

**Genetische Diversität  
als Basis für den Artenschutz am Beispiel  
der Krebschere (*Stratiotes aloides* L.)  
mit Schwerpunkt auf Wien und Niederösterreich**

Agnes Steyrer, Bakk. techn. (Matrikelnr.: 0740796)

Studium: Agrarbiologie (459)



**MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplomingenieurin (Dipl. Ing.)

an der Universität für Bodenkultur

**Betreuung:** Univ.Prof. Dipl.Geograph. Dr. Karl Georg Bernhardt

Zweitbetreuer: Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. Steffen Hameister

**Institut für Botanik (H831)**

Vorstand: Univ.Prof. Dipl.Geograph. Dr. Karl Georg Bernhardt



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Danksagung</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Kurzfassung</b> .....	<b>VII</b>
<b>Schlagwörter</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Keywords</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Beschreibung des Untersuchungsobjektes</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Die Fortpflanzungsbiologie der Krebschere .....	2
1.1.2 Der Jahreszyklus der Krebschere .....	4
<b>1.2 Vorkommen der Art</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Der Einfluss der Krebschere auf den Lebensraum</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Ziele, Forschungsfragen und Hypothesen</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 Untersuchungsgebiete</b> .....	<b>10</b>
2.1.1 Populationen in Niederösterreich .....	10
2.1.1.1 Obere Placken .....	10
2.1.1.2 Eckartsau .....	10
2.1.1.3 Stopfenreuth .....	11
2.1.2 Population in Wien .....	11
2.1.2.1 Tischwasser .....	11
2.1.2.2 Ölhafen .....	11
2.1.3 Entfernungen zwischen den reproduktiven Beständen in Österreich .....	11
2.1.4 Probensammelstandorte in Deutschland und den Niederlanden .....	12
2.1.5 Weiteres untersuchtes Material .....	13
<b>2.2 Probenahme</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Bisherige Arbeiten zur genetischen Diversität in Stratiotes</b> .....	<b>14</b>
<b>2.4 Versuchsaufbau</b> .....	<b>14</b>
2.4.1 Vorversuch zur Optimierung der DNA-Extraktion .....	14
2.4.2 Mörsern .....	15
2.4.3 DNA-Extraktion .....	15
2.4.4 Kontrolle der Extraktion und RNA-Verdau .....	15

2.4.4.1	Nukleinsäuremessung mittels Nanodrop .....	15
2.4.4.2	RNA-Verdau und Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese .....	16
2.4.5	Anwendung der AFLP Methodik .....	17
2.4.5.1	Restriktion und Ligation .....	18
2.4.5.2	Präselektive Amplifikation .....	20
2.4.5.3	Selektive Amplifikation .....	22
2.4.5.3.1	Aufreinigung der Proben .....	24
2.4.5.3.2	Zugabe des Größenstandards und Auftrennung der Fragmente im Sequencer .....	25
<b>2.5</b>	<b>Auswertung der Proben .....</b>	<b>26</b>
2.5.1	Überprüfung der Roh-Daten (GeneMapper 5) .....	27
2.5.2	Reduktion der Datenmatrix .....	27
2.5.3	Auswertung der Daten (Excel 2010, GenAlEx 6.5, AFLPOP 1.1, TreeCon 1.3, Popgene 1.32) .....	28
2.5.3.1	Vorbereitung der Matrize .....	28
2.5.3.2	Überprüfung der genetischen Diversität .....	29
2.5.3.3	Genetische Differenzierung zwischen den Populationen und Standorten .....	30
2.5.3.4	Herkunftsermittlung für die Gartenhandelsindividuen .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Genetische Diversität .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der AMOVA .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse der Principal Coordinates Analysis (PCoA) .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Ergebnis der PCoA für Österreich .....	34
3.3.2	Ergebnis der PCoA für Österreich, Deutschland und die Niederlande .....	35
3.3.3	Ergebnis der PCoA für die Handelspopulationen .....	36
<b>3.4</b>	<b>Ergebnis der Neighbour-Joining Analyse der Standorte Österreich, Deutschland     und Niederlande .....</b>	<b>36</b>
<b>3.5</b>	<b>Ergebnisse der Allocation und Re-Allocation .....</b>	<b>38</b>
3.5.1	Ergebnis der Re-Allocation für die Individuen der Standorte AT, DE und NL .....	38
3.5.2	Ergebnis der Allocation für die Individuen des Standortes Obere Placken .....	39
3.5.3	Ergebnis der Allocation für die Handelsindividuen .....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der österreichischen Populationen .....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Diskussion der genetischen Diversität .....	40
4.1.2	Diskussion der AMOVA und der PCoA .....	41

4.1.3	Autochthone Herkunft des Bestandes Obere Placken .....	42
4.1.4	Abgeleiteter Folgen für den Naturschutz .....	43
<b>4.2</b>	<b>Vergleich der Standorte Österreich, Deutschland und Niederlande .....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Diskussion der genetischen Diversität.....	44
4.2.2	Diskussion der genetischen Differenzierung (PCoA, Neighbour-Joining, Re-Allocation) ..	45
<b>4.3</b>	<b>Diskussion der Handelsindividuen.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>Methodische Probleme .....</b>	<b>47</b>
4.4.1	Trocknung der Proben mit Silikagel.....	47
4.4.2	Angewendete Extraktionsmethoden .....	47
4.4.3	Verlässlichkeit der Ergebnisse.....	48
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>49</b>
	<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
	<b>Verwendete Manuals .....</b>	<b>IV</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
	<b>Anhang</b>	
<b>1</b>	<b>Probenverwaltung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Labordaten: Nanodrop, Res/Lig, Präsel. PCR, Sel. PCR.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Händisch und maschinell extrahierte Proben: .....</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Auswahl der Proben für den Lauf und Bewertung der Proben .....</b>	<b>8</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
AUT	Österreich
bp	Basenpaare
BP	Buitenpolder
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
CeIU	Cohesive End Ligation Unit
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DO	Donau
EA	Eckartsau
ECORI	Restriktionsendonuklease-Enzym isoliert aus Escherichia coli
ED	Eider
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat
EN	Eider-Niederungen
FAM	6-Carboxyfluorescein (6-FAM)
G	Guanin
GA	Genetic Analyser
GenAIEx	Genetic Analysis in Excel
HD	Handel
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
KB	Kranenburger Bruch
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NED	Farbstoff, keine Angaben, Patent von ABI
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
ÖH	Ölhafen Lobau
OP	Obere Placken
PCoA	Principal Coordinates Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)

PET	Farbstoff, keine Angaben, Patent von ABI
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rcf	Relative Centrifugal Force
rfu	Relative Fluorescent Units
RN	Rhein
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonuclease
SR	Stopfenreuth
T	Thymin
T4-Ligase	DNA-Ligase des T4-Bakteriophagen (kann glatte und überhängende Restriktionsenden verknüpfen)
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TW	Tischwasser
U	Unit
UV	ultraviolett
VIC	Farbstoff, keine Angaben, Patent von ABI
VN	Neukirchen-Vluyn
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

# KURZFASSUNG

Die Kriebsschere (*Stratiotes aloides* L.) ist eine in Österreich heimische Wasserpflanze, deren natürliche Bestände innerhalb ihres Verbreitungsgebietes in Europa stark zurückgegangen sind. In Österreich weist die Art nur noch wenige autochthone Vorkommen auf. Die Kriebsschere steht auf der Liste vom Aussterben bedrohter Pflanzenarten und ist daher streng geschützt.

Mit Hilfe von genetischen Fingerprints (AFLPs) werden im Rahmen dieser Arbeit die genetische Diversität der und eine Differenzierung zwischen den Populationen in Wien (2 Pop.) und Niederösterreich (3 Pop.) ermittelt. Darüber hinaus werden die genetische Diversität und Differenzierung der Art auf einer größeren geografischen Skala untersucht. Hierfür wurden die österreichischen Populationen sowie vier Populationen aus Deutschland und ein Bestand aus den Niederlanden analysiert. Die verwendeten Primerkombinationen lieferten insgesamt 820 Fragmente, welche für die anschließende Berechnung der molekularen Diversität und Populationsdifferenzierung berücksichtigt wurden (PCoA, AMOVA, Re-Allocation, Neighbour-Joining).

