et al.* (1999a) und Reusch (2000).

Es handelt sich ausschließlich um Dinukleotid-Mikrosatelliten mit der Sequenz GA/CT, die in zwei Multiplex-PCRs mit vier bzw. fünf anonymen Mikrosatelliten amplifiziert wurden. In einer PCR wurden die restlichen zwei anonymen Mikrosatelliten mit einem gekoppelten Mikrosatelliten kombiniert. Eine Übersicht aller verwendeten Mikrosatelliten und der Zusammenstellung der Multiplex-PCRs gibt Tabelle 2.

### 2.3.2 Gengekoppelte Mikrosatelliten

Die gekoppelten Mikrosatelliten entwickelte ich auf der Grundlage einer EST-Datenbank von *Zostera marina*, die exprimierte Sequenzen von 1103 Genen enthielt (MPIL Plön, T. Reusch). Das ‚Database Mining‘ wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Sequenzen der Datenbank wurden mit dem Programm Codon Code Aligner 1.2.0 (CodonCode Corp.) nach repetitiven Motiven durchsucht (Einstellungen: mindestens sieben Wiederholungen bei Dinukleotidmotiven und mindestens sechs bei Tri- oder Tetranukleotiden) und die Sequenzen, welche solche Motive enthielten, anschließend editiert und somit auf Fehler in der Basenfolge überprüft. Alle

Tabelle 2: Verwendete Mikrosatelliten und Primer

Multiplex-PCR	Mikrosatellit	Typ	F-Primer	R-Primer	Allelgröße (bp)	Zahl der Allele
Pool A	C_P19_86	ACC	FAM-GTCGCACGCTCTTCTTCC	ATCCAGCTGTTGCAGTAGGC	67- 82	8
	Contig213	AGG	FAM- AATCTGTTGCCACGAAGGAG	TCACCTTCATCAAGCAGTCG	89-110	8
	C_P19_17	AAG	HEX- TCGTCGAGAAAGAGGAGGAA	TGTTCTGATTCGGTTCTCCA	75- 99	9
	A_P04_93	GA/CT	HEX- CGAACATGAATCTCCGAACC	GGTAAATGCACCCAGCTCTC	116- 124	5
Pool B	Contig75	CCAT	FAM- CATTCCATTCAAGAGCAGCA	CAACAAATCAATCAATCATTCACTC	124- 144	8
	A_P04_37	GT/CA	HEX- ATAAAAACCGCCTGATCG	CACACACACAGACGATCGAA	86- 92	4
	C_P06_73	AAG	NED- CGAATCTCTCTGCGTCTTT	ACCGACCGGATTTTATGCT	86- 95	4
Pool C	C_P02_23	AT	FAM- TCGTTGGATACTGCACTTCTC	GAATCCAACCAATTTTAAATACC	132- 148	9
	C_P19_89	GA/CT	HEX- AGTGA AAAACAAGAAAGAGAAAC	CGTCGTCAAGTAGGCTCAA	88- 98	7
	C_P12_75 (CT)12(GT)5		HEX- CCTCTTTTCTCTCTCTCTCTCT	CTTCTGGAAATGATGCCATA	98- 116	12
	Contig80	AAG	NED- TGGTCTTCTTCACTCGCTCA	AGCGACGATTTTCAGCATT	72- 99	10
	C_P13_53	GA/CT	FAM- CCCCATCTTTTGAGTTTGA	TCATCATTTCTTGCAATTTGAATC	86- 110	12
PoolID	C_P07_28	AT	HEX- GTACACCCGTTGCGTTCATT	GATTCGCTAGACTTGGCTCTG	240- 260	7
	C_P01_58	GA/CT	NED- GAGAAAGCCAGGAGAGAGAGAGA	AACTTGTGCTTTCGGCTATT	118- 136	9
PoolID2	GA4 *	GA/CT	FAM- GCGTGGATTCTGGTTTTTCG	GCATATCCTCTTCTTTTGCCC	130-139	7
	GA1 *	GA/CT	HEX- TAGTGGTGGTTGTTGGAGTGC	GCCTCTTCCITTCAGACTCCC	110-124	14
4er	GA-2 *	GA/CT			98-136	18
	GA-35 *	GA/CT			76-142	31
	GA-23 *	GA/CT			157-189	11
	GA-17H *	GA/CT			111-153	20
5er	GA-12 *	GA/CT			126-136	7
	GA-20 *	GA/CT			150-170	9
	GA-17D *	GA/CT			176-204	8
	GA-19 *	GA/CT			140-160	7
	GA-16 *	GA/CT			154-182	11

Die Sequenzen befinden sich in der EMBL Nukleotide Database (Ac-No. AJ249303-AJ249307, AJ009896, AJ009900, AJ009901 und AJ009904)

\* entwickelt von TBH Reusch (Reusch 1999, Reusch 2000)

bis auf einen Mikrosatelliten bestanden aus reinen Sequenzwiederholungen eines Motivs, ein gemischtes repetitives Motiv ((CT)<sub>12</sub>(GT)<sub>5</sub>) kam nur bei dem Mikrosatellit C\_P12\_75 vor. Insgesamt fand ich unter den geschilderten Suchbedingungen in 23 Sequenzen repetitive Motive. Die Gene, für welche die so ermittelten Mikrosatelliten-Kandidaten codieren, ermittelte ich durch eine Homologiesuche mit dem NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, vgl. Tabelle 3). Ich führte ein Alignment der fünf Blast-Hits aus der NCBI-Datenbank, welche die größten Übereinstimmungen mit der Kandidaten-Sequenz aufwiesen, mit dem Programm BioEdit durch und betrachtete die Lage der Exon-Intron-Grenzen dieser Sequenzen. So stellte ich sicher, dass sich in der näheren Umgebung des Mikrosatelliten, also etwa 100 Basen aufwärts und abwärts auf der DNA, keine Exon-Intron-Grenze befindet. Sollte eine solche Grenze zwischen den entwickelten Primern auftreten, würde ein sehr viel längeres Produkt amplifiziert werden. Da die Grenzen jedoch nicht immer angegeben waren, konnte in Einzelfällen keine Überprüfung stattfinden. In einem Fall wurde tatsächlich eine Intron-Exon-Grenze überschritten und ein größeres Produkt als erwartet amplifiziert. Aus diesem Grund ist das Produkt des Mikrosatelliten C\_P07\_28 etwa 250 Basenpaare lang, was die Verwendbarkeit dieses Markers aber nicht beeinträchtigt.

**Tabelle 3:** Großes Seegras (*Zostera marina*): Ergebnisse der Homologiesuche solcher Gene aus einer EST-Datenbank, die Mikrosatelliten in der 5' oder 3'-untranslatierten Region (UTR) aufweisen

Mikrosatellit	Lokalisation	Gen / Homologie	Accession number
C_P19_66	5'UTR	saure Phosphatase	<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_194655
Contig213	3'UTR	unbekanntes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i> AY143804
C_P19_17	5'UTR	bHLH- Protein (Transkriptionsfaktor)	<i>Oryza sativa</i> NP_910407
A_P04_93	3'UTR	violette saure Phosphatase	<i>Nicotiana tabacum</i> BAC55157
Contig75	3'UTR	Aquaporin	<i>Nicotiana tabacum</i> AAL33585
A_P04_37	3'UTR	Defensin (Protease- Inhibitor)	<i>Castanea sativa</i> AAL15885
C_P06_73	5'UTR	Nukleotid- Zucker- Epimerase, GAE1	<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_194773
C_P02_23	3'UTR	Lipid- Transfer- Protein, TED4	<i>Zinnia elegans</i> BAA06462.
C_P19_89	3'UTR	hypothetisches Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i> CAB81404
C_P12_75	5'UTR	Cytochrom C	<i>Fritillaria agrestis</i> O22642
Contig80	3'UTR	unbekanntes Protein	<i>Oryza sativa</i> NP_913907
C_P13_53	3'UTR	Aposporie- assoziiertes Protein C, Aldose 1-Epimerase	<i>Arabidopsis thaliana</i> NP_200543
C_P07_28	5'UTR	mutmaßliches Nodulin 3	<i>Oryza sativa</i> XP_465955
C_P01_58	5'UTR	Vakuoläre H <sup>+</sup> -ATPase, Proteolipid	<i>Gossypium hirsutum</i> AAA82977



Für 17 Mikrosatelliten-Kandidaten wurden mit dem Programm Primer3 (Rozen 2000, [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) versuchsweise Primer entwickelt. Für einen Mikrosatelliten ließ sich kein Primer mit den gewünschten Eigenschaften entwickeln. Bei der Erprobung zeigten sich 14 der übrigen 16 Kandidaten polymorph und eindeutig in Bezug auf die Länge des Amplifikationsproduktes auswertbar. Bei einem Kandidaten war das Primerpaar nicht funktionsfähig und es gelang nicht, den Mikrosatellit zu amplifizieren. Ein anderer Mikrosatellit erwies sich in allen Populationen als monomorph.

Es handelt sich bei den 14 verwendeten gekoppelten Mikrosatelliten um acht Dinukleotidmikrosatelliten, von denen fünf GA/CT- Mikrosatelliten (einer gemischt mit GT), einer ein GT- und zwei AT- Mikrosatelliten sind. Dazu kommen fünf Trinukleotidmikrosatelliten (3 AAG-, 1 AGG- und 1 ACC-Mikrosatellit) und ein Tetranukleotidmikrosatellit mit der Sequenz CCAT (vgl. Tabelle 2).

## 2.4 PCR und genetische Analyse

Die Amplifikation der Mikrosatelliten mittels PCR erfolgte nach modifizierten Protokollen, die auf Reusch (Reusch 2000) zurückgehen (alle Protokolle siehe Anhang). Ich führte mit jeder DNA-Probe insgesamt sieben Multiplex-PCRs durch (vgl. Tabelle 2). Die anonymen Mikrosatelliten wurden in zwei kombinierten PCR-Reaktionen (‚4er‘, ‚5er‘) mit 28 Zyklen verwendet (Reusch 2000). In einer PCR-Reaktion (‚Pool D2‘) wurden zwei anonyme und ein gekoppelter Mikrosatellit kombiniert, das Protokoll wurde abgeändert, indem die Annealing-Zeit in jedem Zyklus auf eine Minute verlängert wurde und nur 26 Zyklen durchlaufen wurden. Dieses abgeänderte Protokoll verwendete ich auch bei den übrigen Multiplex-PCRs, allerdings erhöhte ich die Zyklenzahl in der PCR ‚Pool C‘ auf 27. ‚Pool B‘ wurde mit einer Touchdown-PCR amplifiziert, bei der die Annealing-Temperatur von 61 °C in zehn Zyklen um jeweils 0,5 °C abgesenkt wurde, anschließend folgten 16 Zyklen mit Annealing bei 56 °C. ‚Pool D‘ wurde in einer Hotstart-PCR mit anfänglicher Denaturierung für 10 min bei 96 °C und insgesamt 27 Zyklen amplifiziert.

Die PCR-Produkte aller sieben Multiplex-PCRs wurden einzeln, d.h. ohne sie weiter zu kombinieren, in einem ABI 3100 Sequenzierer (Applied Biosystems) nach Standard-Protokollen gescannt. Die Längen der Allele wurden mit den Programmen GeneScan 3.7 und Genotyper 3.7 (Applied Biosystems 1998, 2001) erfasst und ausgewertet.

Von ursprünglich insgesamt 489 genotypisierten Individuen konnten 485 für die Analyse verwendet werden. Vier Proben, bei denen die Daten für mehr als einen Mikrosatelliten-Locus fehlten, wurden aus dem Datensatz entfernt, so dass jedes für die Datenanalyse verwendete Individuum an mindestens 24 Loci eindeutig genotypisiert wurde. Es fehlte jedoch nur bei zehn Proben ein Mikrosatelliten-Locus, bei den restlichen Proben konnten alle 25 Loci genotypisiert werden.

## **2.5 Datenanalyse**

Die Analyse der gewonnenen Daten wurde auf drei unterschiedlichen Ebenen durchgeführt: Am Anfang standen Untersuchungen, die das Ausmaß der Differenzierung der gesamten elf Populationen zum Ziel hatten, hierfür wurden alle 25 Mikrosatelliten-Loci in gleicher Weise berücksichtigt. Als zweites untersuchte ich die Frage, ob sich gekoppelte und anonyme Mikrosatelliten als zwei Gruppen mit unterschiedlichem Verhalten in Bezug auf die Differenzierung im Vergleich von Populationen in unterschiedlichen Habitaten darstellen. Der dritte Aspekt stellt den Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Zur Identifizierung von Genen, die möglicherweise den Einflüssen der Selektion unterliegen, suchte ich unter den einzelnen Loci nach Ausreißern mit auffälligem Verhalten.

### **2.5.1 Genetische Differenzierung der Seegrass-Populationen**

Die gewonnenen Mikrosatelliten-Daten wurden zuerst mit dem Programm Microsatellite Analyzer (Dieringer und Schlötterer 2003) ausgewertet. Es wurden unter anderem die Allelzahlen und -frequenzen der einzelnen Mikrosatelliten sowie die erwartete Heterozygotie ( $H_{exp}$ ) der Einzelloci berechnet.

Als Parameter zur Abschätzung genetischer Differenzierung verwendetet ich die von Wright (1951) eingeführten Parameter  $F_{st}$  und  $F_{is}$  in ihrer von Weir und Cockerham (1984) definierten Form. Die Signifikanzen der  $F_{st}$ -Werte wurden durch Permutation der Genotypen berechnet, wobei gemäß der Standardeinstellungen 10000 Permutationen durchgeführt wurden. Eine Permutation der Genotypen ist der der Allele vorzuziehen, weil kein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorausgesetzt werden kann und keine Angaben über die Kopplung von Allelen vorliegen. Dieses Verfahren wird als konservativ, wenn auch nicht immer als vollständig zufrieden stellend (Michalakis und Excoffier 1996) betrachtet.

Es wurden die  $F_{st}$ -Werte der 25 einzelnen Loci über alle elf untersuchten Populationen, und zwischen allen Populationspaaren berechnet. Auch die globalen  $F_{st}$ -Werte, die aus den Daten aller Mikrosatelliten ermittelt wurden, wurden für den gesamten Datensatz und die einzelnen Populationsvergleiche berechnet.

Um zu verdeutlichen, zwischen welchen Einzelpopulationen eine mehr oder weniger starke genetische Differenzierung stattgefunden hat, führte ich ein nichtparametrisches Multidimensional Scaling-Verfahren (nMDS) mit dem Programm STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., 2004) durch. Das nMDS-Verfahren gehört zu den distanzbasierten multivariaten Verfahren, welche auf symmetrischen Distanz-, Ähnlichkeits- oder Unähnlichkeitsmatrizen beruhen. Dieses Verfahren maximiert die Rangordnungs-Korrelation zwischen den vorgegebenen Distanzen und den Distanzen im Raum der Ordination. Die Punkte werden in einem vorgegebenen Raum (definiert durch die Anzahl der Dimensionen) so angeordnet, dass der „STRESS“, das ist ein Maß für die Unterschiedlichkeit beider Distanzarten, minimiert wird.

In dieser Analyse wurden die paarweisen genetischen Unterschiede aller möglichen Paarungen von Populationen, verwendet wurde eine Matrix der paarweisen  $F_{st}$ -Werte, in einer zweidimensionalen Ordination dargestellt. Ein eventuelles ‚Clustering‘ der Populationen kann auf diese Weise sichtbar gemacht werden. Nach Beaumont und Nichols (Beaumont und Nichols 1996) ist dies auch empfehlenswert, um den Datensatz im Fall eines starken ‚Clustering‘ ausdünnen zu können.

Zur Untersuchung, ob die Populationen mit zunehmender geografischer Entfernung auch genetisch stärker differenziert sind, erstellte ich mit dem Programm JMP 5.0.1 (SAS, 2002) einen Isolation-by-Distance-Plot (Wright 1943; Slatkin und Maddison 1990). Dabei wurde die geografische gegen die genetische Entfernung (verwendet wurden paarweise  $F_{st}$ -Werte) aufgetragen und eine Regressionsgerade anhand der Punkte von 15 Populationsvergleichen - es wurden alle Paarungen der sechs im Jahr 2005 beprobten Populationen verwendet - ermittelt.

Außerdem untersuchte ich mit dem Programm STRUCTURE 2.1 (<http://www.stats.ox.ac.uk/~pritch/home.html>, Pritchard *et al.* 2000) die Populationsstruktur. Das Algorithmus-basierte Verfahren verwendet die Genotypen der einzelnen Individuen, um verschiedene Annahmen für die Zahl der Populationen, in die sich die Gesamtheit der Individuen aufteilt, zu prüfen. Die Zahl ‚tatsächlicher‘ Populationen („Cluster“), die laut Modell am wahrscheinlichsten ist, wird angegeben. Es wurden keinerlei Vorgaben zur Populationsstruktur gemacht, die Einstellungen waren laut Empfehlung der Entwickler wie folgt: Dauer der BurnIn- Period 30 000, Zahl der MCMC-Wiederholungen 1 000 000. Das „Admixture Model“, in dem Individuen eine gemischte Herkunft aus mehreren Teilpopulationen haben können, wurde verwendet, und es wurden verschiedene  $F_{st}$ -Werte der Einzelpopulationen angenommen.

### **2.5.2 Vergleich der Populationsdifferenzierung anonymer und gekoppelter Mikrosatelliten**

Die Frage, ob sich die  $F_{st}$ -Werte, und damit die Differenzierung zwischen den Einzelpopulationen der beiden Markertypen unterscheiden, ist bedeutsam für die weitere Bewertung und Verwendung gekoppelter Mikrosatelliten aus EST-Sequenzen in populationsgenetischen Untersuchungen.