Für Österreich zeigen die Ergebnisse von PCoA und Neighbour-Joining keine klare Trennung zwischen den Beständen. Anhand der gewonnenen Daten und im Vergleich mit einer ex-situ Schutzsammlung können die untersuchten Populationen aus Österreich als autochthon angesehen werden. Entgegen unserer Erwartung zeigte eine AMOVA, dass die Variation zwischen den Populationen geringer ist als innerhalb der Populationen. Basierend auf den Untersuchungen scheint die genetische Diversität innerhalb der österreichischen Populationen größer zu sein, als bisher angenommen. Der Vergleich zwischen den Beständen der drei Länder lässt eine deutliche Trennung in die Flusssysteme Rhein/Eider und Donau erkennen. Dies sind wichtige Informationen für weitere Schutzmaßnahmen, um ein effizientes Konzept zum in-situ Schutz sowie zur Förderung der Art im Gebiet der Donauauen in Niederösterreich und der Lobau aufzubauen.

## Schlagwörter

Hydrocharitaceae, AFLPs, molekulare Differenzierung, genetischer Fingerabdruck, Donauau, Rote Liste, autochthon

# ABSTRACT

Watersoldier (*Stratiotes aloides* L.) is a native hydrophyte in Austria, whose natural stands have decreased significantly within its range in Europe. The species only occurs in few autochthone stands in Austria. It is listed as “critically endangered” in the red list of endangered plant species and therefore strictly protected.

This master thesis aims to determinate genetic diversity and differentiation within and among the recent populations in Vienna (2 populations) and Lower Austria (3 populations) by using a genetic fingerprinting method (AFLP). Furthermore genetic diversity and differentiation on a larger scale have been analysed. For this purpose Austrian, German and Dutch populations have been examined. The used primary combinations provided 820 fragments, which were considered for the calculations of molecular diversity and population differentiations (PCoA, AMOVA, Re-Allocation, Neighbour-Joining).

The results of PCoA and Neighbour-Joining show no clear separation between the Austrian populations. By comparing generated data and an ex-situ collection, it is claimed that Austrian populations are relatively autochthonous. Contrary to our expectations an AMOVA showed that within wild populations genetic interpopular variability is lower than intrapopular variability. Based on our examinations genetic diversity within Austrian wild populations seems to be higher than expected. The results of a comparison between populations of the three countries indicate a separation between the river systems Rhine/Eider and Danube. This is important basic information in order to establish an efficient concept for in-situ protection and stimulation of the species of Austria in the remaining areas located in the riparian zones of the river Danube.

## Keywords

Hydrocharitaceae, AFLPs, molecular Differentiation, genetic Fingerprinting, Danube flood plain, Woods, Red List, autochthonous

# 1 EINLEITUNG

Um bedrohte Pflanzenarten nachhaltig vor dem Aussterben zu bewahren, bedarf es mehr als nur der Bewahrung und des Erhalts existierender Individuenbestände. Effektive Maßnahmen, die dem Aussterben von Arten entgegenwirken sollen, benötigen vordefinierte Ziele und ausgearbeitete Konzepte. Die Ziele des Artenschutzes umfassen deshalb den Erhalt und die Förderung innerartlicher genetischer Diversität, den Schutz und die Bereitstellung räumlicher Strukturen, die Aufrechterhaltung und Schaffung eines genetischen Austausches zwischen den Populationen sowie den Erhalt von natürlichen und naturnahen Selektionsmechanismen (ROSENTHAL, 2003). Als Basis für dieses Artenschutzkonzept dient das Wissen über die potenzielle Gefährdung einer Art. In der Botanik gibt die „Rote Liste gefährdeter Pflanzen Österreichs“ (NIKL FELD und GRIMS, 1999) Auskunft über die Gefährdung einer Pflanzenart. Der Erhalt genetischer Variabilität innerhalb einer Art und ihrer Populationen ist Voraussetzung für „die Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umweltbedingungen, die langfristige Evolutionsfähigkeit der Art und die höhere Fitness der Individuen oder Populationen“ (OELKE, 2003, 1). Das Wissen über die vorhandene genetische Vielfalt innerhalb einer Art, einer Population und zwischen Populationen stellt eine wichtige Information für den in-situ und ex-situ Artenschutz und daraus abgeleitete Schutzkonzepte dar (LOESCHCKE et al, 1994).

Die Krebschere (*Stratiotes aloides* L.) ist eine in Österreich heimische Wasserpflanze aus der Familie der Froschbissgewächse (Hydrocharitaceae). Mitte des 19. Jahrhunderts war die Krebschere in Österreich in den Donauauen eine häufige, dichte Bestände bildende, Art (NEILREICH 1846 und REISSEK 1860 zit. nach SCHRATT-EHRENDORFER, 1999). Heute weist die Art nur noch an wenigen Standorten in Österreich autochthone Vorkommen auf. Einige dieser Krebscherengewässer befinden sich in Niederösterreich und Wien in der Lobau und den Donauauen.

Nicht nur in Österreich ist seit einiger Zeit ein deutlicher Rückgang der Art zu verzeichnen. Auch in Nord-West-Deutschland und in den Niederlanden sind die Krebscherebestände deutlich zurückgegangen (SMOLDERS et al., 2003; JORDAN et al., 2010). Die Gründe für eine Abnahme der Populationen sind vielfältig. Die Veränderung hydrologischer Bedingungen durch den Menschen, insbesondere durch die Landwirtschaft, wird als Hauptursache für den Zusammenbruch der Krebscherepopulation angesehen. In den Niederlanden gilt die Eutrophierung, besonders der Eintrag von Sulfaten in die Gewässer, als Schlüsselfaktor für den Rückgang der Art (SMOLDERS et al., 2003). Die Regulierung

von Flüssen und die damit verbundene starke Reduktion der Auendynamik und die Verlandung von Altgewässern werden als Gründe für die Abnahme der Krebscherenbestände angeführt. Auch die Entfernung von, durch Angelnde als störend empfundenen, Krebscherenbeständen aus Fischteichen, ist ein Grund für das Verschwinden einiger Populationen (SCHRATT-EHRENDORFER, 1999; KÜRY, 2009). In Nord-West-Deutschland führte die zur falschen Jahreszeit durchgeführte Räumung und Entfernung von Schlamm aus Gräben mit Krebscherenvorkommen zum Zusammenbruch einiger Populationen (JORDAN et al., 2010).

### 1.1 Beschreibung des Untersuchungsobjektes

Die Krebsschere wird unter den Wasserpflanzen dem Lebensformtyp Rhizophyten und dem Wuchsformtyp Stratiotide zugeteilt (WIEGLEB, 1976 zit. nach SCHRATT-EHRENDORFER, 1999). Im Tertiär und Quartär existierten in Europa mehr als zehn verschiedene Arten der Gattung *Stratiotes*. Heute ist die Krebsschere als einziger Vertreter der Gattung in heimischen Gewässern anzutreffen (BENNIKE und HOEK, 1999).

Die Krebsschere ist eine Rosettenpflanze. Ihre Blätter werden bis zu 40 Zentimeter lang und laufen zum Ende spitz zu. Sie haben eine Breite von ungefähr vier Zentimetern und einen gesägten, stacheligen Rand. Die Art ist ausdauernd und kann einen Durchmesser von bis zu 80 Zentimetern erreichen. (MARKGRAF und ZOLLER; 1981). Die Rhizoiden sind entweder mit dem losen Substratuntergrund verbunden, oder sie hängen frei im Gewässer (COOK und URMI-KÖNIG, 1983). Von Frühling bis Herbst ist die Krebsschere an der Gewässeroberfläche zu finden. Im Herbst taucht die Pflanze ab, um bis zum kommenden Frühjahr am Gewässergrund zu überwintern (MARKGRAF und ZOLLER; 1981).

#### 1.1.1 Die Fortpflanzungsbiologie der Krebsschere



Abbildung 1: Ableger- und Turionbildung bei einer Krebsschere (HUNDLER, 2013)

*Stratiotes aloides* ist eine zweihäusige Art, die sich sowohl generativ als auch vegetativ fortpflanzen kann (MARKGRAF und ZOLLER, 1981). Sie vermehrt sich jedoch größtenteils vegetativ über die Ausbildung von Ablegern und Turionen (KÜRY, 2009). Abbildung 1 zeigt die vegetativen Fortpflanzungsorgane der Krebschere. Links im Bild ist ein Ableger zu sehen, rechts daneben befindet sich ein Turion.

Die sexuelle Reproduktionsphase beginnt mit der Ausbildung der männlichen Blüten meist im Mai (JORDAN et al., 2010). Die männlichen Blüten befinden sich auf einem fünf bis sieben Zentimeter langen Stiel, mit dem sie aus den Hochblättern herausragen. Es können mehrere Blüten pro Pflanze nacheinander zur Blüte kommen (COOK und URMI-KÖNIG, 1983). Die Hauptblütezeit der männlichen Pflanzen erstreckt sich von Anfang Juni bis Juli. Die weiblichen Pflanzen kommen, etwas zeitversetzt zu den männlichen Individuen, Anfang Juni zur Blüte und erreichen im Juli den Blühhöhepunkt (JORDAN et al., 2010). Sie sind kurz gestielt und besitzen einen unterständigen Fruchtknoten. Anders als bei den männlichen Individuen blüht bei den weiblichen Pflanzen nur eine Blüte pro Pflanze zur gleichen Zeit. Die Blüten beider Geschlechter sind zwischen zwei und drei Zentimeter groß und besitzen drei weiße Petale und drei hellgrüne Sepale. Die männlichen und weiblichen Blüten besitzen ein Drüsengewebe in den Staminodien, welches neben Nektar einen aasähnlichen Geruch absondert. Dadurch werden vor allem Coleoptera- und Dipteraarten angelockt (MARKGRAF und ZOLLER; 1981). Von welchen Tieren die weiblichen Pflanzen bestäubt werden, ist derzeit noch nicht bekannt (JORDAN et al., 2010). Häufige Blütenbesucher, die als Bestäuber in Frage kommen, sind einige Syrphiden, wie *Eristalis tenax*, *Calliphora erythrocephala*, *Calliphora vomitoria*, *Sarcophaga carnaria* und *Lucilia caesar*, einige kleine Staphylinidenarten, sowie die Dipteraart *Hydrellia flavilabris* (MARKGRAF und ZOLLER, 1981). Bei einer erfolgreichen Befruchtung bilden sich bei den weiblichen Individuen kapselartige Früchte aus, die bis zu 24 Samen beinhalten (COOK und URMI-KÖNIG, 1983).

Findet während der Blütezeit keine Befruchtung statt, so bilden sowohl männliche als auch weibliche Pflanzen im August und September Turione und Ableger aus. Ein Individuum kann dabei bis zu sieben Turione und sechs Ableger produzieren (JORDAN et al., 2010). Bei nicht befruchteten weiblichen Individuen können sich parthenokarpische Früchte entwickeln. Die samenlosen Früchte beginnen rasch zu faulen und sterben ab (SMOLDERS et al., 1995).

Bei regelmäßiger Überschwemmung von Krebscherengewässern in Auengebieten findet durch das Wegschwemmen von Teilen des Pflanzenbestandes ein Transfer von Pflanzen in andere Gebiete und somit ein genetischer Transfer und Austausch zwischen den Populationen statt. Durch Flussregulierungen entlang der Donau ist die Dotierung der Auengebiete bei Hochwässern stark zurückgegangen. Nur noch durch Extremhochwässer kann

die Art neue Lebensräume besiedeln (KÜRY, 2009). Ein eigenständiger genetischer Austausch durch Transfer von Individuen ist in den regulierten Flussbereichen der Donau sehr unwahrscheinlich.

Die österreichischen Krebscherenbestände sind bis zu 55 Kilometer weit voneinander entfernt. Durch diese geografische Isolation ist eine sexuelle Vermehrung kaum mehr möglich. Für eine generative Vermehrung benötigt die Krebschere eine Befruchtungsentfernung von weniger als einem Kilometer (SMOLDERS et al., 1995).

Der Erhalt einer evolutionsfähigen Fortpflanzungsgemeinschaft, gegeben durch sexuelle Fortpflanzung oder durch das Vordringen von Tochterindividuen in andere Gebiete, und somit der Erhalt einer genetischen Diversität innerhalb der und zwischen den Krebscherenpopulationen, bilden für das Überleben der Krebscherenbestände bei sich ändernden Umweltbedingungen eine Voraussetzung (ROSENTHAL, 2003; SMOLDERS et al. 2003). Da sich die Krebschere größtenteils klonal vermehrt und die Möglichkeiten von Genfluss durch sexuelle Vermehrung und Transfer von Individuen limitiert sind, wird angenommen, dass es zu einer Reduktion der genetischen Diversität der Art kommt (LAMBERTINI et al., 2007).

Eine Fortpflanzung erfolgt in Österreich derzeit wahrscheinlich ausschließlich klonal über die Ausbildung von Turionen und Ablegern. Das Fehlen eines Geflusses erhöht die Gefahr, dass die verbleibenden Bestände bei einer Änderung der abiotischen Bedingungen verschwinden (SMOLDERS et al., 2003).

### 1.1.2 Der Jahreszyklus der Krebschere

Der Jahreszyklus der Krebschere teilt sich in vier Phasen: die Aufstiegsphase, die Reproduktionsphase, die Abstiegsphase und die Überwinterungsphase. Abbildung 2 zeigt den Zyklus der Krebschere im Jahresverlauf.

Die **Aufstiegsphase** der Krebschere beginnt im Frühling, in warmen, sonnigen Frühjahren bereits im März. Die Krebscherenindividuen beginnen vom Gewässergrund in Richtung Wasseroberfläche aufzusteigen (MARKGRAF und ZOLLER, 1981). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus durch Lichtintensität und Wassertemperatur beeinflusst wird: Durch Zunahme der Wassertemperatur und der Lichtmenge wird die Photosynthese in den Pflanzen angeregt und die Pflanze durch eingelagerte Luftdepots leichter (SMOLDERS et al., 2003). Die jungen Ableger, welche im Vorjahr gebildet wurden und teilweise noch mit der Mutterpflanze verbunden sind, steigen als erstes an die Wasseroberfläche. Sie können

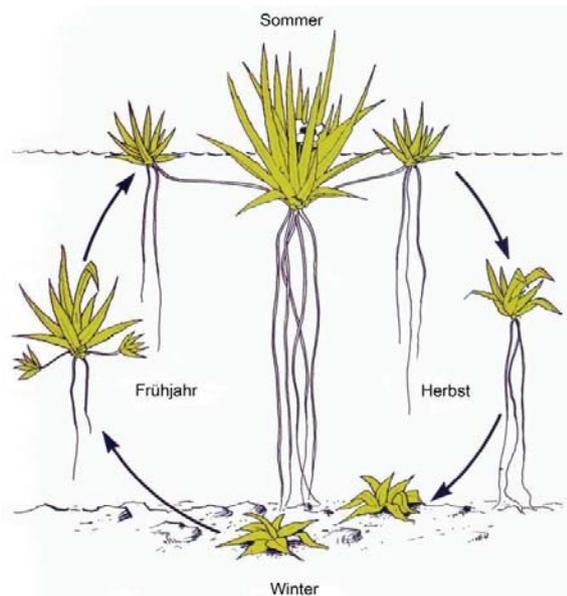


Abbildung 2: Der Jahreszyklus der Krebschere (POTT UND REMY, 2000)

durch ihre Verbindung zur Mutterpflanze diese teilweise mit in die Höhe ziehen. Aus der submersen Überwinterungsphase gehen die Pflanzen im Frühjahr in eine emerse Lebensweise über (KÜRY, 2009). In dieser Zeit beginnen auch die Turionen und Samen am Gewässergrund auszutreiben. Sie steigen jedoch noch nicht zur Wasseroberfläche auf. Die Aufstiegsphase dauert circa ein Monat und kann nach einem milden Winter bereits im April vollendet sein (JORDAN et al., 2010).

Die **Reproduktionsphase** erstreckt sich, wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, von Mai bis September. In dieser Zeit findet die vegetative und generative Fortpflanzung statt. Die juvenilen Pflanzen des Vorjahres, die sich aus Turionen und Samen entwickelten, haben in den Sommermonaten eine ausreichende Größe erreicht, um nun ebenfalls vom Gewässergrund an die Oberfläche zu gelangen. Sie bilden im ersten Jahr noch keine Blüten, Turione oder Ableger aus (JORDAN et al., 2010).

Die **Absinkphase** beginnt im Herbst. Die Blätter der älteren Adultpflanzen färben sich braun und die Rhizoide sterben teilweise ab. Die unteren Rosettenblätter sterben ab, bleiben jedoch mit der Pflanze verbunden. Die Luftdepots der abgestorbenen Blätter füllen sich mit Wasser. Das spezifische Gewicht der Pflanze nimmt durch die mit Wasser gefüllten Blätter zu. Der Auftrieb der Pflanze reduziert sich. Zusätzlich stellt die Pflanze die Produktion neuer Blätter ein. Die Krebschere beginnt langsam in Richtung Gewässergrund zu sinken (COOK und URMI-KÖNIG, 1983). Die Turione, welche im Sommer zwischen den unteren Rosettenblättern entstanden sind, fallen durch das Absterben der unteren Blätter von der Mutterpflanze ab. Die nicht vollständig ausgebildeten Ableger bleiben weiterhin mit den Elternpflanzen verbunden. Vollständig entwickelte Ableger lösen die Verbindung zum Eltern-

individuum und verbleiben zusammen mit den juvenilen Pflanzen aus Samen und Turionen noch bis Ende Oktober an der Gewässeroberfläche (JORDAN et al., 2010).