Zur Untersuchung dieser Frage führte ich neben t-Tests mehrere Zwei-Weg-ANOVAs durch, die belegen sollten, ob sich die  $F_{st}$ -Werte der anonymen Mikrosatelliten generell von denen der gekoppelten unterscheiden. Dafür verwendete ich die  $F_{st}$ -Werte aller 25 einzelnen Loci aus den Vergleichen von allen fünf Populationspaaren mit Habitatkontrast (L01W/P, L05W/P, H99W/P, H05W/P, K05W/P). In einer weiteren Analyse wurden nur die drei

Standortvergleiche aus dem Jahr 2005 verwendet. Die Variablen waren also Markertyp (anonym/gengekoppelt), Populationspaar (z.B. L05W/L05P) und  $F_{st}$ -Wert des Locus. Im Prinzip sollte eine ANOVA zwar nur mit normal verteilten Werten durchgeführt werden, was bei den  $F_{st}$ -Werten nicht der Fall war. Da aber die Varianzen homogen verteilt waren, kann eine ANOVA dennoch vertreten werden. Die Analysen wurden mit dem Programm JMP 5.0.1 (SAS 2002), durchgeführt. Neben der Frage, ob sich anonyme und gengekoppelte Mikrosatelliten unterscheiden, untersuchte ich, ob sich die einzelnen Standortvergleiche unterscheiden und überprüfte die Interaktion der beiden Variablen Markertyp und Populationspaar.

Eine entsprechende ANOVA führte ich zusätzlich neben den globalen  $F_{st}$ -Werten auch mit den globalen  $F_{is}$ -Werten durch, um ein unterschiedliches Verhalten von anonymen und gengekoppelten Loci in Bezug auf den Grad der Inzucht feststellen zu können.

### **2.5.3 Identifizierung von einzelnen Mikrosatelliten-Loci unter Selektion**

Die zentrale Fragestellung meiner Arbeit zielt auf die Erkennung von Ausreißern unter den Mikrosatelliten- Loci. Diese sollen als Kandidaten für Loci, die unter den Einflüssen der Selektion stehen, identifiziert werden.

Ich verwendete zwei verschiedene Ansätze zur Identifikation dieser Kandidaten, das Modell von Beaumont und Nichols (1996) sowie jenes von Vitalis *et al.* (2001). Bei beiden wird auf der Grundlage eines neutralen Modells eine Verteilung von Werten der genetischen Differenzierung simuliert, die die normale Varianz der Loci darstellen soll. Von dieser Nullverteilung ausgehend können Loci, die abweichendes Verhalten zeigen, identifiziert werden. Ein modellfreier Ansatz, der eine Verteilung auf der Grundlage zahlreicher Loci verwendet, wie von (Akey *et al.* 2002) angewandt, wurde ausgeschlossen, weil hierfür die Datenbasis, d.h. die Zahl der untersuchten Loci, um ein vielfaches größer hätte sein müssen, um verlässliche Verteilungen zu erhalten.

Entgegen der vielfach angewandten Praxis, die zeitliche Entwicklung von Mikrosatelliten mit einem ‚Stepwise Mutation Model‘ (SMM) zu simulieren (Schlotterer 2002a; Kauer *et al.* 2003), verwendete ich ein ‚Infinite Alleles

Model' (IAM), da dies für die vorliegende Umwelt- und populationsgenetische Situation besser passend erschien. Erstens kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass Mikrosatelliten tatsächlich ausschließlich nach dem SMM mutieren (siehe z. B. Ausführungen von Flint *et al.* 1999 zu Mutationsmechanismen von Minisatelliten). Es können neben schrittweisen Mutationen, die jeweils nur eine Wiederholung des Motivs hinzufügen oder entfernen, auch gelegentlich größere Sprünge in der Zahl der Wiederholungen des Motivs auftreten, wie bei anderen Spezies nachgewiesen wurde (Rienzo *et al.* 1994; Kayser *et al.* 2003). Mikrosatelliten, die größere Unterschiede in der Zahl der Wiederholungen ihres Motivs aufweisen, werden nach dem SMM als stärker genetisch differenziert betrachtet, was nicht zwangsläufig der Fall ist. Zweitens ist die Zeitspanne seit der Trennung der untersuchten Populationen so kurz, dass Hin- und Rückmutationen, die zu derselben Anzahl an wiederholten Motiven führen, mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auftreten. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass strukturell gleiche Mikrosatelliten (identity in state, IIS) auch herkunftsgleich sind (identity by descent, IBD), was das SSM ebenfalls nicht voraussetzt, und somit eventuell die in den Daten enthaltenen Informationen nicht optimal verwertet. Auch in ähnlichen Studien wie dieser, die per Multi-Locus- Scanning die Spuren der Selektion erfassen sollten, wurde auf Grund dieser Tatsachen stattdessen ein IAM verwendet (Casa *et al.* 2005; Vasemagi *et al.* 2005a).

Das Modell von Beaumont und Nichols geht von der Annahme aus, dass sich Mutation und genetische Drift im Gleichgewicht befinden. Migration zwischen den untersuchten Populationen wird von dem Modell berücksichtigt. Als Loci unter Selektion werden die Loci identifiziert, deren  $F_{st}$ -Werte in Abhängigkeit von der Heterozygotie außerhalb eines Vertrauensintervalls liegen, und deren Verhalten nicht vereinbar mit Selektionsneutralität ist.

Die Berechnungen nach diesem Modell wurden mit dem Programm Fdist2 (<http://www.rubic.reading.ac.uk/~mab/software/fdist2.zip>) durchgeführt. Folgende Einstellungen des Modells wurden in der ersten Analyse verwendet: Die Daten von allen untersuchten 485 Individuen aus elf Populationen wurden eingegeben. Es wurde von 100 Deme ausgegangen, versuchsweise wurde die Zahl der Deme auch auf elf (die minimale Zahl) herabgesetzt, was die

simulierte Verteilung geringfügig schmaler werden ließ. Demnach ist die größere Anzahl Deme nicht nur wahrscheinlicher, sondern auch der konservativerer Ansatz und wurde im Folgenden weiter verwendet. In der ersten Analyse wurde die Einstellung „11 Populationen“ gewählt. Das gewichtete Mittel der  $F_{st}$ -Werte aller Loci betrug 0,0206. Es wurde von einem Infinite Alleles Model (IAM) ausgegangen, allerdings war im Vorhinein überprüft worden, dass die simulierte Verteilung mit einem Stepwise Mutation Model (SMM) von der vorherigen kaum zu unterscheiden war, einziger Unterschied war ein etwas steileres Abfallen der Verteilung unter IAM bei Heterozygotie-Werten von über 0,8. Somit stellt das IAM die konservativere Alternative dar. Die mittlere Stichprobengröße über alle Populationen war 94 (das Modell erfasst die Mikrosatelliten-Allele einzeln, einer Stichprobengröße von 94 entsprechen also 47 diploide Individuen). Es wurden 100 000 Realisationen durchlaufen, und die 0,025-Quantile, die 0,5-Quantile (entspricht dem Median) und die 0,975-Quantile der generierten Verteilung berechnet. In dem Bereich zwischen den 0,025- und 0,975-Quantilen befinden sich 95 % der simulierten Werte, somit kann bei einem realen  $F_{st}$ -Wert davon ausgegangen werden, dass er mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit zwischen den Quantilen liegen wird. Loci, die  $F_{st}$ -Werte aufweisen, die außerhalb der simulierten Verteilung liegen, werden als Ausreißer bezeichnet.

Neben der Simulation auf der Grundlage aller elf Populationen wurden für jedes der fünf Populationspaare mit Habitatkontrast Simulationen erstellt und die tatsächlich auftretenden  $F_{st}$ -Werte der einzelnen Loci überprüft. Die Einstellungen blieben im Wesentlichen dieselben, allerdings wurde das gewichtete  $F_{st}$ -Mittel des jeweiligen Populationspaares verwendet, die Stichprobengröße angepasst und die Zahl der Populationen auf zwei gesetzt. Außerdem wurden zusammengefasste „Populationen“ aus den drei Wattpopulationen und den drei Prielpopulationen des Jahres 2005 erstellt und diese mit einer passenden Simulation getestet. Die Frage war, ob sich die Ergebnisse aus den Einzelvergleichen in einer solchen zusammengefassten Population wiederholen würden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass ein solches fallkontrolliertes („case-controlled“) Design eine bessere Identifizierung eventueller Ausreißer ermöglicht (Kohn *et al.* 2003).

Nach Beaumont und Nichols (1996) ist es ratsam, ein Modell mit dem gewichteten  $F_{st}$ -Mittel nur als ersten Ansatz zu verwenden und das Modell iterativ zu verbessern, indem man starke Ausreißer aus der Berechnung des Mittels herauslässt, um somit die Simulation den realen Daten möglichst gut anzupassen. Wahlweise sollte der Mittelwert durch einen etwas höheren oder tieferen Wert ersetzt werden, bis die Hälfte der tatsächlichen  $F_{st}$ -Werte unterhalb und die andere oberhalb der Medianlinie der Simulation liegt. Im vorliegenden Fall war dies allerdings nicht nötig, da die simulierten Daten eine gute Anpassung an die realen Daten darstellten und starke Ausreißer nicht auftraten (vgl. 4.3, Ergebnisse).

Das von Vitalis *et al.* entwickelte Programm DetSel 1.0 (Vitalis *et al.* 2003) erlaubt die Definition eines Satzes von mehreren Werten für einige Parameter, woraufhin das Programm gemischte Szenarien der Populationsentwicklung simuliert. Es wurden 100 000 koaleszente Simulationen durchlaufen, die die aufgrund der Ausgangsparameter erwartete Verteilung bildeten. Zu Beginn der Analyse wurden Werte für die Mutationsrate ( $\mu$ ) von 0,001, 0,005 und 0,01 in einem Infinite Allele Model gewählt, die Größe der Population vor der Spaltung ( $N_0$ ) wurde auf den Maximalwert 500 gesetzt. Die ursprüngliche Ausgangspopulation ( $N_e$ ) bestand aus 500, 1000 und 10000 Individuen. Anschließend wurden einige Parameter des Modells so moduliert, dass die von dem Programm simulierte Allelverteilung der realen Stichprobe entsprach, was Voraussetzung für die Anwendung der Methode ist. Die seit einem angenommenen Flaschenhals vergangene Zeit ( $T_0$ ) wurde auf 50, 100 und 200 Generationen festgelegt, die Zeit seit der Spaltung der Populationen ( $t$ ) auf 50 Generationen.

Es wurden nun in Abhängigkeit von der Zahl der Allele die berechneten Parameter für die einzelnen Loci mit der so erhaltenen Verteilung verglichen. Für jedes Populationspaar wurden die Allelzahlen  $k = 3$ ,  $k = 4$ ,  $k = 5$  und  $k \geq 6$  als Konditionen gewählt. Die Loci wurden jeweils mit der simulierten Verteilung verglichen, die der Zahl ihrer Allele in der untersuchten Stichprobe entsprach. Als Kriterium zur Identifizierung von Ausreißern wurden sowohl 95%- als auch 99%-Vertrauensbereiche verwendet.



Ich untersuchte alle fünf Populationspaare mit Habitatkontrast auf Ausreißer. Außerdem erstellte ich wie bei der Analyse mit Fdist2 zwei zusammengefasste ‚Populationen‘ aus den drei Wattpopulationen und den drei Prielpopulationen des Jahres 2005 und testete diese mit einer passenden Simulation. Die Einstellungen waren wie oben, allerdings wurde auch zusätzlich eine Verteilung mit  $N_e=10\,000$  und  $100\,000$  und  $T_0 = 100, 500$  und  $1000$  generiert, was unter den vorliegenden Bedingungen realistischer erschien.

Da die mit dem Programm DetSel identifizierten Ausreißer sehr zahlreich waren, sich allerdings zwischen den einzelnen Habitatvergleichen ähnelten, führte ich ein Resampling (Microsoft Excel Resampling Stats-Add-In) durch, um zu prüfen, wie wahrscheinlich das häufige Auftreten mehrerer Loci in den einzelnen Tests durch einen Zufall war.

#### **2.5.4 Das Problem der multiplen statistischen Tests**

Die Tatsache, dass die Durchführung vieler statistischer Tests zu einer Inflation der Fehler erster Ordnung führt, ist seit langem ein bekanntes Problem bei der Bearbeitung biologischer Fragestellungen. Solche Probleme tauchen insbesondere auf, wenn viele abhängige Variablen betrachtet werden, in diesem Fall 25 Genloci. Die traditionelle Lösung dieses Problems besteht darin, die Höhe des Signifikanzniveaus der Einzeltests so zu verringern, dass das globale Signifikanzniveau auf dem erwünschten Niveau bleibt. Mit der Bonferroni-Korrektur wird das gewählte Signifikanzniveau  $\alpha$  (z.B. 0,05) durch die Anzahl der Tests geteilt. In unserem Fall würde dies bedeuten, dass  $\alpha$  durch die Anzahl der Loci ( $N = 25$ ) geteilt werden müsste, das Signifikanzniveau eines Einzeltests würde damit auf 0,002 sinken. Diese sehr grobe und konservative Methode verringert dem entsprechend auch die Wahrscheinlichkeit, einen realen Ausreißer zu entdecken, und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers zweiter Ordnung. Auch die verbesserte Sequenzielle Bonferroni-Korrektur enthält neben mathematischen auch logische und praktische Nachteile (Moran 2003). Einige Studien mit ähnlicher Fragestellung verwenden die Bonferroni-Korrektur (Storz und Nachmann (2003) bei 17 Allozymen). In anderen Studien wurde dagegen vollständig auf eine Korrektur verzichtet (Vigouroux *et al.* (2002) bei 501 Mikrosatelliten,

Schlötterer (2002a) bei 94 Mikrosatelliten) oder stattdessen ein Signifikanzniveau von 0,01 festgesetzt (Vasemagi *et al.* (2005a) bei 92 Mikrosatelliten, Wilding *et al.* (2001) bei 306 AFLP- Loci). Aufgrund des explorativen Charakters meiner Studie erscheint auch hier ein solches Vorgehen als gerechtfertigt. Allerdings muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass es sich bei den Ausreißern um vorläufige Kandidaten für Loci unter Selektion handelt, und dass erst das wiederholte Auftreten eines Ausreißers in mehreren Populationsvergleichen mit demselben Habitatkontrast als Hinweis auf die Wirkung der Selektion zu werten ist.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genetische Differenzierung der Seegrass-Populationen

Die über alle 25 Loci berechneten  $F_{st}$ -Werte aller möglichen Populationspaarungen zeigten eine relativ geringe genetische Differenzierung, die gleichwohl in den meisten Fällen statistisch signifikant war (vgl. Tabelle 4).

Interessanterweise konnte mittels eines t-Tests kein Unterschied zwischen den  $F_{st}$ -Werten von Vergleichen mit Habitatkontrast und ohne (einschließlich der Vergleiche desselben Standortes in zwei unterschiedlichen Jahren) festgestellt werden ( $p=0,97$ ). Die genetische Differenzierung zwischen Populationen verschiedener Habitate war somit nicht größer als jene zwischen Populationen aus demselben Habitat.

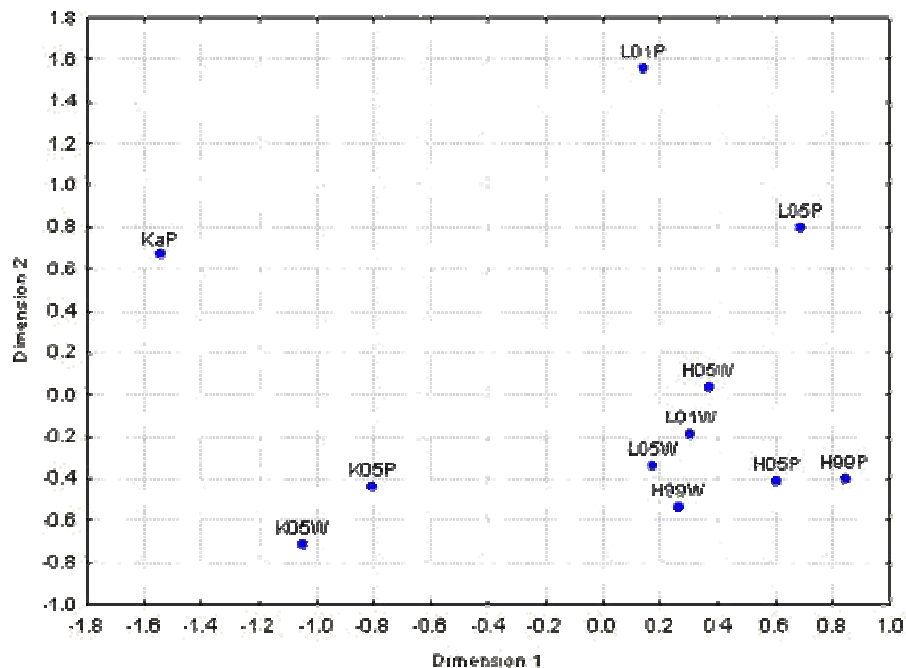
**Tabelle 4:**  $F_{st}$ -Werte (oberhalb der Diagonalen) aller Populationsvergleiche und dazugehörige p-Werte (unterhalb der Diagonalen) nach Bonferroni- Korrektur. n.s. = nicht signifikant, n.s.\*\* = nicht signifikant nach Bonferroni, aber  $p < 0.01$ . In die Berechnung flossen Allelfrequenzen aus 25 Loci ein.