Die Überwinterungsphase beginnt zumeist im November. Die Adultpflanzen liegen flach, teilweise ohne Rhizoide und braun verfärbt im Schlamm des Gewässergrundes. Auch die Juvenilpflanzen sinken Ende Oktober auf den Boden der Gewässer und überdauern, zusammen mit den Turionen und Samen, durch den Schlamm geschützt, die kalte Jahreszeit. Für ein Absinken benötigen die Pflanzen eine Gewässertiefe von mindestens vierzig Zentimeter. Reicht die Tiefe nicht aus, so verbleiben die Krebscherenbestände an der Wasseroberfläche. Ein Zufrieren der Gewässer überstehen die Pflanzen zumeist schadlos. Die Blätter frieren ab, die Strünke treiben im Frühling wieder aus (JORDAN et al., 2010).

## 1.2 Vorkommen der Art

Die Krebsschere kann sich in stehenden oder leicht fließenden, mesotrophen bis eutrophen, kalkarmen Gewässern etablieren. Besonders in Flussaltarmen, Wassergräben, Marschgebieten und Weihern ist die Wasserpflanze zu finden. Bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts war die Pflanze in Mittel- und Osteuropa sowie von Süd-Skandinavien bis West-Sibirien in Altgewässern, Marschländen, Weihern und anderen Stillgewässern weit verbreitet. Auch heute noch kann die klonal wachsende Pflanze im nördlichen Mitteleuropa, besonders in Polen, große, dichte Bestände bilden (KÜRY, 2009). Abbildung 3 zeigt die Verbreitung der Art in Europa.

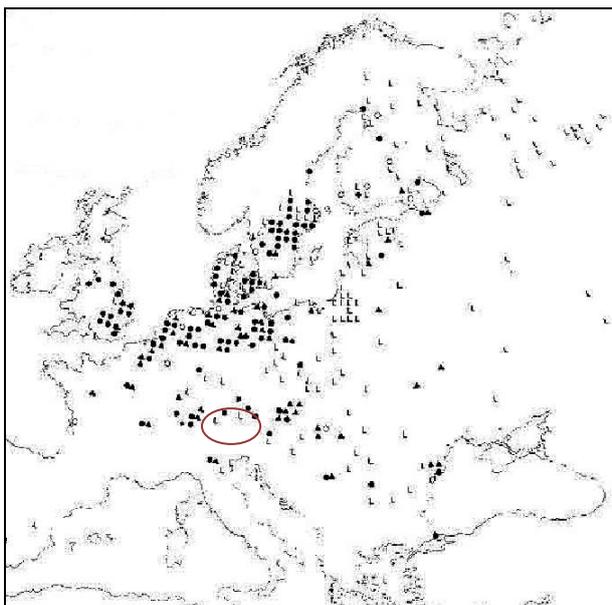


Abbildung 3: Verbreitung von *Stratiotes aloides* in Europa ●weibliche ▲männliche Pflanzen (modifizierte Grafik nach COOK und URMI-KÖNIG, 1983)

In Österreich sind heute die autochthone Bestände auf wenige Standorte entlang der Donau und der March in Wien, Niederösterreich und Oberösterreich begrenzt. Abbildung 3 zeigt rot umrandet die österreichischen Bestände. Wie aus der Abbildung ersichtlich, kommen in Österreich Pflanzen beider Geschlechter vor. Fossile Funde von *Stratiotes aloides* wurden ebenfalls in dieser Region gemacht. Die Krebssschere wird deshalb für Österreich als autochthone Art angesehen (COOK und URMI-KÖNIG, 1983).

Innerhalb des letzten Jahrhunderts hat der Bestand der Krebssscheren in den Auegebieten Österreichs stark abgenommen. Um 1850 war die Art in Österreich in der Lobau noch herdenweise vorzufinden (NEILREICH, 1846 und REISSEK, 1860 zit. nach SCHRATT-EHRENDORFER, 1999). Gewässer mit Massenbeständen weiblicher und männlicher Individuen dürften in dieser Zeit in den Auegebieten der Donau zu finden gewesen sein. HÜBL (1952, zit. nach SCHRATT-EHRENDORFER, 1999, 118) bezeichnet die Art ein Jahrhundert später als „nicht allzu häufig zu beobachten“. Bis 1988 gibt es in der Lobau einen einzigen dokumentierten Restbestand an *Stratiotes aloides* in der Panozzalacke. Ab 1990 ist auch dieser nicht mehr anzutreffen. Die Art gilt in der Lobau als „an natürlichen Standorten ausgestorben“ (SCHRATT-EHRENDORFER, 1999, 149). In den folgenden Jahren wurden in der Lobau autochthone Bestände der Krebssschere gefunden. Trotzdem ist die Art in den Donauauen sehr selten. In Nieder- und in Oberösterreich steht die Art auf der Roten Liste gefährdeter Pflanzen in der Kategorie 1 und ist vom Aussterben bedroht (NIKL FELD und GRIMS, 1999).

### 1.3 Der Einfluss der Krebssschere auf den Lebensraum

An den wenigen Standorten, an denen die Krebssschere in Österreich vorkommt, bildet sie zumeist dichte Bestände. Durch Aussendung allelopathischer Stoffe kann die Pflanze das Wachstum und die Keimung anderer Arten unterdrücken und somit an optimalen Standorten nahezu reine Bestände bilden (MULDERIJ et al., 2005). Pro Quadratmeter können bis zu 35 Individuen Platz finden. Die Dichte der Populationen kann sich positiv auf andere Arten auswirken. Die Bestandsteppiche verhindern die Produktion größerer Wellen, wodurch die Rhizome anderer Arten nicht so leicht beschädigt werden und reißen. Auch Wasserpflanzen, deren Rhizome ein größeres spezifisches Gewicht als Wasser haben, müssen durch die, durch die Krebssschere geschaffenen, Oberflächenstrukturen weniger Energie in Stützgewebe investieren (SARNEEL und NIJZINK, 2010).

Die dichten Krebssscherenteppiche produzieren sehr viel Biomasse. Da die unteren Rosettenblätter und teilweise auch die Rhizoide jedes Jahr absterben und im Frühjahr neu

gebildet werden, akkumuliert abgestorbenes Pflanzenmaterial am Gewässergrund. Dies führt allmählich zur Verlandung der Gewässer (JORDAN et al., 2010).

Die Krebschere bietet mit ihren stacheligen Blättern Schutz und Lebensraum für viele Tierarten. Viele Invertebratenarten sind in unterschiedlichen Entwicklungsstadien submers und emers an den Pflanzenbeständen der Krebschere zu finden und nutzen die Bestands-teppiche als Substrat, um Eier abzulegen, oder auch, um als Adulttiere auf ihnen zu leben (TARKOWSKA-KUKURYK, 2006).

Eine Großlibellenart, die ganz besonders auf das Vorkommen der Krebschere angewiesen ist, ist die Grüne Mosaikjungfer (*Aeshna viridis* EVERSMANN). Sie legt ihre Eier auf die Blätter und in die Blattachsen der Krebschere, um diese vor Fressfeinden, vor allem vor Fischen, zu schützen. Im Herbst, wenn die Pflanzen zum Gewässergrund absinken, um dort zu überwintern, sinken die Eier mit ihnen herab und sind somit vor dem Einfrieren geschützt (COOK und URMI-KÖNIG, 1983). Der Verlust von Krebscherengewässern beeinträchtigt auch den Bestand der Großlibellenart stark. Die Grüne Mosaikjungfer steht in der Flora-Fauna-Habitat Richtlinie im Anhang IV und ist vom Aussterben bedroht (KÜRY, 2009).

### 1.4 Ziele, Forschungsfragen und Hypothesen

Ziel dieser Arbeit ist die genetische Erforschung der letzten in Österreich existierenden autochthonen Bestände der Krebschere. Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde erhoben, ob zwischen den Populationen Österreichs und innerhalb der Populationen genetische Unterschiede anzutreffen sind. Da sich die Krebschere stark vegetativ vermehrt und eine generative Vermehrung der autochthonen Bestände in Österreich derzeit nicht stattfindet, wurde von einer geringen genetischen Diversität innerhalb der Bestände ausgegangen (monoklonale/oligoklonale Bestände). Auf europäischer Ebene wurde des Weiteren untersucht, wie groß die genetische Differenz zwischen den Populationen Österreichs, Deutschlands und der Niederlande ist. Da zwischen den Populationen der Flusssysteme der drei Länder kein genetischer Austausch - sei es durch sexuelle Vermehrung oder das Verdriften von Tochterindividuen - stattfindet, wurde wegen der Isolierung von einem höheren genetischen Unterschied zwischen den Flusssystemen ausgegangen. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen als Basis für mögliche folgende Beimpfungsprojekte von Gewässern mit Krebscherenindividuen dienen. Die formulierten Fragestellungen und Hypothesen lauten

- **Wie genetisch divers sind die in Österreich untersuchten Krebscherenbestände?**

### Hypothese 1:

Innerhalb der Populationen ist die genetische Diversität gering, wegen des klonalen Wachstums und der fehlenden generativen Vermehrung (monoklonale/oligoklonale Bestände). Zwischen den Populationen ist die genetische Diversität höher, wegen der geographisch isolierten Entwicklung der Bestände.