	H05W	H05P	H99W	H99P	L01P	L01W	L05P	L05W	KaP	K05P	K05W
H05W		0.0097	0.0099	0.0121	0.0249	0.0058	0.0122	0.0019	0.0380	0.0181	0.0219
H05P	0.0055		0.0110	-0.0026	0.0303	0.0040	0.0246	0.0065	0.0297	0.0208	0.0313
H99W	0.0055	0.0055		0.0124	0.0331	0.0037	0.0162	-0.0017	0.0328	0.0211	0.0252
H99P	0.0055	n.s.	0.0055		0.0283	0.0069	0.0248	0.0082	0.0333	0.0258	0.0342
L01P	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055		0.0231	0.0206	0.0266	0.0340	0.0372	0.0353
L01W	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.**	0.0055		0.0170	-0.0028	0.0299	0.0147	0.0209
L05P	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055		0.0123	0.0415	0.0302	0.0266
L05W	n.s.	n.s.**	n.s.	0.0165	0.0055	n.s.	0.0055		0.0302	0.0121	0.0185
KaP	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055		0.0185	0.0288
K05P	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055		0.0069
K05W	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	0.0055	n.s.**	

Die  $F_{st}$ -Werte der Populationsvergleiche reichten von negativen Werten (z.B. L05W/L01W: -0,0028) bis zu maximal 0,0415 im Vergleich KaP/L05P. Negative  $F_{st}$ -Werte können auftreten, wenn die genetische Differenzierung innerhalb einer Population größer ist als zwischen den Populationen. Da  $F_{st}$ -Werte auf einer varianzanalytischen Schätzung durch AMOVA (analysis of

molecular variance) beruhen, können sie auch die Varianz der ‚tatsächlichen‘ Werte widerspiegeln und negativ erscheinen, obwohl der dazu gehörige tatsächliche Wert positiv, gleichwohl aber sehr klein ist. Im weiteren Verlauf dieser Untersuchung und in allen folgenden Tests wurden negative  $F_{st}$ -Werte gleich Null gesetzt, da negative  $F_{st}$ -Werte formal nicht existieren und dieses Vorgehen die konservativere Alternative war als das weitere Umgehen mit negativen Werten. Die  $F_{st}$ -Werte einiger Paarungen, besonders zwischen den Orten Hooge und Langeneß, zeigten negative  $F_{st}$ -Werte und keine signifikanten p-Werte, das bedeutet, die genetische Differenzierung zwischen diesen Populationen konnte nicht nachgewiesen werden. Das globale  $F_{st}$  über alle Loci und alle Populationen betrug 0,019 ( $p=0,0001$ ).

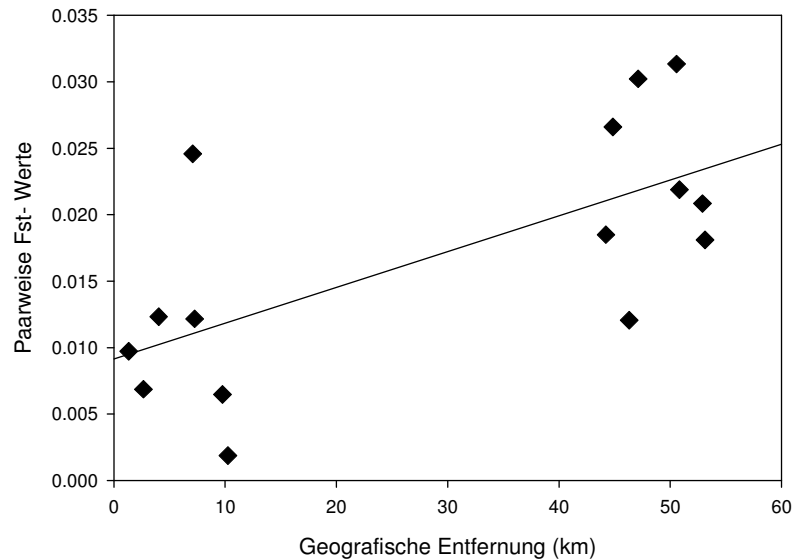
Um einen Eindruck von der Differenzierung der Einzelpopulationen zu gewinnen, wurde eine explorative Analyse mit einem multivariaten Verfahren durchgeführt. Die per nichtmetrischem Multi-Dimensional-Scaling- (nMDS) Verfahren aus der Distanzmatrix der  $F_{st}$ -Werte ermittelte grafische Darstellung (vgl. Abb.4) zeigt, dass sich die Populationen wenig voneinander entfernt haben. Der STRESS beträgt 0,12, was nach Clarke (1993) ein akzeptabler



**Abb. 4:** Zweidimensionale Darstellung der Differenzierung aller elf beprobten Populationen nach nichtmetrischem Multi-Dimensional-Scaling-Verfahren. STRESS= 0,12

Wert für die Güte der Übereinstimmung zwischen Ausgangsmatrix und zweidimensionaler Darstellung ist. Es ist deutlich zu sehen, dass keine großen Unterschiede in der Differenzierung der Populationen vorhanden sind - weder sind die Watt- und Prielpopulationen als getrennte Cluster zu erkennen, noch die einzelnen Orte. Besonders auffällig ist, dass die Wattpopulationen von Hooge und diejenigen von Langeneß nahe beieinander liegen, aber auch die Prielpopulationen dieser Orte sind wenig differenziert - am weitesten entfernt ist die Population L01P. Die Populationen aus Königshafen sind dagegen etwas stärker differenziert. Allerdings sind die Unterschiede zwischen allen elf Populationen so gering, dass sich die Vergleiche verschiedener Standorte nicht wesentlich von Vergleichen ‚derselben‘ Populationen eines Standortes aus verschiedenen Jahren abheben. Da keine Populationen ein abgegrenztes Cluster bildeten, wurde - gemäß den Empfehlungen (Beaumont und Nichols 1996) - auch keine Population aus der weiteren Analyse entfernt.

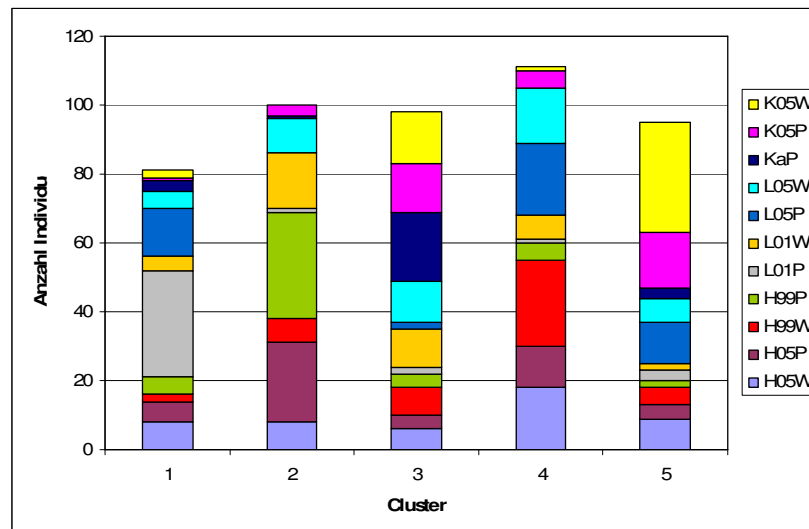
Um zu prüfen, ob mit zunehmender geografischer Entfernung auch die genetische Entfernung zunimmt, führte ich einen Test auf Isolation-by-Distance (IBD, Wright 1943) durch. Der Isolation-by-Distance-Plot wurde aus den geografischen Entfernungen aller sechs verschiedenen Probennahmeorte und deren paarweisen  $F_{st}$ -Werten erstellt (vgl. Abb. 5). Es liegt ein signifikantes IBD-Muster bei den sechs im Jahr 2005 untersuchten Populationen vor. Die Gleichung der Geraden lautet:  $y (F_{st}) = 0.00915 + 0.00027 \times (\text{geografische Entfernung})$ ,  $r^2 = 0,44$  und  $p = 0,0067$ .



**Abb. 5:** Test auf Isolation-by-Distance (IBD): Genetische Differenzierung (als  $F_{st}$ ) als Funktion geografischer Entfernung. In diese Analyse flossen sechs im Jahr 2005 beprobte Standorte ein.  $Y=0.00915 + 0.00027 x$ ,  $r^2=0,44$ ,  $p=0.0067$

Die Analyse der wahrscheinlichsten Zahl von abgegrenzten Gruppen ('Clustern'), in die sich die vorhandenen Genotypen aller 11 Populationen aufteilen, mit dem Programm STRUCTURE ergab, dass es sich um fünf Cluster ( $K=5$ ) handelt. Diese Möglichkeit war mit  $\ln \Pr(X/5) = -27751$  und mit einem geschätzten  $\Pr(K=5)$  von  $\sim 1,0$  (nach Pritchard *et al.* (2000)) sehr viel wahrscheinlicher als alle anderen Anzahlen von Clustern. Es war auffällig, dass die fünf ermittelten Cluster sehr stark durchmischt waren und jeweils aus Individuen vieler unterschiedlicher Populationen bestanden (vgl. Abb.6). Die fünf ermittelten Cluster setzten sich wie folgt zusammen: Cluster 1 (82 Individuen) bestand aus fast allen Individuen aus L01P, sowie einzelnen Pflanzen aus H05W und L05P. Cluster 2 (102 Individuen) umfasste so gut wie alle Pflanzen aus H99P, etwa die Hälfte der Pflanzen aus H05P und L01W und Einzelfälle aus anderen Populationen. Cluster 3 (101 Individuen) wurde aus den Individuen der Population KaP sowie Teilen von K05P und K05W und L01W gebildet. Cluster 4 (115 Individuen) wurde von den meisten Individuen aus H99W gebildet, dazu kamen Pflanzen aus L05P und L05W, H05W und H05P. Cluster 5 (100 Individuen) wurde jeweils etwa von der

Hälfte der Populationen K05P und K05W gebildet, Einzelfälle stammten aus H05W und L05P.



**Abb. 6:** Fünf aus den Daten der Seegrass-Genotypen mit dem Programm STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) ermittelte Cluster und wie sie sich aus den elf beprobten Populationen zusammensetzen

### 3.2 Vergleich anonymer und gekoppelter Mikrosatelliten

Um die Frage zu beantworten, ob sich anonyme und gekoppelte Mikrosatelliten in ihren  $F_{st}$ - und  $F_{is}$ -Werten unterscheiden, wurden verschiedene Parameter der genetischen Differenzierung verwendet. Neben den globalen, d.h. über alle Populationen berechneten,  $F_{st}$ - und  $F_{is}$ -Werten der 25 Loci (vgl. Tabelle 5) wurden die  $F_{st}$ -Werte der einzelnen Loci in allen Standortvergleichen mit Habitatkontrast analysiert. Nur bei einem Locus trat ein leicht negativer  $F_{st}$ -Wert auf (C\_P06\_73, gekoppelt:  $F_{st} = -0,000054$ ,  $p = 0,45$ ), negative  $F_{is}$ -Werte wurden bei 4 gekoppelten (C\_P19\_66, C\_P19\_89, C\_P12\_75, C\_P01\_58) und 4 anonymen Loci (GA17H, GA12, GA20, GA17D) ermittelt. Diese negativen Werte wurden vor der Durchführung weiterer Tests gleich Null gesetzt.

Ich konnte keinen Unterschied zwischen den  $F_{st}$ -Werten der anonymen und der gekoppelten Mikrosatelliten feststellen. Weder anhand der fünf

Standortvergleiche mit Habitatkontrast (t-Test, alle  $p > 0,05$ ) noch anhand der globalen  $F_{st}$ -Werte über alle Populationen (t-Test,  $p = 0,3$ ).

**Tabelle 5:** Globale  $F_{st}$ -,  $F_{is}$ - und Heterozygotie-Werte aller 25 Loci

Locus	Typ	$F_{st}$ global	P-Wert ( $F_{st}$ )	$F_{is}$ global	$H_{exp}$
C_P19_66	gengekoppelt	0,021188	0,0001	-0,014609	0,103821
contig213	gengekoppelt	0,019533	0,0001	0,016531	0,382056
C_P19_17	gengekoppelt	0,016756	0,0001	0,040422	0,696014
A_P04_93	gengekoppelt	0,039933	0,0001	0,212065	0,517403
Contig75	gengekoppelt	0,019468	0,0001	0,045995	0,657834
A_P04_37	gengekoppelt	0,027395	0,0002	0,105317	0,118162
C_P06_73	gengekoppelt	-0,000054	0,448	0,199183	0,131276
C_P02_23	gengekoppelt	0,022012	0,0001	0,165994	0,45843
C_P19_89	gengekoppelt	0,041678	0,0001	-0,017533	0,528697
C_P12_75	gengekoppelt	0,009269	0,008	-0,020024	0,687004
Contig80	gengekoppelt	0,018461	0,0001	0,013556	0,724914
C_P13_53	gengekoppelt	0,018128	0,0001	0,012474	0,803632
C_P07_28	gengekoppelt	0,01767	0,0005	0,034637	0,321254
C_P01_58	gengekoppelt	0,015618	0,0001	-0,018865	0,519375
GA2	anonym	0,004126	0,0599	0,006108	0,76421
GA35	anonym	0,024837	0,0001	0,255672	0,900044
GA23	anonym	0,023713	0,0001	0,024149	0,69749
GA17H	anonym	0,005936	0,0009	-0,001237	0,902727
GA12	anonym	0,006406	0,0455	-0,011326	0,299405
GA20	anonym	0,017633	0,0002	-0,02686	0,444871
GA17D	anonym	0,022104	0,0001	-0,033107	0,588635
GA19	anonym	0,01864	0,0027	0,012106	0,53714
GA16	anonym	0,018159	0,0003	0,039499	0,375407
GA4	anonym	0,011592	0,0145	0,020245	0,435998
GA1	anonym	0,027401	0,0001	0,031076	0,672161
gesamt		0,018755	0,0001	0,041394	

Es konnten keine Unterschiede in der Höhe der genetische Differenzierung in den fünf Priel-Watt-Populationspaarungen zwischen anonymen und gengekoppelten Mikrosatelliten festgestellt werden (2-Weg-ANOVA, Faktoren: Populationspaar, Markertyp,  $F_{st}$ ,  $p = 0,84$ ). Auch die Interaktion der beiden Variablen „Populationspaar“ und „Markertyp“ ergab kein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,22$ ). Das bedeutet, auch im Einzelvergleich verschiedener Standortpaare konnte kein Unterschied zwischen den  $F_{st}$ -Werten der anonymen und der gengekoppelten Mikrosatelliten festgestellt werden. Wenn der Datensatz nur auf die Beprobung aus dem Jahr 2005 beschränkt wird, zeigt sich allerdings ein Trend zu höheren  $F_{st}$ -Werten bei gengekoppelten Mikrosatelliten als bei anonymen ( $\bar{X}_{anonym} = 0,007$ ,  $\bar{X}_{gengekoppelt} = 0,015$ ,  $p = 0,079$ ). Die Analyse, die nur auf den Daten von 2005 beruht, ist in diesem

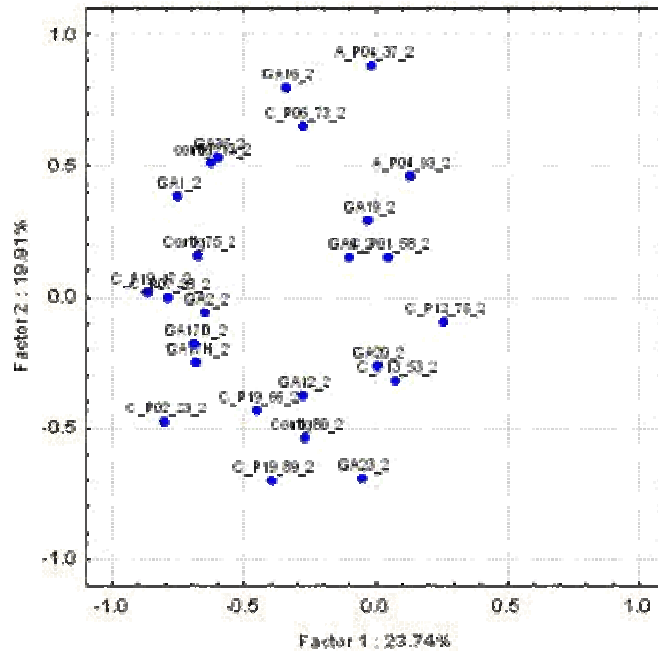


Fall vorzuziehen, weil die Wiederholungen am gleichen Standort in verschiedenen Jahren nicht unabhängig voneinander sind. Außerdem hatte sich bereits herausgestellt, dass im Vergleich der Daten zweier Jahre von einem Ort eine sehr große Varianz vorhanden war, was eventuelle Ergebnisse verschleiern kann.

Auch anhand der globalen  $F_{st}$ -Werte (berechnet über alle elf Populationen) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen anonymen und gekoppelten Mikrosatelliten festgestellt werden (ANOVA, Faktoren: Markertyp, globales  $F_{st}$ ,  $\bar{x}_{anonym}=0,016$ ,  $\bar{x}_{gelinkt}=0,021$ ,  $p=0,3$ ). Auch die globalen  $F_{is}$ -Werte beider Markertypen als Maß für den Grad der Inzucht unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ANOVA, Faktoren: Markertyp, globales  $F_{is}$ ,  $p=0,42$ ). Ein interessantes Ergebnis zeigte sich, wenn die Vergleiche desselben Ortes in verschiedenen Jahren untersucht wurden. Obwohl ein eher geringerer genetischer Unterschied zwischen den Populationspaaren zu erwarten wäre, weil der Habitatkontrast wegfiel, waren die  $F_{st}$ -Werte der anonymen Loci signifikant kleiner als die der gekoppelten (Zwei-Weg-ANOVA, Faktoren: Populationspaar, Markertyp,  $F_{st}$ ,  $\bar{x}_{gekoppelt}=0,015$ ,  $\bar{x}_{anonym}=0,008$ ,  $p=0,007$ ).

### 3.3 Identifizierung von Mikrosatelliten-Loci unter Selektion

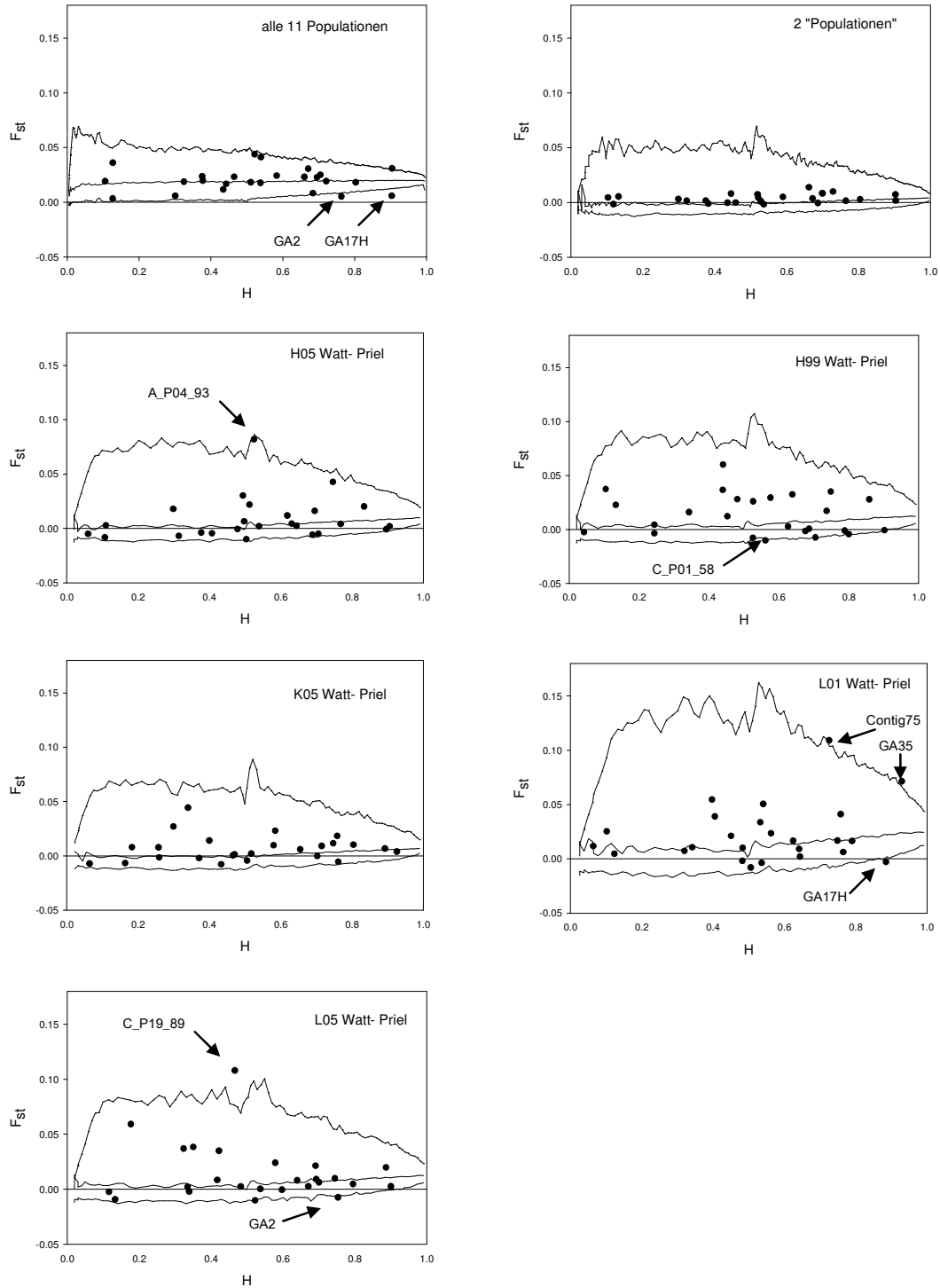
Die Differenzierung der einzelnen Loci wurde zuerst in einer explorativen Analyse mit einem multivariaten Verfahren untersucht. Datengrundlage waren wiederum die  $F_{st}$ -Werte aus allen fünf Populationsvergleichen mit Habitatkontrast. Mittels einer Principal Component Analysis (PCoA) wurde eine grafische Darstellung der Lage aller 25 Loci in den zwei durch die ersten beiden Hauptkomponenten definierten Dimensionen erstellt (vgl. Abb.7). In dieser Darstellung fällt kein Locus als extremer Ausreißer auf.



**Abb. 7:** Lage aller 25 Loci im Raum, der durch die zwei ersten Hauptkomponenten der PCoA definiert ist, welche zusammen 43,7 % der gesamten Varianz abdecken.

Die Methode von Beaumont und Nichols, welche ein Gleichgewicht zwischen Drift und Mutation voraussetzt und Migration zwischen den Populationen einschließt, identifizierte einige Loci, deren Verhalten nicht mit selektionsneutralen Mustern übereinstimmte. In den einzelnen Vergleichen von Populationen wurden unterschiedliche Loci als Ausreißer identifiziert (vgl. Abb.8), wenn sie außerhalb des 95%-Intervalls (gebildet durch die 0,025- und die 0,975-Quantile der simulierten Verteilung) lagen und p-Werte größer als 0,975 oder kleiner als 0,025 aufwiesen.

Aufgrund einer Simulation, die von der Betrachtung aller elf Populationen ausging, konnten zwei Ausreißer identifiziert werden. GA2 (anonym) mit einem p-Wert von 0,0019 lag ebenso wie GA17H (anonym) mit einem p-Wert von 0,00003 niedriger als die simulierte Verteilung. In den einzelnen Vergleichen mit Habitatkontrast wurden folgende weitere Ausreißer identifiziert: Im Vergleich H05 Watt- Priel lag A\_P04\_93 (gekoppeltes Gen: violette saure Phosphatase) nur knapp unterhalb der Obergrenze der Verteilung ( $p=0,971$ ) und ist möglicherweise noch als Kandidat für einen Ausreißer- Locus anzusehen. Im Vergleich H99 Watt-Priel wies der Locus



**Abb. 8:** Identifizierung von Mikrosatelliten mit Abweichungen von der Selektionsneutralität mit dem Modell von Beaumont und Nichols. Auf Grundlage der gewichteten Mittel der  $F_{st}$ -Werte simulierte neutrale Verteilungen (Linien markieren 0,025-Quantile, 0,5-Quantile und 0,975-Quantile) und tatsächlich aufgetretene  $F_{st}$ -Werte aller 25 Loci (Punkte) in verschiedenen Standortvergleichen. Pfeile markieren auffällige Loci.

C\_P01\_58 (Gen: vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase) einen p-Wert von 0,00001 auf, ist also laut Modell ein Ausreißer, allerdings liegen sowohl die erwartete 0,025-Quantile als auch der tatsächlich aufgetretene Wert des Locus im negativen Bereich. Zur Interpretation dieser Tatsache wird auf die Diskussion verwiesen. Im Vergleich K05 Watt-Priel wurden keine Ausreißer identifiziert. Bei der Betrachtung des Vergleichs L01 Watt-Priel zeigten die Loci GA 35 (anonym,  $p=0,977$ ) und GA 17H (anonym,  $p=0,0081$ ) auffälliges Verhalten, wobei letzterer wiederum im negativen Bereich lag. Der Locus Contig75 (Gen: Aquaporin,  $p=0,968$ ) lag nah an der oberen Grenze der erwarteten Verteilung. Im Vergleich L05 Watt-Priel lag C\_P19\_89 (Gen: hypothetisches Protein) deutlich oberhalb der simulierten Verteilung ( $p=0,9902$ ) und GA2 (anonym) unterhalb ( $p=0,0031$ ), aber erneut im negativen Bereich.

Anschließende Simulationen mit denselben Einstellungen, aber unter der Voraussetzung des Stepwise Mutation Models, bestätigten den Ausreißer-Status aller identifizierten Loci außer GA2 in L05W/P. Die Loci zeigten ebenfalls signifikante Abweichungen von der modifizierten Simulation.

Eine spezielle Simulation sollte die Fragestellung in einem fallkontrollierten Design untersuchen. Dazu wurden die drei Watt- sowie die drei Prielpopulationen aus dem Jahr 2005 zu zwei ‚Populationen‘ zusammengefasst. Allerdings konnte aufgrund der von diesen Ausgangsbedingungen erstellten Simulation kein Ausreißer identifiziert werden, alle Loci lagen nahe des Median innerhalb der 95%- Grenzen der simulierten Verteilung (vgl. Abb.8).

Da das Wissen um den Vergleich, in dem ein Locus als Ausreißer auffällt, noch nicht belegt, in welcher der zwei Populationen der Locus ein von den anderen Loci abweichendes Verhalten zeigt, wurden zusätzliche Simulationen zur näheren Untersuchung des stärksten Ausreißers C\_P19\_89 durchgeführt. Ein Vergleich von L05 Watt mit H05 Watt zeigte, dass C\_P19\_89 sich hier von einem neutralen Locus nicht unterscheidet. Im Vergleich von L05 Priel mit K05 Priel konnte zum wiederholten Male ein selektionsneutrales Verhalten dieses Locus abgelehnt werden. Hiernach zeigt C\_P19\_89 in der Prielpopulation von L05 eine höhere Differenzierung als aufgrund neutraler Modelle zu erwarten wäre.

Insgesamt wurden somit mit dem Modell von Beaumont nur zwei Loci unter vermutlich disruptiver Selektion nachgewiesen, C\_P19\_89 (Gen: hypothetisches Protein) und GA35 (anonym), die höhere  $F_{st}$ -Werte als erwartet zeigten. C\_P19\_89 liegt auch außerhalb des strengeren 99%-Vertrauensintervalls, welches anstelle einer Bonferroni-Korrektur verwendet wird, GA 35 jedoch nicht.

Andere Ergebnisse zeigte dagegen das ausschließlich auf der Wirkung genetischer Drift basierende Modell von Vitalis *et al.*, welches Migration zwischen den Populationen nicht berücksichtigt. Die Methode von Vitalis führte zur Identifizierung von weitaus mehr Ausreißern (vgl. Tabelle 6), so dass bei dieser Methode nur das strengere 99%-Kriterium statt eines 95%-Kriteriums angewandt wurde, mit welchem immer noch deutlich mehr Ausreißer als mit der vorangegangenen Methode ermittelt wurden. Im Durchschnitt waren dies pro Populationsvergleich mit Habitatkontrast 6,8 Ausreißer. Eine Untersuchung von 4 Populationspaaren ohne Habitatkontrast wurde ebenfalls durchgeführt, die zusammengestellten Paare waren H05 Watt-L01 Watt, H05 Priel-L01 Priel, H99 Watt-K05 Watt, H99 Priel-L05 Priel. Es handelt sich somit um vier unabhängige Vergleiche, die ein Szenario mit anderem erwarteten Ergebnis darstellen. Im Durchschnitt wurden in diesen Vergleichen 6,5 Ausreißer pro Vergleich identifiziert, was keinen signifikanten Unterschied zu den Paaren mit Habitatkontrast bedeutet (t-Test,  $p=0,77$ ).

**Tabelle 6:** Nach der Methode von Vitalis *et al.* mit dem Programm DetSel in fünf Habitatvergleichen identifizierte Ausreißer, die außerhalb des 99%- Konfidenzintervalls lagen

Populations-Vergleich	H05 Watt-Priel	H99 Watt-Priel	L01 Watt-Priel	L05 Watt-Priel	K05 Watt-Priel
identifizierte	C_P19_66	A_P04_37	C_P19_66	C_P19_66	C_P19_66
Ausreißer	A_P04_93	C_P06_73	Contig213	C_P02_23	Contig213
	A_P04_37	C_P07_28	Contig75	C_P19_89	C_P06_73
	C_P07_28	GA20	A_P04_37	C_P01_58	C_P07_28
	C_P01_58	GA16	C_P07_28	GA12	C_P01_58
	GA20		GA12	GA20	GA12
			GA16	GA16	GA20
					GA17D
					GA16
					GA1
Anzahl	6	5	6	7	10

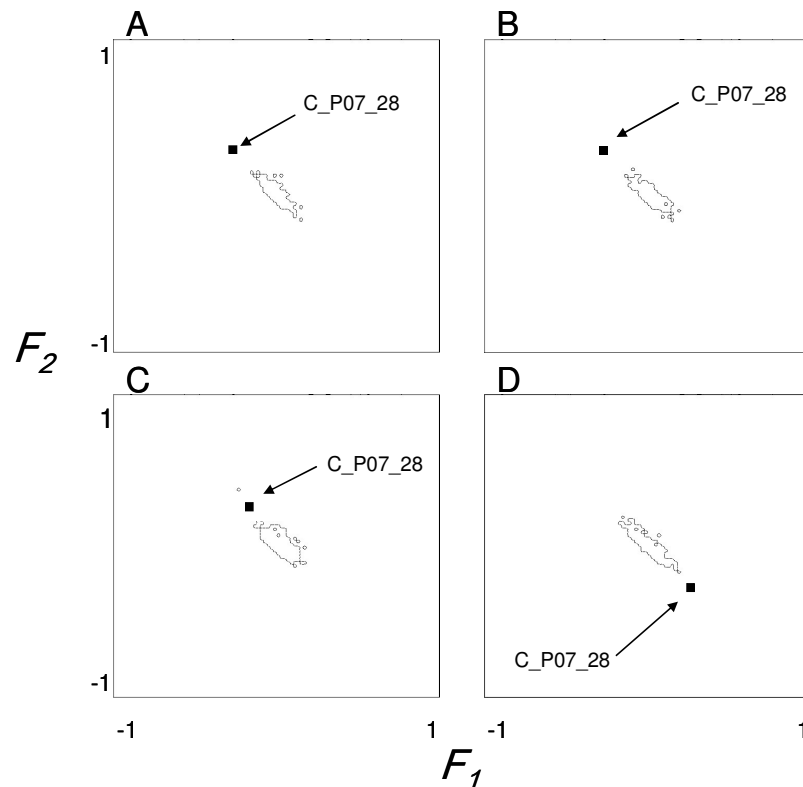
Es wurden in den Vergleichen mit Habitatkontrast zehn gengekoppelte und fünf anonyme Mikrosatelliten als Ausreißer identifiziert, in den Vergleichen ohne Habitatkontrast 9 gengekoppelte und 4 anonyme.

Da einige Loci in mehreren unabhängigen Vergleichen als Ausreißer auftraten, wurden in den Vergleichen mit Habitatkontrast insgesamt 34 Ausreißer ermittelt (vgl. Tabelle 6), davon 22 gengekoppelte Mikrosatelliten und zwölf anonyme. Gengekoppelte Mikrosatelliten sind nicht signifikant häufiger als Ausreißer identifiziert worden als anonyme Mikrosatelliten (Chi-Quadrat-Test,  $p=0,31$ ). In den Vergleichen ohne Habitatkontrast waren 20 von 26 Ausreißern gengekoppelte Mikrosatelliten, gengekoppelte Mikrosatelliten sind dort signifikant häufiger als anonyme Mikrosatelliten als Ausreißer ermittelt worden (Chi-Quadrat-Test,  $p=0,032$ ).

Besonders häufig als Ausreißer identifiziert wurden in den Vergleichen mit Habitatkontrast die Loci C\_P19\_66 (Gen: saure Phosphatase), C\_P07\_28 (Gen: Nodulin, vgl. Abb.9) und GA20 (anonym), welche jeweils viermal in insgesamt fünf Vergleichen ermittelt wurden, sowie A\_P04\_37 (Gen: Defensin), GA16 (anonym) und C\_P01\_58 (Gen: vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase), die jeweils dreimal auftraten. Zur Überprüfung, ob dies eine ungewöhnliche Häufung darstellt, oder auch durch eine zufällige Ziehung entstehen kann, wurde die Wahrscheinlichkeit des Ereignisses (‘In fünf Vergleichen mit je 6, 5, 6, 7, und 10 Treffern sind drei von 25 Loci viermal aufgetreten’) durch ein Resampling mit 20 000 zufälligen Ziehungen berechnet.

Die Wahrscheinlichkeit war  $p=0,0065$ , es kann also mit 0,65-prozentiger Fehlerwahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass das Ereignis nicht zufällig entstanden ist. Im Gegensatz dazu sind in den Populationsvergleichen ohne Habitatkontrast drei Loci, A\_P04\_37 (Gen: Defensin), C\_P19\_66 (Gen: saure Phosphatase) und C\_P02\_23 (Gen: Lipid-Transfer-Protein), in drei von vier Vergleichen als Ausreißer identifiziert worden, sechs weitere Loci (A\_P04\_93 (Gen: violette saure Phosphatase), Contig213 (Gen: unbekanntes Protein), C\_P01\_58 (Gen: vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase), C\_P19\_89 (Gen: hypothetisches Protein), GA12 (anonym) und GA16 (anonym)) wurden zweimal ermittelt. Die Wahrscheinlichkeit für ein solches Ergebnis ist mit  $p=0,12$  deutlich größer, und es kann nicht mit einer akzeptablen Fehlerwahrscheinlichkeit (unter 5 %) ausgeschlossen werden,

dass das Ereignis durch einen Zufall auftritt. Somit ist zwar die absolute Zahl von Ausreißern in Vergleichen mit und ohne Ausreißer nicht unterschiedlich, dafür ist aber die Identität der einzelnen Ausreißer bei den Vergleichen mit Habitatkontrast wesentlich konsistenter als bei den Vergleichen ohne Habitatkontrast.