- **Lassen sich die Populationen der besammelten Flusssysteme in Österreich, Deutschland und den Niederlanden genetisch voneinander abgrenzen?**

### Hypothese 2:

Die Populationen der besammelten Flusssysteme lassen sich genetisch voneinander abgrenzen, da zwischen den Flusssystemen kein Austausch stattfindet.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Untersuchungsgebiete

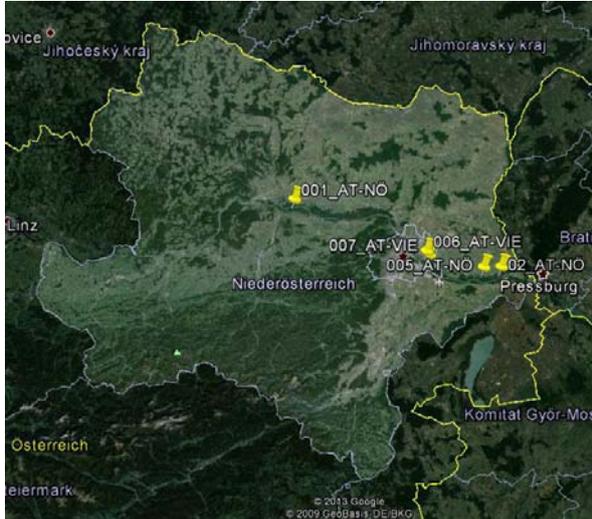


Abbildung 4: Probenstandorte in Wien und Niederösterreich

In Österreich wurden in Niederösterreich und Wien insgesamt an fünf Standorten Bestände von *Stratiotes aloides* besammelt. Abbildung 4 zeigt die Probenstandorte. Alle österreichischen Populationen, welche untersucht wurden, liegen in Altgewässern der Donau. Untersuchungen an blühenden Beständen ergaben, dass rein männliche und weibliche Populationen vorhanden sind. Es konnten keine gemischtgeschlechtlichen Populationen erhoben werden.

#### 2.1.1 Populationen in Niederösterreich

##### 2.1.1.1 Obere Placken

Die Population liegt in einem isolierten Donau-Altgewässer in der Nähe von Zwentendorf. Das Gewässer wird durch Niederschlag und Grundwasser gespeist und besitzt keinen Zufluss vom Hauptstrom. Das Altgewässer ist stark verschlammte, an vielen Stellen mit Schilfbewachsen und verlandungsgefährdet. Die Population besteht aus mehr als 1000 weiblichen Krebscherenindividuen. Der Bestand blühte im Jahr 2013.

##### 2.1.1.2 Eckartsau

Der Bestand befindet sich im Fadenbach bei Eckartsau und wird bei Hochwasser von der Donau gespeist. Die Population besteht aus circa 30 Individuen. Das Geschlecht der Pflanzen konnte bislang nicht beobachtet werden (kleine Beobachtung im Jahr 2013 während der Reproduktionsphase).

### 2.1.1.3 Stopfenreuth

Die Population befand sich in der Stopfenreuther Au bei Hainburg und bildete dort einen dichten Bestand. Die Population am Standort ist rezent erloschen. Einige Individuen der autochthonen Population wurden vor circa 20 Jahren, bevor der Bestand an diesem Standort ausstarb, entnommen und liegen nun als ex-situ Schutzsammlung vor. Die im Rahmen dieses Projektes entnommenen und beprobten Individuen sind männlich.

## 2.1.2 Population in Wien

### 2.1.2.1 Tischwasser

Der Bestand befindet sich in der Lobau in einem sehr großen Altgewässer der Donau. Das Gewässer ist mehrere Meter tief. Die Population lebt ganzjährig submers und blüht nicht. Das Geschlecht der Population konnte daher bisher nicht bestimmt werden. Der Krebscherenbestand umfasst weniger als 30 Individuen.

### 2.1.2.2 Ölhafen

Die Population befindet sich in einem Altgewässer direkt neben dem Ölhafen Lobau. Der Bestand wurde aus der Panozzalacke in das Gewässer übersiedelt. Der Uferbereich ist steil geböscht und das Gewässer mehrere Meter tief. Die Population umfasst mehr als 5000 männliche Individuen. Der Bestand ist vital und blühte im Jahr 2013.

## 2.1.3 Entfernungen zwischen den reproduktiven Beständen in Österreich

Tabelle 1: Entfernungen zwischen den untersuchten Populationen in Niederösterreich und Wien

Entfernungen	
Obere Placken - Ölhafen Lobau:	57,2 km
Tischw. - Ölhafen Lobau:	1,8 km
Ölhafen Lobau - Eckartsau:	21,7 km
Eckartsau - Stopfenreuther Au:	6,9 km

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, blühten von den in Österreich untersuchten Populationen im Jahr 2013 nur zwei Populationen. Die Population Obere Placken in den Oberen Donauauen besteht nur aus weiblichen Individuen. Im Ölhafen Lobau sind nur männliche Individuen gefunden worden (HUDLER, 2013.). Tabelle 1 zeigt die Entfernung zwischen den untersuchten Standorten in Wien und Niederösterreich. Zwischen den beiden blühenden Populationen besteht eine Entfernung von 57,2 Kilometer. Auch zwischen den

nahe zusammen liegenden Populationen Tischwasser und Ölhafen in der Lobau kann rezent keine generative Vermehrung stattfinden, da die Population im Tischwasser ganzjährig submers lebt und nicht blüht. Eine sexuelle Vermehrung zwischen den in Österreich untersuchten autochthonen Populationen ist folgend den Angaben von SMOLDERS et al. (1995) nicht möglich.

### 2.1.4 Probensammelungsstandorte in Deutschland und den Niederlanden

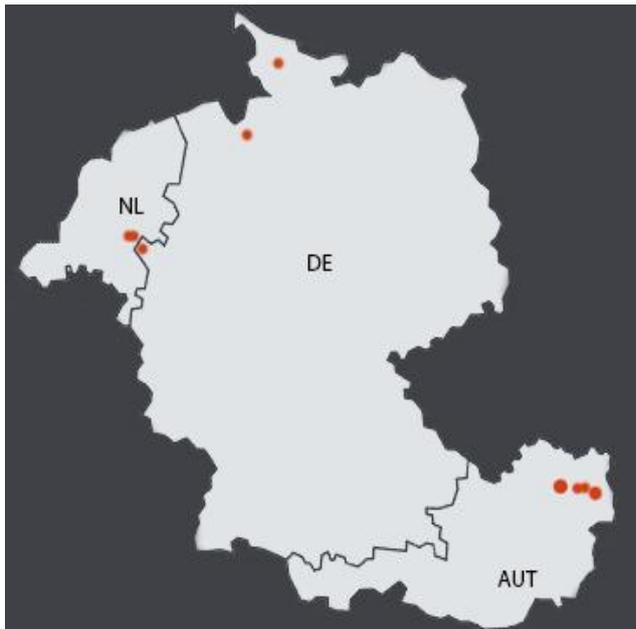


Abbildung 5: Probenstandorte in Österreich, Deutschland und den Niederlanden

Die Abbildung 5 zeigt die Probenstandorte in Österreich, Deutschland und den Niederlanden. Das nördlichste Probennahmegebiet in Deutschland liegt in Schleswig-Holstein in den Eider-Niederungen am Fluss Alte Sorge. Weiter südlich des Standortes, im Gebiet Niedersachsen, befindet sich ein weiterer Probenstandort an der Weser. Im Westen, an der niederländischen Grenze im Bundesland Nordrhein-Westfalen, wurden ebenfalls am Rhein Proben von *Stratiotes aloides* genommen. Auch in Deutschland wurde im Rheingebiet eine autochthone ex-situ Schutzsammlung, die im Naturschutzbund-Teich Neukirchen-Vluyn seit den 1960er Jahren existiert, beprobt. Die besammelte niederländische Population befindet sich an der deutschen Grenze im Gebiet Gelderland. Der Standort ist ebenfalls am Rhein gelegen. Zwischen der nördlichsten Population Deutschlands in den Eider-Niederungen und der am weitesten entfernten rheinländischen Population liegen 380 km Luftlinie. Zwischen den Rheinpopulationen und den österreichischen Beständen liegen mindestens 740 km Luftlinie.