**Abb. 9:** Beispiel für einen Locus (C\_P07\_28), der in vier unabhängigen Populationsvergleichen (A: H05W/P, B:H99W/P, C: L01W/P, D: K05W/P) mit der Methode von Vitalis *et al.* als Ausreißer identifiziert wird.  $F_1$  und  $F_2$  sind Parameter der Populations-Differenzierung. Die durchgezogene Linie markiert den Bereich, in dem 99% der simulierten Datenpunkte liegen, jeweils bestimmt von der Zahl der Allele  $k$ , wobei in den abgebildeten Fällen  $k=5$  ist.

Auch bei der Methode von Vitalis wurden die drei Watt- und die drei Prielpopulationen aus dem Jahr 2005 in zwei ‚Populationen‘ zusammengestellt, und die in diesem Vergleich auftretenden Ausreißer ermittelt. Die Einstellungen wurden entsprechend der veränderten Ausgangsbedingungen angepasst, indem  $N_e$  auf 10 000 und 100 000 erhöht wurde und  $T_0$  auf 100, 500 und 1000 gesetzt wurde. Allerdings hatten diese Modifikationen keine wesentlichen Auswirkungen auf die simulierten

Verteilungen. Während bei der Methode von Beaumont in einem solchen Test keine Ausreißer gefunden wurden, identifizierte die zweite Methode auch in diesem Vergleich acht Ausreißer (C\_P19\_66, Contig213, A\_P04\_37, C\_P02\_23, C\_P06\_73, C\_P07\_28, GA12, GA20). Alle acht Loci waren bereits in Einzelvergleichen als Ausreißer aufgetreten.



---

## 4 Diskussion

### 4.1 Genetische Differenzierung der Seegras-Populationen

In meiner Studie wurden meines Wissens zum ersten Mal EST-Mikrosatelliten von marinen Blütenpflanzen in einem ‚Genome Scan‘ verwendet. Die Untersuchung von elf Seegraspopulationen im Nordfriesischen Wattenmeer zeigte eine insgesamt geringe genetische Differenzierung. Obwohl meine Analyse mit insgesamt 25 Loci und einer Gesamtzahl von 255 Allelen eine erhebliche statistische Trennschärfe aufwies, reichte die vorhandene Differenzierung nicht aus, um alle elf Populationen voneinander trennen zu können (Bayesian Analyse mit STRUCTURE). Besonders ähnlich war die genetische Zusammensetzung der Populationen Langeneß 01 Priel, Hooge 05 Watt und Hooge 05 Priel. Aber auch die anderen Populationen überlappten in den von STRUCTURE gebildeten Clustern vielfach, so dass insgesamt nur fünf Cluster erkannt wurden, die sich jeweils aus Individuen mehrerer Einzelpopulationen zusammensetzten. Obwohl die Autoren von STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) anmerken, dass die genaue Zahl der Cluster unter ökologischen Aspekten streng zu prüfen ist, stellt das Ergebnis einen deutlichen Hinweis dar, dass die elf Einzelpopulationen nur bedingt als genetisch eigenständig anzusehen sind.

Bestätigt wurde dies durch die  $F_{st}$ -Werte, welche über sämtliche 25 Loci ermittelt wurden. Zwischen einzelnen Populationen konnte keine Differenzierung festgestellt werden, was sich in negativen  $F_{st}$ -Werten widerspiegelte. Negative  $F_{st}$ -Werte können auftreten, wenn die Differenzierung innerhalb der Populationen die Differenzierung zwischen den Populationen übersteigt. Allerdings wurde im direkten Vergleich der Populationen eines Paares, also bei den fünf wichtigsten Habitatvergleichen, nur einmal ein nicht signifikanter  $F_{st}$ -Wert (im Vergleich K05 Watt/K05 Priel) ermittelt. Das heißt, die für die weiteren Analysen relevanten Populationspaare waren bis auf eines ausreichend differenziert, wenn auch die  $F_{st}$ -Werte sehr niedrig waren.

Die geringe Differenzierung stellte somit kein Problem für die Durchführung des ‚Genome Scans‘ dar. In anderen Studien konnten trotz ähnlich geringer  $F_{st}$ -Werte in einzelnen Vergleichen ( $F_{st}$  zwischen 0,02 und 0,1) Ausreißer unter den untersuchten Loci ermittelt werden (Wilding *et al.* 2001; Vasemagi *et al.* 2005a). Darüber hinaus vertreten zahlreiche Autoren die Ansicht, dass der Vergleich eng verwandter Populationen die Effizienz eines ‚Genome Scans‘ sogar erhöhen kann, weil Spuren der Selektion nicht so leicht von Mutationen verschleiert werden und zufällige Drift einen verminderten Einfluss auf die Parameter hat, die der Identifizierung von Ausreißern zugrunde liegen (Beaumont und Nichols 1996; Vitalis *et al.* 2001; Schlotterer 2002a).

Mit Hilfe der Vergleichsdaten aus früheren Jahren wurde bestätigt, dass sich die Populationen durch den Habitatkontrast nicht in dem Ausmaß differenziert hatten wie erhofft. Die zeitlichen Schwankungen der genetischen Differenzierung im Falle der Beprobung desselben Ortes (Langeneß, Hooge) im Abstand von vier bis sechs Jahren lagen in derselben Größenordnung wie die Unterschiede zwischen kontrastierenden Habitaten. Da die Differenzierung (durch  $F_{st}$ -Werte belegt) über alle 25 Loci in den Vergleichen mit Habitatkontrast nicht größer war als in den Vergleichen ohne Habitatkontrast, kann nicht beantwortet werden, ob Einflüsse der verschiedenen Habitate zu genetischen Veränderungen geführt haben. Dem entsprechend gibt es keinen Beleg dafür, dass sich die Populationen desselben Habitattyps untereinander genetisch ähnlicher waren als Populationen kontrastierender Habitate (‚Habitateneffekt‘). In einer vergleichbaren Studie von Wilding *et al.* (2001) konnten die Autoren dagegen zeigen, dass die genetische Differenzierung von *Littorina*-Populationen zwischen unterschiedlichen Habitaten signifikant größer war als zwischen gleichen Habitaten.

Im Vergleich der sechs Orte, an denen die beprobten Populationen vorkamen, konnte ein Anstieg der Differenzierung mit wachsender geografischer Entfernung (Isolation-by-Distance, Wright 1943) gefunden werden. Insgesamt waren geografische und genetische Entfernung zwischen den Populationen also groß genug, um deutliche Unterschiede im Verwandtschaftsgrad erkennen zu können. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen, die eine begrenzte Ausbreitungsfähigkeit von *Z. marina* für eine ausgeprägte

genetische Substrukturierung verantwortlich machen (Hämmerli und Reusch 2003). Es gibt aber auch Belege für eine starke Durchmischung von *Z. marina*- Populationen, die vor allem im Nordfriesischen Wattenmeer auftritt (Reusch *et al.* 2000; Reusch 2002). Einen wichtigen Faktor stellt in diesem Zusammenhang sicherlich die Wasserbewegung durch die Gezeiten der Nordsee dar. Migration durch schwimmenden Pollen oder befruchtete Samen ist als unwahrscheinlich anzusehen (Orth *et al.* 1994; Ruckelshaus 1996) durch abgebrochene befruchtete Blühsprosse aber durchaus möglich (Reusch 2002). Hierbei ist zu beachten, dass schon die Migration weniger Individuen zwischen Populationen ausreicht, um eine Divergenz durch genetische Drift oder schwache Selektion auszugleichen, so dass keine genetischen Unterschiede zwischen den Populationen entstehen (Slatkin 1987; Latta 2004). Dies würde vor allem die sehr geringe Differenzierung der Wattpopulationen von Hallig Hooge und Hallig Langeness erklären. Inwiefern die Priel- Ökosysteme mit den Watt- Ökosystemen verbunden sind und genetischer Austausch zwischen ihnen stattfindet, ist dagegen schwierig abzuschätzen. Es ist aber unwahrscheinlich, dass sich sämtliche untersuchten Populationen erst vor so kurzer Zeit genetisch getrennt haben, dass sich bis heute nur eine geringe Differenzierung durch genetische Drift etabliert hat.

In meiner Untersuchung wurde deutlich, dass ein Distanzeffekt erst mit größerer Entfernung (etwa ab 50 km) der Einzelpopulationen auftritt, und dass die Populationen im nordfriesischen Wattenmeer zur Untersuchung genetischer Differenzierung erst ab solchen Distanzen geeignet sind. Demnach ist bei meiner Untersuchung nur die genetische Entfernung zwischen den geografisch weit entfernt liegenden Populationen besonders groß, nicht jedoch zwischen den Populationen in kontrastierenden Habitaten. In aktuellen Studien von Wilding *et al.* (2001) und Johannesson *et al.* (2004) mit *Littorina*-Arten konnte der Habitateffekt dagegen deutlich herausgearbeitet werden, obwohl der Effekt der geografischen Entfernung zumindest zum Teil für das Muster der genetischen Differenzierung verantwortlich war. Der Habitateffekt wurde in diesen Studien zum großen Teil vom Einfluss einzelner Loci bestimmt, die eventuell unter gerichteter Selektion standen. Da in meiner Studie nur wenige Loci ein leicht von der Neutralität abweichendes Verhalten

zeigten (siehe 4.3 Identifizierung von Ausreißer-Loci), kann ein fehlender Habitateffekt durch das Fehlen extremer Ausreißer begründet sein.

## **4.2 Vergleich anonymer und gekoppelter Mikrosatelliten**

In meiner Untersuchung war das Verhalten von anonymen und gekoppelten Mikrosatelliten in Bezug auf die Abschätzung der Populationsdifferenzierung nicht zu unterscheiden. Lediglich beim Vergleich von Populationen desselben Standorts in unterschiedlichen Jahren zeigte sich, dass gekoppelte Mikrosatelliten eine größere Differenzierung aufwiesen als anonyme. Da diese Vergleiche allerdings nicht den gewünschten Habitatkontrast widerspiegeln, ist dieses Ergebnis nicht leicht zu interpretieren. Eine während des betrachteten Zeitraums aufgetretene Umweltveränderung könnte ein solches Ergebnis erklären. Ein daraus folgender ‚selective sweep‘, das heißt, die Fixierung von vorteilhaften Allelen (Schlötterer 2003), hätte eine reduzierte Variabilität an den betroffenen Loci zur Folge. Ein solcher ‚selective sweep‘ könnte in unserem Fall auf zwei Weisen zu dem gefundenen Muster führen: Entweder hat an einem anonymen Locus der ‚sweep‘ in allen Populationen stattgefunden, oder an einem gekoppelten Locus in einer oder mehreren, aber nicht allen Populationen. Diese Erklärung ist wahrscheinlicher als das zufällige Auftreten dieses Musters durch genetische Drift.

Bei der Betrachtung der Vergleiche mit Habitatkontrast aus dem Jahr 2005 zeigte sich ein Trend zu höheren  $F_{st}$ -Werten gekoppelter Mikrosatelliten verglichen mit Werten anonymer Mikrosatelliten. Dieser Trend bedarf jedoch weiterer Unterstützung durch zusätzliche Daten. Darüber hinaus ist ein gleichartiges Verhalten beider Markertypen nicht unbedingt verwunderlich. In dem Fall, dass sie unter Selektion stehen, können gekoppelte Marker sowohl erhöhte  $F_{st}$ -Werte aufgrund von gerichteter Selektion in einzelnen Populationen aufweisen, als auch erniedrigte  $F_{st}$ -Werte aufgrund balancierender Selektion. Daher muss das zu erwartende Mittel der  $F_{st}$ -Werte bei anonymen Mikrosatelliten nicht zwangsläufig niedriger liegen als bei gekoppelten Mikrosatelliten. Außerdem ist die Betrachtung mittlerer

Differenzierungen eine sehr grobe Schätzung, da per definitionem ein bis zwei echte Ausreißer (bei 25 untersuchten Loci) im Mittelwert untergehen. Auf diese Weise können tatsächlich vorhandene Signale, wie etwa Spuren von selektiven Einflüssen, in Mittelwerten versteckt werden, wenn diese Signale nicht an übermäßig vielen Loci auftreten.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in aktuellen Studien gefunden (Chabane *et al.* 2005; Vasemagi *et al.* 2005b; Xie *et al.* 2006). Von gegensätzlichen Ergebnissen berichten Akey *et al.* (2002), die beim Menschen niedrigere  $F_{st}$ -Werte bei SNPs in codierenden Regionen fanden als in nichtcodierenden Regionen. Dies wird als ein Hinweis für bereinigende Selektion gewertet, die auf codierende Regionen einwirkt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Nicot *et al.* (2004), welche bei EST-Mikrosatelliten in Weizen geringere Polymorphismen als bei anonymen Mikrosatelliten feststellten, Woodhead *et al.* (2005) und Coulibaly *et al.* (2005), die gleiches bei Farnen bzw. Salmoniden untersuchten.

Darüber hinaus könnten auch die unterschiedlichen Mutationsraten von Di-, Tri- und Tetranukleotidmikrosatelliten (Chakraborty *et al.* 1997) Auswirkungen auf die Analyse gehabt haben. Dass Dinukleotidmikrosatelliten häufiger mutieren und sich somit schneller verändern als andere Typen von Mikrosatelliten, wurde in zahlreichen Studien beobachtet (Kayser *et al.* 2003; Casa *et al.* 2005; Chabane *et al.* 2005). So könnte in unserer Studie die Divergenz der anonymen Mikrosatelliten, welche ausschließlich Dinukleotide waren, im Gegensatz zu der der gelinkten Mikrosatelliten, unter denen auch Tri- und Tetranukleotide vorhanden waren, erhöht sein. Dieser Effekt könnte in meiner Studie eine tatsächlich vorhandene größere Differenzierung der gekoppelten Mikrosatelliten überdecken.

Die Verwendung von Mikrosatelliten zur Suche nach Loci unter Selektion ist im Prinzip empfehlenswert. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass Mikrosatelliten nicht in jedem Fall die neutralen Marker darstellen, für die sie gehalten werden. Es ist bekannt, dass sie als Transkriptionsregler wirken und die Expression von Genen beeinflussen können (Li *et al.* 2004). Welche Konsequenzen speziell Mutationen an Mikrosatelliten haben, die in räumlicher Nähe von Genen liegen, kann derzeit noch nicht abgeschätzt werden. Es ist möglich, dass solche Funktionen das

Verhalten von EST- und anonymen Mikrosatelliten weit mehr beeinflussen als bisher angenommen. Dieser Effekt könnte das Ergebnis meines Vergleichs von anonymen und gekoppelten Markern beeinflussen.

Kayser *et al.* (2003) fassen zusammen, dass das Ausmaß, zu dem ein an ein unter Selektion stehendes Gen gekoppelter Mikrosatellit eine auffällig hohe genetische Divergenz zeigt, von verschiedensten Faktoren abhängt. Genannt seien hier neben der Stärke der Selektion und der Mutationsrate des Markers die seit dem selektiven Ereignis verstrichene Zeit und das Ausmaß der Rekombination zwischen Markerlocus und selektiertem Gen. Auch diese Faktoren beeinflussen möglicherweise das Ergebnis meines Vergleichs, da diese Faktoren bei den 14 gekoppelten Loci maßgeblichen Einfluss nehmen können.

### **4.3 Identifizierung von Mikrosatelliten-Loci unter Selektion**

In meiner Untersuchung wurde erstmals in drei parallelen Populationspaaren derselbe Habitatkontrast mit einem ‚Genome Scan‘-Ansatz untersucht. Die drei parallelen Ansätze dienten als übergeordnete Replikate der Ausgangshypothese und sollten den Kandidaten-Status von Ausreißern festigen, indem diese idealerweise in mehreren Vergleichen identifiziert werden sollten. Ein derartiges Studiendesign, kombiniert mit der Verwendung zweier verschiedener Modelle, stellt einen viel versprechenden Ansatz zur Identifizierung von Ausreißern dar (Vasemagi und Pimmer 2005c). In einer ähnlichen Weise wurde nur von Wilding *et al.* (2001) die genetische Differenzierung von *Littorina littorea* in mehreren Habitatvergleichen untersucht. Campbell und Bernatchez (2004) führten Untersuchungen an vier sympatrischen Paaren von Maränenpopulationen mit unterschiedlichen Ökotypen durch. Auch Vasemägi *et al.* (2005a) verglichen die genetische Variabilität an zahlreichen Loci bei Salmoniden aus unterschiedlichen Habitaten, diese Vergleiche waren jedoch statistisch nicht unabhängig voneinander.

Trotz dieses neuartigen Versuchsdesigns konnte ich insgesamt nur ein relativ schwaches Signal divergierender Selektion an einem (Methode von

Beaumont und Nichols) bzw. drei (Methode von Vitalis *et al.*) gekoppelten Mikrosatelliten-Loci feststellen. Das Modell von Beaumont und Nichols konnte unter den beschriebenen Umständen nur wenige Ausreißer identifizieren. Allerdings sind die von den Autoren empfohlenen Mindestanforderungen von über 20 Loci und mehr als zehn Populationen erfüllt gewesen. Das Modell scheint allgemein gut zu funktionieren, wenn der Selektionskoeffizient fünfmal größer ist als die Mutationsrate (Beaumont und Balding 2004). Ob diese Voraussetzung in unseren Populationen vorhanden war, lässt sich leider nicht beantworten. Ein zu geringer Selektionsdruck führt somit zur Nicht-Identifizierung von Ausreißern. Außerdem kommt eine geringe Sensitivität des Modells bei genetisch wenig differenzierten Populationen als Ursache für die geringe Detektionsfähigkeit des Modells infrage (Beaumont und Balding 2004). Nur zwei Loci zeigten eine größere Divergenz als unter simulierten neutralen Bedingungen, und diese wichen auch nicht sehr stark von der simulierten Nullverteilung ab. Es ist zu beachten, dass bei einem Signifikanzniveau von fünf Prozent bei 25 untersuchten Loci allein schon durch den  $\alpha$ -Fehler ein bis zwei Loci fälschlich als Ausreißer identifiziert werden. Der Unterschied zwischen der Zahl der Ausreißer, die bei sich ausschließlich neutral verhaltenden Loci fälschlich identifiziert werden würden, und der Zahl der tatsächlich identifizierten Ausreißer-Loci ist nicht signifikant ( $p=0,49$ ). Bei einem strengeren Signifikanzniveau von  $\alpha=0,01$  ist noch ein Locus, C\_P19\_89, als Ausreißer zu bewerten. Auch dieses Ergebnis ist nicht signifikant ( $p=0,13$ ) verschieden von einer Ausreißer-Identifizierung unter ausschließlich neutralen Loci. Es sind jedoch drei weitere Loci mit von der Neutralität abweichendem Verhalten identifiziert worden, deren Ausreißer-Status später diskutiert wird. Diese Loci eingerechnet, übersteigt die Zahl der identifizierten Loci die unter neutralen Verhältnissen erwartete Annahme unter 5%-Kriterium (fünf Ausreißer,  $p=0,0006$ ) und unter 1%- Kriterium (drei Ausreißer,  $p<0,0001$ ).

Für das Modell von Vitalis stellte die geringe Differenzierung der Populationen dagegen dem Anschein nach keine Schwierigkeit dar. Die große Zahl der identifizierten Ausreißer ist allerdings ebenfalls nicht als realistisch anzusehen. Selbst bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,01$  wurden mit durchschnittlich 6,8 Loci pro Vergleich sehr viele Ausreißer identifiziert.

Sollten alle von diesem Modell identifizierten Ausreißer auch ‚wahre‘ Ausreißer sein, liegt der Anteil von Loci mit aberrantem Verhalten bei über 27 Prozent aller betrachteten Loci (6,8 von 25 Loci). In der Literatur werden meist Anteile zwischen einem und zehn, selten bis zu 15 Prozent (Wilding *et al.* 2001; Luikart *et al.* 2003; Storz und Nachman 2003; Campbell und Bernatchez 2004; Scotti-Saintagne *et al.* 2004; Achere *et al.* 2005) angegeben. Das Modell von Vitalis *et al.* ist außerdem für seine Tendenz bekannt, viele Ausreißer zu benennen (Vasemagi *et al.* 2005a). Dem entsprechend scheint die Schlussfolgerung, dass alle erkannten Ausreißer als Kandidaten für unter Selektionseinflüssen stehende Loci in Frage kommen, zu optimistisch. Als Konsequenz wurden hier nur solche Loci als Kandidaten betrachtet, die in den fünf Habitatvergleichen mindestens drei Mal als Ausreißer identifiziert wurden. Vier Mal aufgetreten sind die Loci C\_P19\_66 (an saure Phosphatase gekoppelt), C\_P07\_28 (an Nodulin gekoppelt) und GA20 (anonym); drei Mal traten A\_P04\_37 (an Defensin gekoppelt), C\_P01\_58 (an vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase gekoppelt) und GA16 (anonym) auf. Dieses Vorgehen wird neben den Entwicklern des Modells auch von anderen Autoren empfohlen (Vasemagi *et al.* 2005a). Die stärksten Kandidaten sind folglich drei Loci, welche in vier Replikaten auffälliges Verhalten zeigten.

Eine weitere Schwierigkeit trat bei der Auswertung der Simulationen des Modells von Beaumont und Nichols auf. Einige Loci (C\_P01\_58, GA17H, GA2) zeigten in Einzelvergleichen deutlich niedrigere  $F_{st}$ -Werte als durch das Modell vorhergesagt. Im Prinzip sollten diese als Kandidaten für unter balancierender Selektion stehende Loci betrachtet werden. Allerdings ist diese Schlussfolgerung problematisch, da bei den genannten Loci auch die untere Grenze des 95%-Vertrauensintervalls im negativen Bereich lag. Ein negativer  $F_{st}$ -Wert sollte im Prinzip gar nicht auftreten, da eine genetische Differenzierung zwischen Populationen formal nicht negativ sein kann und daher nur bis auf Null absinken kann. Die Frage, ob ein negativer Wert, der niedriger ist als ein anderer negativer Wert, den Schluss auf ein eventuelles Ausreißerverhalten zulässt, kann nicht zufrieden stellend beantwortet werden (M. Beaumont, pers. Mitteilung). Der Parameter  $F_{st}$  ist in diesem Fall aufgrund der geringen Differenzierung zwischen den Einzelpopulationen und aufgrund seiner zunehmenden Ungenauigkeit unter diesen Umständen (Raufaste und



Bonhomme 2000) nicht mehr in der Lage, die Verhältnisse genau genug aufzulösen. Folglich wurden die Loci, auf die die beschriebene Situation zutrifft, im Weiteren nicht als Kandidaten behandelt. Es ist allerdings möglich, dass die von ihnen gezeigte geringe Differenzierung die Einwirkung balancierender Selektion widerspiegelt. Zwei der erwähnten Loci, GA2 und GA17H, zeigen auch in der Betrachtung aller elf Populationen im Vergleich zur Simulation niedrigere  $F_{st}$ -Werte als vorausgesagt. Dort liegen die  $F_{st}$ -Werte von Loci und Simulation allerdings im positiven Bereich, was auf balancierende Selektion bei diesen zwei Loci hinweist. Vorsicht bei der Interpretation ist dennoch geboten, da das Modell von Beaumont und Nichols erwiesenermaßen Schwierigkeiten bei der Identifizierung von Loci unter balancierender Selektion zeigt (Beaumont und Balding 2004).

Kohn *et al.* (2003) verwendeten ein fallkontrolliertes Design bei der Analyse von zahlreichen Rattenpopulationen, indem sie die Individuen in zwei Fallgruppen (mit bzw. ohne ein bestimmtes Merkmal) aufteilten. Dieses Vorgehen führte zur besseren Identifizierung von Ausreißer-Loci als ein Design, bei dem die Individuen in Gruppen, die den Populationen entsprachen, aufgeteilt wurden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen verbesserte ein fallkontrolliertes Design (Merkmal ‚Watt-Phänotyp‘ gegenüber Merkmal ‚Priel-Phänotyp‘) in meiner Untersuchung die erzielten Ergebnisse nicht. Die beiden Gruppen wurden wie zwei große Populationen behandelt und mit beiden Modellen untersucht. Mit dem Modell von Beaumont und Nichols zeigte kein Locus von den Erwartungen abweichende  $F_{st}$ -Werte, sondern alle Loci lagen nahe des Median der Simulation. Dies ist mit den Schwierigkeiten zu erklären, die das Modell mit der Ausreißer- Identifizierung bei geringer Differenzierung der Populationen zeigt. Der Großteil der auftretenden Differenzierung befand sich bei diesem Ansatz zwischen den Individuen innerhalb der Populationen und nicht zwischen den Populationen. Dies machte es dem Modell anscheinend unmöglich, abweichendes Verhalten einzelner Loci zu identifizieren.

Dagegen identifizierte das Modell von Vitalis *et al.* bei einem ‚Zwei Populationen- Design‘ etwa so viele Ausreißer wie in den einzelnen Vergleichen der Habitats. Unter diesen Ausreißern befanden sich auch die drei Loci, die in vier von fünf Einzelvergleichen mit Habitatkontrast als

Ausreißer identifiziert worden waren, und somit als die stärksten Kandidaten gelten. Wiederum schien dieses Modell trotz geringer Differenzierung in der Lage, Loci mit aberrantem Verhalten zu erkennen. Allerdings trat nur einer von drei Loci, die zuvor drei Mal identifiziert worden waren, in der Analyse mit zwei großen Populationen auf. Ihr Status als Kandidaten ist somit eher als schwach einzuschätzen.

Eine wachsende Zahl neuerer Studien behauptet, dass divergierende Selektion als der primäre Grund phänotypischer Diversifizierung zu gelten hat, was grundsätzlich dem Konzept Darwins entspricht (Hoekstra *et al.* 2001; Rieseberg *et al.* 2002). Dennoch ist es möglich, dass trotz erheblicher phänotypischer Unterschiede zwischen den beiden *Z. marina*-Formen nur eine geringe genetische Differenzierung stattgefunden hat. In der von uns untersuchten Region besteht in jedem Fall ein hoher genetischer Austausch zwischen den Populationen, was die phänotypischen Unterschiede jedoch offensichtlich nicht auflöst.

Zu diesen Ergebnissen könnte die Tatsache beitragen, dass viele Wasserpflanzen sich durch eine sehr hohe phänotypische Plastizität auszeichnen (Arber 1919; Bradshaw 1973; Sultan 2000; Jensen und Bell 2001; Miner *et al.* 2005), welche auch bei *Zostera* ausgeprägt ist (Rhode und Duffy 2004; Peralta *et al.* 2005). Sowohl vegetative als auch Reproduktionsmerkmale von Wasserpflanzen können von phänotypischer Plastizität betroffen sein, wobei diese abhängig vom Reproduktionsmodus unterschiedlich ausgeprägt sein kann (Dorken und Barrett 2004). Es besteht demnach auch die Möglichkeit, dass die beobachteten morphologischen und die Reproduktion betreffenden Eigenschaften durch plastische Veränderungen ohne genetischen Hintergrund entstanden sind. In diesem Fall wäre es folglich nicht möglich, die durch den Habitatkontrast entstandene Differenzierung mit genetischen Methoden nachzuweisen.

Allerdings ist das Vorhandensein eines definierten morphologischen, ökologischen oder sonstigen Kontrasts für die Durchführung eines ‚Genome Scans‘ auch keine Voraussetzung. Der Großteil aller durchgeführten Scans mit zahlreichen Loci wurde an Populationen durchgeführt, deren ökologische Differenzierung entweder nicht untersucht worden war, oder zumindest nicht den Ausgangspunkt der genetischen Untersuchung darstellte (Akey *et al.*

2002; Payseur *et al.* 2002; Kauer *et al.* 2003; Storz *et al.* 2004; Casa *et al.* 2005 aber siehe Wilding *et al.* 2001; Rogers und Bernatchez 2005). Die Vorgehensweise des ‚Genome Scans‘ zeichnet sich gerade durch einen Bottom-up-Ansatz (Vasemagi und Primmer 2005) aus. Dieser zielt direkt auf Genloci, die Ausreißer-Verhalten zeigen und kann optional um eine funktionelle Komponente erweitert werden, wenn die entsprechenden Informationen über das Genom der Spezies vorliegen. Nur auf diese Weise können Informationen über selektierte Loci mit phänotypischen oder Fitness-Merkmalen in Verbindung gebracht werden, was das längerfristige Ziel der Untersuchung von adaptiven Vorgängen sein sollte (Wright und Gaut 2005). Insofern stellt die Kombination von verschiedenen Habitaten in unserem Fall eine Ergänzung des ‚Genome Scan‘-Ansatzes dar, da die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass Selektion bei der Differenzierung der Populationen mitgewirkt hat. Der ‚Genome Scan‘-Ansatz hätte aber auch unter der Voraussetzung, dass die beobachtete phänotypische Variation ausschließlich auf Plastizität zurückzuführen wäre, zu der Entdeckung von Loci führen können, die möglicherweise durch Selektion beeinflusst worden sind.

Es besteht darüber hinaus sicherlich die Möglichkeit, dass genetische Veränderungen mit dem von uns durchgeführten Scan nicht erfasst wurden, weil die Stichprobe der 25 untersuchten Loci zu klein war. Besonders die Wahrscheinlichkeit, mit den verwendeten 14 EST-Mikrosatelliten gerade die Gene zu untersuchen, die tatsächlich mit den beobachteten phänotypischen Veränderungen in Zusammenhang stehen, ist als gering einzustufen. Erschwerend kommt hinzu, dass so genannte ‚Fitness traits‘, also die Eigenschaften, die den Erfolg eines Individuums in seiner Umwelt beeinflussen, erwiesenermaßen eine komplizierte genetische Architektur besitzen (Merila und Sheldon 1999 und Referenzen). Als solche ‚Fitness traits‘ können zumindest die Anpassungen des Reproduktionsmodus der zwei Formen betrachtet werden.

Hoekstra und Nachman (2003) entdeckten, dass für die parallele Evolution von adaptivem Melanismus bei Taschenmäusen (*Chaetodipus* sp.) gänzlich verschiedene Genloci verantwortlich sein können. Die unabhängige Evolution von mehreren Allelen, die mit einer frühen Blütezeit in Verbindung stehen, wurde von Olsen *et al.* (2004) bei *Arabidopsis* nachgewiesen. Insofern stellt

selbst das parallele Auftreten desselben phänotypischen Merkmals noch keine Garantie für dieselbe genetische Basis dar. Ganz allgemein geht man heute davon aus, dass die meisten der phänotypisch erkennbaren Eigenschaften von Individuen unter polygener Kontrolle stehen (z.B. Jansen 1996). Dies ist schon früher als großes Hindernis für die Erforschung der Verknüpfung von genetischen Merkmalen und phänotypischer Ausprägung erkannt worden (z.B. Storz 2005). LeCorre und Kremer (2003) belegten durch umfangreiche Simulationen, dass sich nur eine geringe Anzahl der Genloci, die zu einer Eigenschaft beitragen, tatsächlich wie Ausreißer verhält, während sich die anderen wie neutrale Marker verhalten, obwohl sie mit einer Eigenschaft in Verbindung stehen, die unter Selektion steht. Erschwerend kommt hinzu, dass definierte ökologische Anpassungen der Lebensgeschichte von Pflanzen, wie etwa der Zeitpunkt der Blüte, durch pleiotrope Gene beeinflusst werden, die ebenfalls Auswirkungen auf andere Eigenschaften haben, wie an Modellorganismen bewiesen wurde (McKay *et al.* 2003). Auch die Expression eines einzelnen Gens kann über die Regulation anderer Gene einen neuen Phänotyp hervorrufen (White 2001). Die Suche nach den Spuren selektiver Einflüsse wird durch die Abhängigkeit der Fitness eines Allels vom genetischen Hintergrund des Organismus weiter verkompliziert. Dies bedeutet, dass die Antwort eines Individuums auf Selektionsdruck aufgrund von epistatischen Effekten von anderen Genen, die das Individuum besitzt, abhängen kann (Ungerer *et al.* 2003). Lexer und Fay (2005) weisen zudem darauf hin, dass zwischen Adaptation an konstante und vorhersehbare Umweltbedingungen und solcher an seltene, schlecht vorhersehbare oder zyklische Stressfaktoren unterschieden werden muss. Der Weg von den gewonnen Erkenntnissen über die genetische Basis der Adaptation von Arten bis zum völligen Verständnis dieser Vorgänge ist demnach noch weit.

Trotz der genannten Schwierigkeiten liefern meine Ergebnisse ermutigende Erkenntnisse zur Verwendung von 'Genome Scans' zur Untersuchung von Selektion in natürlichen Populationen. EST-Mikrosatelliten können nach meiner Einschätzung ohne Einwände zur Abschätzung der Differenzierung von Populationen verwendet werden. Da sie sich in unserer Studie nicht anders als anonyme Mikrosatelliten verhielten, scheint ihre Verwendung für

populationsgenetische und systematische Analysen möglich zu sein. Der Anteil unter den versuchsweise aus EST-Sequenzen entwickelten Mikrosatelliten, der polymorph war und korrekt amplifiziert wurde, war sehr hoch. EST-Sequenzen stellen somit eine wertvolle Quelle für die Entwicklung von Mikrosatelliten dar. Dass die Chance höher ist, unter EST-Mikrosatelliten Kandidaten für Loci unter Selektion zu finden als unter anonymen, kann meine Studie nicht belegen. Eventuell vorhandene Ausreißer werden im Mittelwert untergehen, wenn sie relativ selten sind und nicht mehr als fünf bis zehn Prozent der Loci stellen. Allerdings gibt es in der Literatur durchaus Stimmen, die EST-Mikrosatelliten als besser geeignet ansehen, um Loci unter Selektion zu entdecken, als herkömmliche, anonyme Mikrosatelliten (z.B. Vasemagi *et al.* 2005a). Der größte Vorteil von gekoppelten Mikrosatelliten liegt sicher darin, dass die zugehörigen Gene, die von selektiven Prozessen beeinflusst sind, für uns direkt erkenntlich sind.