### 2.1.5 Weiteres untersuchtes Material

In Österreich und Deutschland wurden *Stratiotes*-Individuen aus Gartenhandelsgeschäften bezogen. In Österreich wurden Krebssscheren der niederösterreichischen Firma „Hameter“ für die Erhebungen verwendet. In Deutschland wurden Individuen der beiden in Nordrhein-Westfalen gelegenen Gartengeschäfte „Staudenförster“ und der Firma „Holzum“ für die Analyse miteinbezogen. Ziel der Mituntersuchung des Handelsmaterials war es festzustellen, ob die Handelsindividuen den regionalen Flusssystemen zuordenbar sind, oder ob die Handelsexemplare anderen Ursprungs sind.

## 2.2 Probenahme

Tabelle 2: Anzahl, Status und Flusssystem der entnommenen Proben

Pop.Nr.	<i>Stratiotes aloides</i> Sammlung	Proben	Flusssystem	Status
AT-1	Obere Placken	10	DONAU	autochthon?
AT-2	Stopfenreuther Au/Hainburg	10	DONAU	ex-situ/ autochthon
DE-3	Wesermarsch-Bremen	10	WESER	autochthon
DE-4	Wesermarsch	5	WESER	ex-situ/ autochthon
AT-5	Eckartsau	20	DONAU	autochthon
AT-6	Tischwasser	10	DONAU	autochthon?
AT-7	Ölhafen Lobau	24	DONAU	angeimpft/autochthon
AT-8	Hameter	6	-	Handelsware
DE-9	NABU Teich Neukirchen-Vluyn (Schutzsammlung)	11	RHEIN	ex-situ/ autochthon
DE-10/10a	Kranenburger Bruch (KLE)	20	RHEIN	angesalbt
NL-12	Buitenpolder (Rhein Altarm; NL)	30	RHEIN	autochthon
DE-13	Handel-NRW	5	-	Handelsware
DE-14	Eider-Niederung (Meggerkoog)	5	EIDER	autochthon

In den ausgewählten Krebssscherengewässern wurden zwischen 5 und 25 Individuen der Population ausgewählt und besammelt. Tabelle 2 zeigt die entnommenen Individuenproben pro Bestand, den Status sowie die Flusssysteme. Für die Probenahme wurden Blätter von mittlerer Größe (circa ein Zentimeter breit, fünf Zentimeter lang) und mittlerem bis jungem Alter (weiter innen liegende Blätter) ausgewählt und in Papiertüten gegeben. Pro Individuum wurden drei bis vier Blatteile entnommen. Etwaige Schmutzreste sowie sich auf den Blättern befindende Wasserreste wurden mit Zellstoff so gut wie möglich entfernt. Die befüllten

Papiertüten wurden anschließend in Silikagel getrocknet. Das Silikagel wurde bei Verlust seiner feuchtigkeitsentziehenden Wirkung ausgetauscht.

## 2.3 Bisherige Arbeiten zur genetischen Diversität in *Stratiotes*

Um die genetische Diversität einer Art festzustellen, gibt es verschiedene molekularbiologische Methoden. Da über die Krebschere keine Genomsequenz-Information vorhanden ist, kommen hierfür drei Methoden in Frage:

- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
- Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)
- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Alle drei Techniken basieren auf PCR-Methoden, in denen mittels Primern DNA-Fragmente vervielfältigt werden (MEUDT und CLARKE, 2007). Dabei gelten RAPDs bei Pflanzen als Standardmethode, um Unterschiede innerhalb einer Art und zwischen Arten festzustellen. Im Zuge von Untersuchungen an der Hochschule in Bremen wurden RAPDs durchgeführt, die jedoch bei der Krebschere zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führten. Sie wurden daher als nicht geeignet eingestuft (JORDAN et al., 2010). Die AFLP-Methode gilt, verglichen mit RAPDs und ISSRs, als Methode mit hoher Reproduzierbarkeit. Die AFLP-Technik ist ideal für genetische Untersuchungen:

- ohne Vorab-Genominformationen
- ohne bereits etablierte Marker
- innerhalb einer Art
- bei geringer genetischer Variabilität
- um schnell reproduzierbare Daten zu generieren (MEUDT und CLARKE, 2007)

Auch an der Hochschule Bremen wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit bei der Krebschere mit Hilfe von AFLPs genetische Unterschiede zwischen und innerhalb von Populationen festgestellt (EBERSBACH, 2010 zit. nach JORDAN et al., 2010). Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Masterarbeit als Methode AFLPs gewählt.

## 2.4 Versuchsaufbau

### 2.4.1 Vorversuch zur Optimierung der DNA-Extraktion

Um durch die AFLP-Methode optimale Ergebnisse zu erzielen, ist auf eine möglichst hohe Qualität der extrahierten DNA des eingesetzten Materials zu achten. Aus diesem Grund wurde getestet, ob eine Zerkleinerung und Homogenisierung des Ausgangsmaterials durch

Mörsern per Hand, oder eine maschinelle Zerkleinerung mittels TissueLyser mit reduzierter Schüttelintensität und Zeitdauer für die Arbeit mit *Stratiotes* verwendet werden soll. Für den Vorversuch wurden zwei Populationen mit jeweils sechs Individuen ausgewählt. Pro Probe wurden circa 20 µg eingewogen, mit 400 µg des Lösungspuffers AP1 von QIAGEN versetzt und per Hand gemörsert. Durch das händische Mörsern soll im Vergleich mit der maschinellen Zerkleinerung des Blattmaterials mittels TissueLyser ein qualitativ höherwertiges DNA-Extrakt gewonnen werden, da die DNA dabei geringeren Scherkräften ausgesetzt ist. Das Mörsern von Hand stellte sich als nicht praktikabel heraus: Die Methode war sehr zeitintensiv, es bildete sich Schaum und eine Homogenisierung des Ausgangsmaterials war nicht restlos möglich. Die maschinell zerkleinerten Proben lieferten ein besseres DNA-Extrakt, weshalb in weiterer Folge eine maschinelle Zerkleinerung durchgeführt wurde.

### **2.4.2 Mörsern**

20 µg Pflanzenprobe wurden in 2ml-Tubes gefüllt und mit drei Glas-Beads versehen. Es wurde teilweise auf vor dem Versuchsbeginn maschinell zerkleinerte DNA-Proben österreichischer Bestände zurückgegriffen, bei denen bereits eine DNA-Extraktion durchgeführt wurde. Diese Proben wurden bei 25 Hertz im TissueLyser zehn Minuten geschüttelt und zerkleinert. Die Pflanzenproben, welche nach dem Vorversuch in den deutschen und niederländischen Beständen entnommen wurden, wurden bei reduzierter Frequenz und Zeit fünf Minuten lang bei 20 Hertz zermahlen und homogenisiert.

### **2.4.3 DNA-Extraktion**

Die bereits vor Versuchsbeginn extrahierten Proben wurden halbautomatisch in einem QIAcube extrahiert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Extraktion der DNA nach dem „DNeasy Plant Handbook“ von QIAGEN (2006). Entgegen dem Protokoll wurde der Puffer AE in 2 Schritten zu je 50 µl auf die Membran pipettiert, um die DNA zu eluieren. Durch diese Vorgangsweise wird die DNA-Konzentration im Eluat erhöht, jedoch die Gesamtausbeute der DNA reduziert (QIAGEN, 2006). 1 µg RNase A wurde, abweichend von den Protokollangaben, erst nach der Extraktion den Proben beigemischt.