Mit Hilfe des ‚Genome Scans‘ konnten einige Gene, die als Kandidaten für unter Selektion stehende Loci betrachtet werden, identifiziert werden. Mit dem Modell von Beaumont und Nichols wurden zwei Loci, C\_P19\_89 und GA35, als Ausreißer identifiziert, die eine größere Divergenz als unter neutralen Annahmen vorhergesagt aufwiesen, was dem Einfluss positiver, gerichteter Selektion entsprechen würde. Von diesen zwei Loci ist einer ein EST-Mikrosatellit. Der Mikrosatellit C\_P19\_89 ist an das Gen eines Proteins mit unbekannter Funktion gekoppelt. Weitere Erkenntnisse zur Funktion des Proteins könnten darüber Aufschluss geben, ob eine Verbindung zwischen den in den verschiedenen Habitaten beobachteten Umweltbedingungen und dem Vorkommen des Gens wahrscheinlich ist.

Unter den drei stärksten Kandidaten, die mit der Methode von Vitalis *et al.* identifiziert wurden, sind zwei gekoppelte Mikrosatelliten. Das Gen, an welches der Mikrosatellit C\_P19\_66 gekoppelt ist, codiert für eine saure Phosphatase, ein Protein, das vielfältige Aufgaben im Stoffwechsel und in der Informationsweitergabe übernimmt. Die Veränderungen an diesem Gen stehen möglicherweise mit physiologischen Anpassungen an veränderte Umweltbedingungen in Verbindung. Ein besonders interessanter Kandidat ist der Locus C\_P07\_28, der an das Gen eines Nodulins gekoppelt ist. Noduline gehören zu der Gruppe der Aquaporine. Diese Proteine bilden Wasserkanäle

in Zellmembranen und spielen im Wasserhaushalt von Pflanzen eine wichtige Rolle (Maurel 1997). Sie scheinen in beinahe allen untersuchten Pflanzen vorzukommen, existieren in verschiedenen Isoformen und sind sie bei vielen physiologischen Vorgängen in fast allen Lebensformen von großer Bedeutung. Aquaporine treten in Abhängigkeit von verschiedenen Regulationsmechanismen in unterschiedlicher Dichte auf, was Pflanzen die Anpassung an Stressfaktoren wie Trockenheit oder hohe Salinität ermöglicht und die Reaktion auf tageszeitlichen Schwankungen zulässt (Luu und Maurel 2005). Noduline wurden erstmals in den Knöllchen der Wurzeln bei Leguminosen entdeckt, sie werden von den Pflanzen als Reaktion auf die symbiotische Verbindung mit Knöllchenbakterien exprimiert. Über die Funktion von Nodulinen bei Nicht-Leguminosen ist bislang wenig bekannt (Luu und Maurel 2005).

Eine zukünftige Erweiterung des ‚Genome Scan‘-Ansatzes bei *Zostera marina* ist in hohem Maße wünschenswert. Die Spezies hat sich für die Untersuchung mit Mikrosatelliten als sehr gut geeignet erwiesen. Außerdem ist die Verwendung von Spezies, die (noch) keine Modellorganismen sind, für die Erforschung von selektiven Vorgängen unter natürlichen Bedingungen auf jeden Fall vorzuziehen. Für Fragestellungen, die auf das Erkennen von ökologischen Zusammenhängen abzielen, ist *Z. marina* vor allem deshalb geeignet, weil vom Bestand dieser ‚Schlüsselart‘ ein ganzes Ökosystem abhängt. Erkenntnisse über die Auswirkungen selektiver Einflüsse sind somit von unmittelbarer ökologischer Relevanz. Mit ähnlichen Untersuchungen kann der Frage nachgegangen werden, welche genetischen Merkmale einer Population es ihr ermöglichen, auf definierte Habitatveränderungen und damit verbundene Selektionsdrücke mit der entsprechenden Anpassung zu reagieren. Auch für das ‚Conservation Management‘ ökologisch bedeutsamer Spezies sind unter anderem Informationen über die Anpassung von Populationen an ihre Umwelt von Bedeutung. So könnten beispielsweise zur Auffrischung von bedrohten oder genetisch verarmten Populationen mit Hilfe von genetischen Markern Stammpopulationen identifiziert werden, welche an die vorliegenden Umweltbedingungen angepasst sind oder das Potenzial zur Anpassung besitzen.



## 5 Zusammenfassung

Natürliche Selektion wird als der Schlüsselprozess der Evolution betrachtet und trägt maßgeblich zur Anpassung von Arten an ihre Umwelt bei. Während Selektion auf der Ebene des Phänotyps unzählige Male nachgewiesen wurde, ist die Frage nach der genetischen Basis selektiver Prozesse immer noch zu großen Teilen ungeklärt. Im Zentrum der modernen Evolutionsbiologie steht deshalb die Frage, wie Genotyp und Phänotyp ursächlich zusammenhängen. Molekulargenetische Techniken ermöglichen es uns heute, genetische Marker zur Suche nach Selektion zu verwenden. Marker, die räumlich nahe bestimmter Gene liegen, spiegeln die durch Selektion entstandenen Veränderungen dieser Gene wieder. Beim ‚Genome Scanning‘ werden zahlreiche Genloci in verschiedenen Populationen untersucht. Das Ziel ist, Unterschiede in der Populations-Differenzierung verschiedener Loci zu ermitteln. Loci, die von der Neutralität abweichendes Verhalten aufweisen, werden als Kandidaten für Loci unter Selektion identifiziert.

Ich entwickelte erstmals in einer marinen Blütenpflanze, dem großen Seegrass *Zostera marina*, 14 EST-Mikrosatelliten und kombinierte diese einem ‚Genome Scan‘ mit 11 anonyme Mikrosatelliten. Während anonyme Mikrosatelliten zufällig im Genom verstreut liegen, sind EST-Mikrosatelliten eng an bekannte Gene gekoppelt.

Ich untersuchte drei *Z. marina*-Populationspaare, deren Standorte sehr unterschiedliche Umweltbedingungen aufwiesen. Der Habitatkontrast hatte erkennbare Auswirkungen auf morphologische Eigenschaften und Life-History-Traits der Pflanzen, eventuelle genetische Unterschiede sollten mit Hilfe des ‚Genome Scans‘ erfasst werden. In diesem neuartigen Versuchsdesign, das drei Replikate des Versuchsansatzes beinhaltete, identifizierte ich Loci mit von der Neutralität abweichendem Verhalten mittels zweier verschiedener Methoden. Die beiden verwendeten Modelle gehen von verschiedenen Voraussetzungen aus und identifizieren daher unterschiedliche Loci als Kandidaten für Loci unter Selektion. Außerdem untersuchte ich, ob sich anonyme und gekoppelte Mikrosatelliten im Ausmaß ihrer Populationsdifferenzierung unterschieden.



Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei *Z. marina* kein Unterschied im Verhalten von gekoppelten und anonymen Mikrosatelliten auftritt. EST-Mikrosatelliten zeigten weder eine geringere noch eine stärkere Differenzierung als anonyme Mikrosatelliten und wurden auch nicht häufiger als Kandidaten für Loci unter Selektion identifiziert.

Ich konnte zwei anonyme und drei gekoppelte Mikrosatelliten identifizieren, deren Verhalten nicht mit der Selektionsneutralität übereinstimmte. Von den drei gekoppelten Mikrosatelliten war einer an eine saure Phosphatase gekoppelt, ein Locus lag nahe bei dem Gen eines unbekanntes Proteins. Der interessanteste Kandidat für einen Locus unter Selektion ist der Mikrosatellit C\_P07\_28, welcher an das Gen eines Nodulins gekoppelt ist. Noduline sind Proteine aus der Gruppe der Aquaporine, welche Wasserkanäle in Zellmembranen bilden. Es ist wahrscheinlich, dass die divergierende Selektion, die zu der Differenzierung an diesem Locus geführt hat, in Zusammenhang mit dem Wasserhaushalt von *Z. marina* steht.

Meine Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe von ‚Genome Scans‘ die genetischen Hintergründe ökologischer Anpassungen beleuchtet werden können. Da ‚Genome Scans‘ verwendet werden können, um Gene zu identifizieren, die bei der Anpassung natürlicher Populationen eine Rolle spielen, sind sie ein wertvolles Mittel für das Management ökologisch wertvoller oder bedrohter Arten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achere, V., J. M. Favre, et al. (2005). "Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*)." *Molecular Ecology* **14**(10): 3191-3201.
- Akey, J. M., G. Zhang, et al. (2002). "Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection." *Genome Research* **12**(12): 1805-1814.
- Alberto, F., L. Correia, et al. (2003). "Isolation and characterization of microsatellite markers for the seagrass *Cymodocea nodosa*." *Molecular Ecology Notes* **3**(3): 397-399.
- Aquadro, C. F., V. B. DuMont, et al. (2001). "Genome-wide variation in the human and fruitfly: a comparison." *Current Opinion in Genetics & Development* **11**(6): 627-634.
- Arber, A. (1919). "On heterophylly in water plants." *American Naturalist* **53**: 272-278.
- Barton, N. H. (2000). "Genetic hitchhiking." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **355**(1403): 1553-1562.
- Beaumont, M. A. and D. J. Balding (2004). "Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans." *Molecular Ecology* **13**(4): 969-980.
- Beaumont, M. A. and R. A. Nichols (1996). "Evaluating Loci for Use in the Genetic Analysis of Population Structure." *Proceedings: Biological Sciences* **263**(1377): 1619-1626.
- Bowcock, A. M., J. R. Kidd, et al. (1991). "Drift, Admixture, and Selection in Human-Evolution - a Study with DNA Polymorphisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(3): 839-843.
- Bradshaw, A. D. (1973). "Environment and Phenotypic Plasticity." *Brookhaven Symposia in Biology*(25): 75-94.
- Campbell, D. and L. Bernatchez (2004). "Genomic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes." *Molecular Biology and Evolution* **21**(5): 945-956.
- Casa, A. M., S. E. Mitchell, et al. (2005). "Diversity and selection in sorghum: simultaneous analyses using simple sequence repeats." *Theoretical and Applied Genetics* **111**(1): 23-30.
- Cavalli-Sforza, L. (1966). "Population structure and human evolution." *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **164**: 362-379.
- Chabane, K., G. A. Ablett, et al. (2005). "EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley." *Genetic Resources and Crop Evolution* **52**(7): 903-909.
- Chakraborty, R., M. Kimmel, et al. (1997). "Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(3): 1041-1046.

- Clarke, K. R. (1993). "Nonparametric Multivariate Analyses of Changes in Community Structure." Australian Journal of Ecology **18**(1): 117-143.
- Cockerham, C. C. and B. S. Weir (1993). "Estimation of Gene Flow from F-Statistics." Evolution **47**(3): 855-863.
- Coulibaly, I., K. Gharbi, et al. (2005). "Characterization and comparison of microsatellites derived from repeat-enriched libraries and expressed sequence tags." Animal Genetics **36**(4): 309-315.
- Coyer, J. A., O. E. Diekmann, et al. (2004). "Population genetics of dwarf eelgrass *Zostera noltii* throughout its biogeographic range." Marine Ecology-Progress Series **281**: 51-62.
- Darwin, C. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of favored races in the struggle for life. London, Murray.
- den Hartog, C. (1970). "The seagrasses of the world." Verhandlingen Koninklijk Nederlandse Akademie Wetenschappen Afdeling Natuurkunde II **59**: 1-275.
- Dieringer, D. and C. Schlötterer (2003). "MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets." Molecular Ecology Notes **3**(1): 167-169.
- Dorken, M. E. and S. C. H. Barrett (2004). "Phenotypic plasticity of vegetative and reproductive traits in monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae): a clonal aquatic plant." Journal of Ecology **92**(1): 32-44.
- Eanes, W. F. (1987). "Allozymes and Fitness - Evolution of a Problem." Trends in Ecology & Evolution **2**(2): 44-48.
- Ellegren, H. (2000). "Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference." Trends in Genetics **16**(12): 551-558.
- Feder, M. E. and T. Mitchell-Olds (2003). "Evolutionary and ecological functional genomics." Nature Reviews Genetics **4**(8): 651-657.
- Flint, J., J. Bond, et al. (1999). "Minisatellite mutational processes reduce F-st estimates." Human Genetics **105**(6): 567-576.
- Ford (2002). "Applications of selective neutrality tests to molecular ecology." Molecular Ecology **11**(8): 1245-1262.
- Gagnon, P. S., R. L. Vadas, et al. (1980). "Genetic Identity of Annual and Perennial Forms of *Zostera-Marina* L." Aquatic Botany **8**(2): 157-162.
- Hämmerli, A. and T. B. H. Reusch (2003). "Genetic neighbourhood of clone structures in eelgrass meadows quantified by spatial autocorrelation of microsatellite markers." Heredity **91**(5): 448-455.
- Harr, B., M. Kauer, et al. (2003). "Hitchhiking mapping: A population-based fine-mapping strategy for adaptive mutations in *Drosophila melanogaster* (vol 99, pg 12949, 2002)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(5): 3004-3004.
- Hemminga, M. and C. Duarte (2000). Seagrass Ecology. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hemminga, M. A., B. P. Koutstaal, et al. (1994). "The Nitrogen Supply to Intertidal Eelgrass (*Zostera-Marina*)." Marine Biology **118**(2): 223-227.
- Hoekstra, H. E., J. M. Hoekstra, et al. (2001). "Strength and tempo of directional selection in the wild." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(16): 9157-9160.

- Hoekstra, H. E. and M. W. Nachman (2003). "Different genes underlie adaptive melanism in different populations of rock pocket mice." Molecular Ecology **12**(5): 1185-1194.
- Hofmann, G. E., J. L. Burnaford, et al. (2005). "Genomics-fueled approaches to current challenges in marine ecology." Trends in Ecology & Evolution **20**(6): 305-311.
- Jackson, R. B., C. R. Linder, et al. (2002). "Linking molecular insight and ecological research." Trends in Ecology & Evolution **17**(9): 409-414.
- Jansen, R. C. (1996). "Complex plant traits: Time for polygenic analysis." Trends in Plant Science **1**(3): 89-94.
- Jensen, S. and S. Bell (2001). "Seagrass growth and patch dynamics: cross-scale morphological plasticity." Plant Ecology **155**(2): 201-217.
- Johannesson, K., J. Lundberg, et al. (2004). "Island isolation and habitat heterogeneity correlate with DNA variation in a marine snail (*Littorina saxatilis*)." Biological Journal of the Linnean Society **82**(3): 377-384.
- Kauer, M. O., D. Dieringer, et al. (2003). "A microsatellite variability screen for positive selection associated with the "Out of Africa" habitat expansion of *Drosophila melanogaster*." Genetics **165**(3): 1137-1148.
- Kayser, M., S. Brauer, et al. (2003). "A genome scan to detect candidate regions influenced by local natural selection in human populations." Molecular Biology and Evolution **20**(6): 893-900.
- Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge, Cambridge University Press.
- Kohn, M. H., H.-J. Pelz, et al. (2000). "Natural selection mapping of the warfarin-resistance gene." PNAS **97**(14): 7911-7915.
- Kohn, M. H., H.-J. Pelz, et al. (2003). "Locus-Specific Genetic Differentiation at R<sub>w</sub> Among Warfarin-Resistant Rat (*Rattus norvegicus*) Populations." Genetics **164**(3): 1055-1070.
- Latta, R. G. (2004). "Gene flow, adaptive population divergence and comparative population structure across loci." New Phytologist **161**(1): 51-58.
- Laushman, R. H. (1993). "Population-Genetics of Hydrophilous Angiosperms." Aquatic Botany **44**(2-3): 147-158.
- Le Corre, V. and A. Kremer (2003). "Genetic Variability at Neutral Markers, Quantitative Trait Loci and Trait in a Subdivided Population Under Selection" Genetics **164**(3): 1205-1219.
- Lewontin, R. C. and J. Krakauer (1973). "Distribution of Gene Frequency as a Test of Theory of Selective Neutrality of Polymorphisms." Genetics **74**(1): 175-195.
- Lexer, C. and M. F. Fay (2005). "Adaptation to environmental stress: a rare or frequent driver of speciation?" Journal of Evolutionary Biology **18**(4): 893-900.
- Lexer, C., M. F. Fay, et al. (2005). "Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression." Molecular Ecology **14**(4): 1045-1057.
- Li, Y. C., A. B. Korol, et al. (2004). "Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution." Molecular Biology and Evolution **21**(6): 991-1007.

- Luikart, G., P. R. England, et al. (2003). "The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing." Nature Reviews Genetics **4**(12): 981-994.
- Luu, D.-T. and C. Maurel (2005). "Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status." Plant, Cell and Environment **28**(1): 85-96.
- Maurel, C. (1997). "Aquaporins and water permeability of plant membranes." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 399-429.
- McKay, J. K. and R. G. Latta (2002). "Adaptive population divergence: markers, QTL and traits." Trends in Ecology & Evolution **17**(6): 285-291.
- McKay, J. K., J. H. Richards, et al. (2003). "Genetics of drought adaptation in *Arabidopsis thaliana*: I. Pleiotropy contributes to genetic correlations among ecological traits." Molecular Ecology **12**(5): 1137-1151.
- Merila, J. and B. C. Sheldon (1999). "Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas." Heredity **83**(2): 103-109.
- Michalakis, Y. and L. Excoffier (1996). "A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci." Genetics **142**(3): 1061-1064.
- Miner, B. G., S. E. Sultan, et al. (2005). "Ecological consequences of phenotypic plasticity." Trends in Ecology & Evolution **20**(12): 685-692.
- Moran, M. D. (2003). "Arguments for rejecting the sequential Bonferroni in ecological studies." Oikos **100**(2): 403-405.
- Moran, P. (2002). "Current conservation genetics: building an ecological approach to the synthesis of molecular and quantitative genetic methods." Ecology of Freshwater Fish **11**(1): 30-55.
- Nicot, N., V. Chiquet, et al. (2004). "Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs)." Theoretical and Applied Genetics **109**(4): 800-805.
- Olsen, J. L., W. T. Stam, et al. (2004). "North Atlantic phylogeography and large-scale population differentiation of the seagrass *Zostera marina* L." Molecular Ecology **13**(7): 1923-1941.
- Olsen, K. M., S. S. Halldorsdottir, et al. (2004). "Linkage disequilibrium mapping of *Arabidopsis* CRY2 flowering time alleles." Genetics **167**(3): 1361-1369.
- Orr, H. A. (2005). "The genetic theory of adaptation: A brief history." Nature Reviews Genetics **6**(2): 119-127.
- Orth, R. J., M. Luckenbach, et al. (1994). "Seed Dispersal in a Marine Macrophyte - Implications for Colonization and Restoration." Ecology **75**(7): 1927-1939.
- Payseur, B. A., A. D. Cutter, et al. (2002). "Searching for Evidence of Positive Selection in the Human Genome Using Patterns of Microsatellite Variability." Mol Biol Evol **19**(7): 1143-1153.
- Pedersen, M. F. and J. Borum (1993). "An Annual Nitrogen Budget for a Seagrass *Zostera-Marina* Population." Marine Ecology-Progress Series **101**(1-2): 169-177.

- Peralta, G., F. G. Brun, et al. (2005). "Morphometric variations as acclimation mechanisms in *Zostera noltii* beds." Estuarine Coastal and Shelf Science **64**(2-3): 347-356.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, et al. (2000). "Inference of population structure using multilocus genotype data." Genetics **155**(2): 945-959.
- Procaccini, G. and L. Mazzella (1998). "Population genetic structure and gene flow in the seagrass *Posidonia oceanica* assessed using microsatellite analysis." Marine Ecology-Progress Series **169**: 133-141.
- Raufaste, N. and F. Bonhomme (2000). "Properties of bias and variance of two multiallelic estimators of F-ST." Theoretical Population Biology **57**(3): 285-296.
- Reise, K. (2000). "Vorkommen von Grünalgen und Seegras im Nationalpark Schleswig-Holsteinisches Wattenmeer." Bericht im Auftrag des Landesamtes für den Nationalpark.
- Reise, K., E. Herre, et al. (1989). "Historical Changes in the Benthos of the Wadden Sea around the Island of Sylt in the North-Sea." Helgolander Meeresuntersuchungen **43**(3-4): 417-433.
- Reusch, T. B. H. (2000). "Five microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* and a test of cross-species amplification in *Z. noltii* and *Z. japonica*." Molecular Ecology **9**(3): 371-373.
- Reusch, T. B. H. (2001). "New markers - old questions: population genetics of seagrasses." Marine Ecology-Progress Series **211**: 261-274.
- Reusch, T. B. H. (2002). "Microsatellites reveal high population connectivity in eelgrass (*Zostera marina*) in two contrasting coastal areas." Limnology and Oceanography **47**(1): 78-85.
- Reusch, T. B. H., W. Hukriede, et al. (1999b). "Differentiating between clonal growth and limited gene flow using spatial autocorrelation of microsatellites." Heredity **83**: 120-126.
- Reusch, T. B. H., W. T. Stam, et al. (1999a). "Microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations." Molecular Ecology **8**(2): 317-321.
- Reusch, T. B. H., W. T. Stam, et al. (2000). "A microsatellite-based estimation of clonal diversity and population subdivision in *Zostera marina*, a marine flowering plant." Molecular Ecology **9**(2): 127-140.
- Rhode, J. M. and J. E. Duffy (2004). "Relationships between bed age, bed size, and genetic structure in Chesapeake Bay (Virginia, USA) eelgrass (*Zostera marina* L.)." Conservation Genetics **5**(5): 661-671.
- Rienzo, A., A. Peterson, et al. (1994). "Mutational Processes of Simple-Sequence Repeat Loci in Human Populations." PNAS **91**(8): 3166-3170.
- Rieseberg, L. H., A. Widmer, et al. (2002). "Directional selection is the primary cause of phenotypic diversification." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(19): 12242-12245.
- Robertson, A. (1975). "Gene Frequency Distributions as a test of Selective Neutrality" Genetics **81**(4): 775-785.
- Rogers, S. M. and L. Bernatchez (2005). "Integrating QTL mapping and genome scans towards the characterization of candidate loci under

- parallel selection in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*)."  
Molecular Ecology **14**(2): 351-361.
- Rozen, S., and H.J. Skaletsky (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Totowa, N.J., Humana Press.
- Ruckelshaus, M. H. (1996). "Estimation of genetic neighborhood parameters from pollen and seed dispersal in the marine angiosperm *Zostera marina* L." Evolution **50**(2): 856-864.
- Schanz, Polte, et al. (2002). "Cascading effects of hydrodynamics on an epiphyte-grazer system in intertidal seagrass beds of the Wadden Sea." Marine Biology **141**(2): 287-297.
- Schlötterer, C. (2000). "Evolutionary dynamics of microsatellite DNA." Chromosoma **109**(6): 365-371.
- Schlötterer, C. (2002a). "A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps." Genetics **160**(2): 753-763.
- Schlötterer, C. (2002a). "A microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps." Genetics **160**(2): 753-763.
- Schlötterer, C. (2003). "Hitchhiking mapping - functional genomics from the population genetics perspective." Trends in Genetics **19**(1): 32-38.
- Schlötterer, C. (2004). "The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?" Nature Reviews Genetics **5**(1): 63-69.
- Scotti-Saintagne, C., S. Mariette, et al. (2004). "Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl." Genetics **168**(3): 1615-1626.
- Slatkin, M. (1987). "Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations." Science **236**(4803): 787-792.
- Slatkin, M. and W. P. Maddison (1990). "Detecting Isolation by Distance Using Phylogenies of Genes." Genetics **126**(1): 249-260.
- Smith, J. M. and J. Haigh (1974). "Hitch-Hiking Effect of a Favorable Gene." Genetical Research **23**(1): 23-35.
- Storz, J. F. (2005). "Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence." Molecular Ecology **14**(3): 671-688.
- Storz, J. F. and J. M. Dubach (2004). "Natural selection drives altitudinal divergence at the albumin locus in deer mice, *Peromyscus maniculatus*." Evolution **58**(6): 1342-1352.
- Storz, J. F. and M. W. Nachman (2003). "Natural selection on protein polymorphism in the rodent genus *Peromyscus*: Evidence from interlocus contrasts." Evolution **57**(11): 2628-2635.
- Storz, J. F., B. A. Payseur, et al. (2004). "Genome scans of DNA variability in humans reveal evidence for selective sweeps outside of Africa." Molecular Biology and Evolution **21**(9): 1800-1811.
- Sultan, S. E. (2000). "Phenotypic plasticity for plant development, function and life history." Trends in Plant Science **5**(12): 537-542.
- Ungerer, M. C., C. R. Linder, et al. (2003). "Effects of genetic background on response to selection in experimental populations of *Arabidopsis thaliana*." Genetics **163**(1): 277-286.
- van Tienderen, P. H., A. A. de Haan, et al. (2002). "Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits." Trends in Ecology & Evolution **17**(12): 577-582.

- Vasemägi, A., R. Gross, et al. (2005b). "Analysis of gene associated tandem repeat markers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations: implications for restoration and conservation in the Baltic Sea." Conservation Genetics **6**(3): 385-397.
- Vasemägi, A., J. Nilsson, et al. (2005a). "Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Molecular Biology and Evolution **22**(4): 1067-1076.
- Vasemägi, A. and C. R. Primmer (2005). "Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies." Molecular Ecology **14**(12): 3623-3642.
- Vasemägi, A. and C. R. Primmer (2005c). "Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies." Molecular Ecology **14**(12): 3623-3642.
- Vigouroux, Y., M. McMullen, et al. (2002). "Identifying genes of agronomic importance in maize by screening microsatellites for evidence of selection during domestication." PNAS **99**(15): 9650-9655.
- Vitalis, R., K. Dawson, et al. (2001). "Interpretation of Variation Across Marker Loci as Evidence of Selection." Genetics **158**(4): 1811-1823.
- Vitalis, R., K. Dawson, et al. (2003). "DetSel 1.0: A computer program to detect markers responding to selection." Journal of Heredity **94**(5): 429-431.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham (1984). "Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure." Evolution **38**(6): 1358-1370.
- White, K. P. (2001). "Functional genomics and the study of development, variation and evolution." Nature Reviews Genetics **2**(7): 528-537.
- Wilding, C. S., R. K. Butlin, et al. (2001). "Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers." Journal of Evolutionary Biology **14**(4): 611-619.
- Woodhead, M., J. Russell, et al. (2005). "Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions." Molecular Ecology **14**(6): 1681-1695.
- Wootton, J. C., X. R. Feng, et al. (2002). "Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*." Nature **418**(6895): 320-323.
- Wright, S. (1943). "Isolation by distance." Genetics **28**(2): 114-138.
- Wright, S. (1951). "The Genetical Structure of Populations." Annals of Eugenics **15**(4): 323-354.
- Wright, S. I. and B. S. Gaut (2005). "Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants (vol 22, pg 506, 2005)." Molecular Biology and Evolution **22**(4): 1158-1158.
- Xie, H., Y. Sui, et al. (2006). "SSR allelic variation in almond (*Prunus dulcis* Mill.)." Theoretical and Applied Genetics **112**(2): 366-372.



## 7 Anhang

PCR-Protokolle (jeweils 9 µl Reaktionsansatz plus 1 µl DNA-Template)

**,4er'**

	per react.	no.	µl total
10xbuffer	1,00	110	110
dNTPs	1,00	110	110
1% BSA	1,00	110	110
MgCl <sub>2</sub> (Inv.)	0,30	110	33
GA-2 F	0,20	110	22
GA-2 R	0,20	110	22
GA-23 F	0,13	110	14,3
GA-23 R	0,13	110	14,3
GA-35 F	0,30	110	33
GA-35 R	0,30	110	33
GA-17H F	0,35	110	38,5
GA-17H R	0,35	110	38,5
Taq (Invitek)	0,05	110	5,5
HPLC-H <sub>2</sub> O	3,69	110	405,9
	9,00		990

3 min denat 94 °C

<b>cycle:</b>	temp	min
denat	94 °C	01:00
anneal	56 °C	01:00
ext	72 °C	01:00
no. of cycles:		26

30 min final ext 72 °C  
4 °C

**,5er'**

	per react.	no.	µl total
Buffer	1	110	110
dNTPs	1	110	110
MgCL2	0,3	110	33
Ga-12-F	0,2	110	22
Ga-12-R	0,2	110	22
Ga-19-F	0,2	110	22
Ga-19-R	0,2	110	22
Ga-20-F	0,6	110	66
Ga-20-R	0,6	110	66
Ga-17-D-F	0,4	110	44
Ga-17-D-R	0,4	110	44
Ga-16-F	0,2	110	22
Ga-16-R	0,2	110	22
BSA 1%	1	110	110
Taq (Invitek)	0,05	110	5,5
HPLC-H <sub>2</sub> O	2,45	110	269,5
	9	110	990

3 min denat 94 °C

<b>cycle:</b>	temp	min
denat	94 °C	01:00
anneal	56 °C	01:00
ext	72 °C	01:00
no. of cycles:		26

30 min final ext 72 °C  
4 °C

**,Pool A'**

	per react.	no.	µl total
10xbuffer	1	110	110
dNTPs	1	110	110
1% BSA	1	110	110
MgCl <sub>2</sub> (Inv.)	0,3	110	33
A_P04_93_F	0,5	110	55
A_P04_93_R	0,5	110	55
Contig213_F	0,25	110	27,5
Contig213_R	0,25	110	27,5
C_P19_17_F	0,4	110	44
C_P19_17_R	0,4	110	44
C_P19_66_F	0,15	110	16,5
C_P19_66_R	0,15	110	16,5
Taq (Invitek)	0,05	110	5,5
HPLC-H <sub>2</sub> O	3,05	110	335,5
	9		990

3 min denat 94 °C

<b>cycle:</b>	temp	min
denat	94 °C	00:40
anneal	56 °C	00:40
ext	72 °C	01:00
no. of cycles:		25

30 min final ext 72 °C  
4 °C

**Pool B'**

	per react.	no.	µl total
10xbuffer	1	110	110
dNTPs	1	110	110
1% BSA	1	110	110
MgCl <sub>2</sub> (Inv.)	0,5	110	55
A_P04_37_F	0,3	110	33
A_P04_37_R	0,3	110	33
Contig_75_F	0,3	110	33
Contig_75_R	0,3	110	33
C_P06_73_F	0,3	110	33
C_P06_73_R	0,3	110	33
Taq (Invitex)	0,1	110	11
HPLC-H <sub>2</sub> O	3,6	110	396
	9		990

3 min denat 94 °C		
cycle 1:	temp	min
denat	94 °C	00:40
		- 0.5° per cycle
anneal	61 °C	00:40
ext	72 °C	01:00
no. of cycles:	10	
cycle 2:		
	94 °C	00:40
	56 °C	00:40
	72 °C	01:00
no. of cycles:	16	
30 min final ext 72 °C		
8 °C		

**Pool C'**

	per react.	no.	µl total
10xbuffer	1	110	110
dNTPs	1	110	110
1% BSA	1	110	110
MgCl <sub>2</sub> (Inv.)	0,3	110	33
C_P19_89_F	0,3	110	33
C_P19_89_R	0,3	110	33
C_P02_23_F	1	110	110
C_P02_23_R	1	110	110
C_P12_75_F	0,3	110	33
C_P12_75_R	0,3	110	33
Contig80_F	0,35	110	38,5
Contig80_R	0,35	110	38,5
Taq (Invitex)	0,05	110	5,5
HPLC-H <sub>2</sub> O	1,75	110	192,5
	9		990

3 min denat 94 °C		
cycle:	temp	min
denat	94 °C	00:40
anneal	56 °C	00:40
ext	72 °C	01:00
no. of cycles:	27	
30 min final ext 72 °C		
4 °C		

**Pool D'**

	per react.	no.	µl total
Quiagen Multiplex Master Mix	6	110	660
C_P13_53_F	0,5	110	55
C_P13_53_R	0,5	110	55
C_P07_28_F	0,5	110	55
C_P07_28_R	0,5	110	55
HPLC-H <sub>2</sub> O	1	110	110
	9		990

10 min denat 96 °C		
cycle:	temp	min
denat	94 °C	00:40
anneal	56 °C	00:40
ext	72 °C	01:00
no. of cycles:	27	
30 min final ext 72 °C		
4 °C		

**Pool D2'**

	per react.	no.	µl total
10xbuffer	1	110	110
dNTPs	1	110	110
1% BSA	1	110	110
MgCl <sub>2</sub> (Inv.)	0,3	110	33
C_P01_58_F	0,2	110	22
C_P01_58_R	0,2	110	22
GA1_F	0,2	110	22
GA1_R	0,2	110	22
GA4_F	0,2	110	22
GA4_R	0,2	110	22
Taq (Invitek)	0,05	110	5,5
HPLC-H <sub>2</sub> O	4,45	110	489,5
	9		990

3 min denat		
94 °C		
cycle:	temp	min
denat	94 °C	00:40
anneal	56 °C	00:40
ext	72 °C	01:00
no. of cycles:	26	
30 min final ext		
72 °C		
4 °C		



## 8 Danksagung

Diese Arbeit ist nur zustande gekommen, weil mir viele Menschen geholfen und beigestanden haben, bei denen ich mich bedanken möchte.

Thorsten Reusch stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Danke für die Unterstützung und Betreuung!

Im Labor halfen mir Ilka Dankert und Silke Carstensen durch das PCR-Massaker und wussten für jedes verzwickte Problem eine Lösung. Danke für unermüdliches Nochmal-Erklären und für die vielen kleinen Hilfestellungen!

Die Statistik hätte mich garantiert geschafft, hätte mich nicht Gisep Rauch durch seine Hilfe wieder auf den richtigen Weg gebracht.

Bei Computerfragen, Programm-Suchen und Resampling-Problemen halfen mir Derk Wachsmuth und Herbert Kiesewetter vom Rechenzentrum stets weiter.

Linda Ippers und dem gesamten Team vom Aldabaran-Forschungs- und Medienschip, sowie dem Seegras-Team vom Luisen-Gymnasium in Hamburg danke ich für die Hilfe bei meiner Probennahme im Wattenmeer und für die tolle Zeit.

Andreas Zipperle danke ich dafür, dass er mir meine noch fehlenden Seegrasproben sammelte und zuschickte, so dass ich mir eine Reise sparen konnte.

Der Schutzstation Wattenmeer danke ich für die unproblematische Unterkunft und Jule, Johanna, Meike, Bernhard und Conny für die Unterstützung beim Seegras-Sammeln.

Professor Lampert danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Meiner Büronachbarin und Beraterin in allen Lebensfragen Nina, Sascha und Birte danke ich für ihre Freundschaft und die Hilfe bei unzähligen kleinen und größeren Schwierigkeiten.

Meiner Familie und Carsten danke ich dafür, dass sie mich in jeder Situation unterstützen und einfach immer für mich da sind.

Vielen Dank Euch allen!



## 9 Stellungnahme

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mit der Einstellung dieser Arbeit in die Fachbibliothek des Biologiezentrums sowie in die Zentralbibliothek der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bin ich einverstanden.

Kiel, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Katharina Oetjen