### **2.4.4 Kontrolle der Extraktion und RNA-Verdau**

#### **2.4.4.1 Nukleinsäuremessung mittels Nanodrop**

Zur Kontrolle der Extraktion wurde gemäß dem Protokoll von THERMO SCIENTIFIC (2009) die DNA-Konzentration in der Probe durch photometrische Bestimmung auf dem NanoDrop

2000-Spektrometer gemessen. Als Blank dient der Eluationspuffer AE aus der Extraktion, von welchem ein Mikroliter auf die Messzelle des Spektrometers aufgetragen wird. Der Puffer dient als Referenz für die später gemessenen Proben. Durch die Blindprobe soll das „Hintergrundrauschen“ des Messgerätes und der Pufferlösung eruiert werden. Die Blankprobe stellt somit den Nullwert dar. Danach wird jeweils ein Mikroliter der extrahierten DNA auf die Messeinrichtung des Spektrometers pipettiert, der Messarm gesenkt und die Messung der Nukleinsäurekonzentration durchgeführt. Das Ergebnis der Messung wird als Spektralkurve und als Zahlenwerte dargestellt

Bei einer Wellenlänge von maximal 230 Nanometern werden Polysaccharide, bei 260 Nanometern DNA und RNA, und bei 280 Nanometern Proteine absorbiert. Abbildung 6 zeigt den idealen Verlauf einer Spektralkurve mit der Angabe der Wellenlänge auf der x-Achse und der Absorptionseinheit auf der y-Achse. Das Verhältnis zwischen dem Probenmesswert bei 260 Nanometern und dem Messwert bei 280 Nanometern dient zur Beurteilung des Reinheitsgrades der DNA und RNA. Der Wert sollte bei DNA-Proben bei 1,8 liegen. Einem nach unten wesentlich abweichenden Probenwert liegt meistens eine Verunreinigung durch Proteine, Phenole oder andere Stoffe zu Grunde, deren Absorptionsmaximum auf Grund der Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 Nanometern liegt. Der Quotient der Messwerte ist dann dementsprechend geringer. Bei einer Nukleinsäuremessung nach dem RNA-Verdau kann das der RNase A beigemengte Glycerol zu Verunreinigungen führen. Das Verhältnis zwischen dem Absorptionswert bei 260 Nanometern und dem Wert bei 230 Nanometern ergibt einen zweiten Messwert zur Beurteilung der Nukleinsäurereinheit. Dieser Wert ist zumeist höher als jener des 260/280 Verhältnisses und sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Signifikant niedrigere Werte deuten auf eine Extraktion von unerwünschtem Material, wie beispielsweise Algen oder Pilzen, zusammen mit der Probe hin.

Die Messwerte des NanoDrop 2000-Messgerätes (siehe Anhang: Kapitel 2) zeigten im Durchschnitt bei händischer Extraktion höhere Nukleinsäuremesswerte als bei der Extraktion durch das Gerät QIAcube. Die maschinell extrahierten Individuen weisen im Mittel einen Nukleinsäurewert von 139,9 ng/µl auf. Die per Hand extrahierten Proben haben einen durchschnittlichen Nukleinsäurewert von 610,5 ng/µl und somit im Durchschnitt eine 4,35 Mal höhere DNA-Konzentration.

### 2.4.4.2 RNA-Verdau und Kontrolle durch Agarosegelelektrophorese

Nach der Messung der DNA-Konzentration erfolgte der RNA-Verdau. Dazu wurde den Proben jeweils 1 µl RNase A zugefügt und bei 37°C dreißig Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde zur Kontrolle der Extraktion und des RNA-Verdaus ein 0,8 prozentiges

Agarosegel gegossen. Drei Mikroliter des Farbstoffes Blue Dye und vier Mikroliter DNA-Probe wurden danach auf das Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief 75 Minuten bei 90 Volt Spannung. Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle wandern in dieser Zeit durch das Gel in Richtung des positiv geladenen Pols. Kleinere Moleküle wandern schneller durch das Gel in Richtung des positiven Pols, größere Nukleinsäuremoleküle brauchen länger. Somit kommt es zu einer Auftrennung der Nukleinsäuremolekül-Größen, die später am Gelbild sichtbar wird.

Danach wurde das Agarosegel mit GelRed Nucleic Acid Stainingsolution für 15 Minuten gefärbt. Die extrahierte DNA wurde danach mit Hilfe des UVP Geldokumentationssystems unter UV Licht betrachtet und fotografiert. Abbildung 7 zeigt ein Gelbild nach der Extraktion und dem RNA-Verdau.

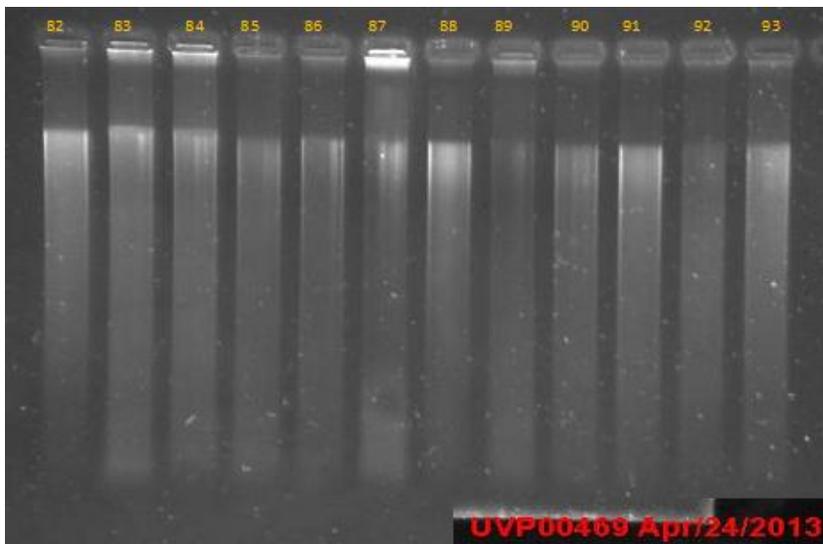


Abbildung 6: 0,8% Gelbild nach der Extraktion

### 2.4.5 Anwendung der AFLP Methodik

Die AFLP für den Versuch erfolgte nach der Methode von VOS et al. (1995). Für die Restriktion und Ligation wurde die Konzentration der genomischen DNA auf 100 ng/µl eingestellt. Als Referenz dienten die Ergebnisse der Nukleinsäuremessung mittels NanoDrop (siehe Anhang). Bei zu hohen Nukleinsäure-Werten wurden die DNA-Proben mit autoklaviertem Millipore-Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Bei zu niedrigen DNA-Werten wurden die Proben bei 37°C eingedampft, um die Konzentration zu erhöhen (circa 2-4 Stunden).

2.4.5.1 Restriktion und Ligation

Tabelle 3: Reagenzien und Mengenangaben pro Probe für die Restriktion und Ligation

Restriktion / Ligation	per sample (in µl)
10x T4 Ligase Puffer	1,1
0,5 M NaCl	1,1
1mg/ml BSA	0,55
Mse Adaptor (50µM)	1
EcoRI Adaptor (5µM)	1
Mse I (10 U/µl); 1U gewünscht	0,1
EcoR1 (20 U/µl); 5U gewünscht	0,25
T4 Ligase (CelU) 67U gewünscht	0,1675
Wasser	0,2325
Mastermix-Volumen + DNA Template (100 ng/µl)	5,50 5,50
<b>Endvolumen</b>	<b>11</b>

Die Restriktion und Ligation erfolgte in einem Arbeitsschritt. Hierfür wurde ein Mastermix aus den in Tabelle 3 angeführten Reagenzien erstellt. Pro Probe wurde die in der Tabelle jeweils angeführte Menge verwendet und mit 5,5 µl der auf 100 ng/µl konzentrierten Probe gemischt.

Die Restriktion erfolgte mittels zweier Restriktions-Endonukleasen: Dem "Frequent Cutter" MseI und dem "Rare Cutter" EcoRI. Die beiden Enzyme spalten Nukleotide des DNA-Stranges. Das häufig schneidende Enzym MseI schneidet vierbasige Sequenzmotive der Basenfolge 5' TTAA. Das seltener schneidende Enzym EcoRI schneidet 6-teilige Nukleinbasensequenzen der Folge 5' GAATTC. Die Abbildung 8 zeigt die Schnittstellen der beiden Enzyme. Die Enzyme produzieren drei verschiedene Arten von DNA-Fragmenten, mit überhängenden „sticky“ Enden mit den jeweiligen Kombinationen: Eco-Eco, Eco-Mse und Mse-Mse (MEUDT und CLARKE, 2007). Da das Enzym EcoRI den DNA-Strang nur sehr selten schneidet, sind die Fragmente, die an beiden Enden durch das EcoRI Restriktionsenzym geschnitten werden, extrem lang.

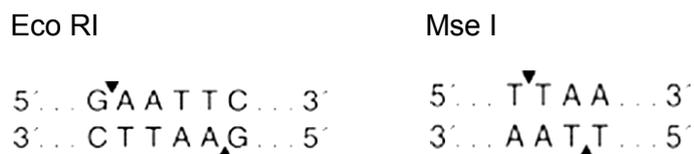


Abbildung 7: Schnittstellen des EcoRI und MseI Enzymes (NEW ENGLAND BIOLABS, 2013)

Das Adaptorpaar Mse bestand aus den Adaptoren Mse-Adaptor– und Mse-Adaptor+. Das Adaptorpaar EcoRI bestand aus den Adaptoren Eco-Adaptor– und Eco-Adaptor+. Nach dem Auftauen der Adaptorpaare wurden diese vor der Zugabe in den Mastermix für fünf

Minuten auf 95°C erhitzt und dadurch denaturiert. Die Wasserstoffbrücken der doppelsträngigen Sequenzen werden durch die Hitze aufgebrochen. Im Anschluss wurden die Adaptorenpaare bei Raumtemperatur zehn Minuten lang abgekühlt und dadurch langsam renaturiert. Die aufgebrochenen DNA-Stränge verbinden sich wieder zu Doppelsträngen mit überstehenden „sticky“ Enden. Durch das Denaturieren werden vorhandene mögliche falsche Bindungen zwischen den Einzelsträngen der EcoRI und der MseI Adaptoren gelöst. Durch Abkühlen der Adaptorenpaare auf Raumtemperatur renaturieren die Stränge wieder in der gewünschten Ausrichtung zu einander. Die verwendeten Adaptorenpaare MseI und EcoRI haben die in der Tabelle 4 gezeigte Nukleinbasenfolge.

Tabelle 4: Nukleinbasensequenz der Adaptorpaare EcoRI und MseI

<b>AFLP-Bestellung</b>	<b>Sequenzen in 5´ - 3´</b>
Eco-Adapter -	CTC GTA GAC TGC GTA CC
Eco-Adapter +	AAT TGG TAC GCA GTC TAC
Mse-Adapter -	GAC GAT GAG TCC TGA G
Mse-Adapter +	TAC TCA GGA CTC AT

In der Ligation werden die doppelsträngigen Adaptorenpaare MseI und EcoRI komplementär mit den „sticky Ends“ der Restriktionsfragmente verbunden (MEUDT und CLARKE, 2007). Als Bindemittel und Katalysator für die Hybridisierung zwischen den Restriktionsfragmenten und den Adaptoren diente im Versuch das Enzym T4-Ligase. Die Proben inkubierten anschließend zwei Stunden bei 37°C in einem Cycler der Firma Eppendorf. Bei diesem Schritt ist auf einen beheizten Deckel des Gerätes zu achten, da die Verdunstung der Probe sonst zu EcoRI\*-Aktivität und somit zu unspezifischen Bindungen des Enzymes an den Nukleinbasen führen kann (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007). Nach erfolgter Restriktion und Ligation wurden 4 µl der Probe für eine Kontrolle entnommen, mit 2 µl Blue Dye versetzt und auf ein 1,5 prozentiges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese lief 120 Minuten bei 90 Volt Spannung. Die Färbung und UV-Licht-Ansicht des Gels erfolgte wie bereits in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Abbildung 9 zeigt ein 1,5 prozentiges Agarosebild nach erfolgter Restriktion und Ligation. Die restlichen 7 µl des Restriktions-Ligationsansatzes wurde mit 93 µl 0,1-prozentigem Tris-EDTA Puffer versetzt und bei -20°C tiefgefroren.

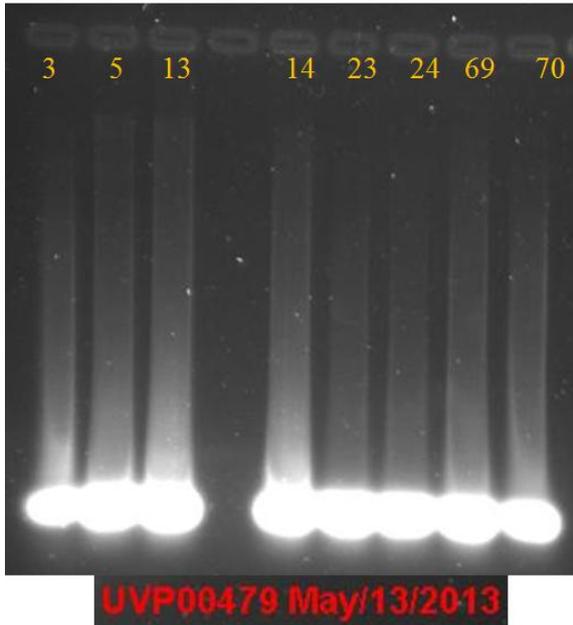


Abbildung 8: Agarosebild der Restriktion und Ligation

#### 2.4.5.2 Präselektive Amplifikation

Mit den mit Tris-EDTA verdünnten Restriktions- und Ligationsproben wurde für die präselektive Amplifikation weitergearbeitet. Das präselektive Primer-Paar bestand aus den folgenden Eco- und Mse-Primern:

Eco+A PRIMER:                   GAC TGC GTA CCA ATT CA 3'  
 Mse+C PRIMER:                 GAT GAG TCC TGA GTA AC 3'

Die beiden Adaptor-spezifischen Primer wurden vor der Zugabe in den Mastermix zusammengefügt und mit autoklaviertem Millipore-Wasser verdünnt. Die Chemikalienzusammensetzung des Mastermixes pro Probe ist in Tabelle 5 abgebildet. 2 µl der Proben wurden jeweils mit 8 µl des Mastermixes versehen.

Tabelle 5: Chemikalien und Mengen der präselektiven Amplifikation pro Probe

Preselective Amplification	per sample (in µl)
10x Polymerase-Puffer	1,0
25mM dNTPS each (0,25mM)	0,10
Preselective Primer pair (0,275µM final)	0,55
Dream Taq-Polymerase (1,25U/s.)	0,125
Wasser	6,225
Mastermix-Volumen	8,00
+ Template Res/Lig	2,00
<b>Endvolumen</b>	<b>10</b>

Die Primer binden während der präselektiven PCR an den Ligationsfragmenten. Genomische Fragmente, an welchen an beiden Enden ein Primer bindet, werden exponentiell vermehrt. Nur 1/16 der Fragmenttypen wird signifikant erhöht. Dadurch kommt es zu einer Aufkonzentration jener Fragmente mit beidseitiger Primerbindung. Diese Reduktion der Fragmente ist wichtig, um bei der Detektion die Fragmente darstellen zu können. Die ursprüngliche Anzahl der Fragmente wäre für eine Detektion und Auswertung zu hoch. Die Proben durchliefen bei der präselektiven Amplifikation die in Tabelle 6 gezeigten Stadien.

Tabelle 6: Stadien der präselektiven PCR im Cycloer

1.	72°C / 2min
2.	94°C / 20sec
3.	56°C / 30sec
4.	72°C / 2min
<b>5.</b>	<b>Zurück zu Schritt 2 (20x)</b>
6.	60°C 30min
7.	10°C / hold

Nach der präselektiven Amplifikation wurden 4 µl je Probe für eine Kontrolle mittels Agarosegel-Elektrophorese entnommen. Die Erstellung des Gelbildes erfolgte wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. Abbildung 10 zeigt ein 1,5 prozentiges Agarosebild nach erfolgreicher präselektiver Amplifikation. Die hellen Banden zeigen erfolgreiche Amplifikationen. Die verbleibenden, präselektiv amplifizierten, Proben wurden mit 94 µl 0,1 prozentigem Tris-EDTA-Puffer versetzt und bei -20°C tiefgefroren.

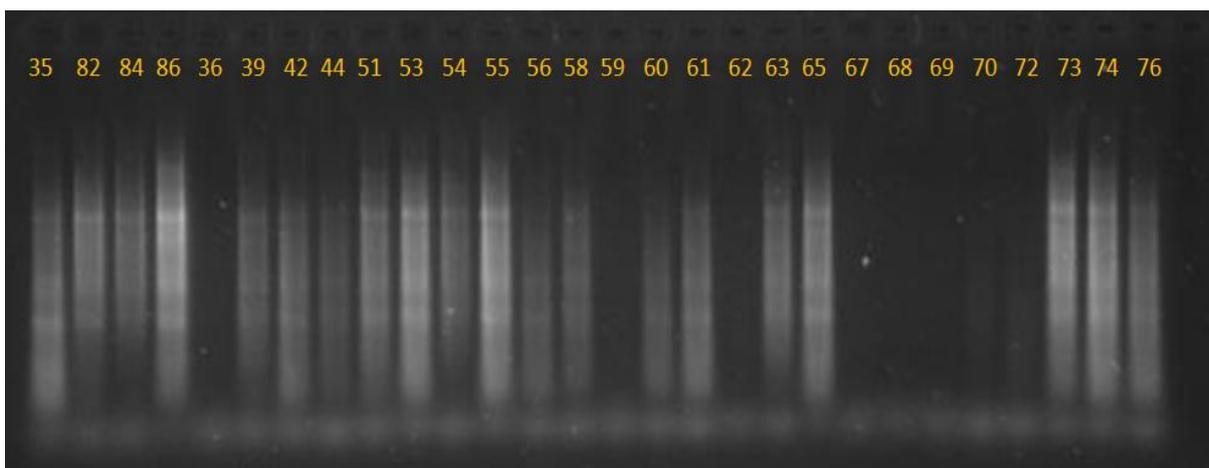


Abbildung 9: Gelbild der präselektiven Amplifikation

Wie bereits erwähnt, wurden nach der Extraktion, der Restriktion und Ligation und nach der präselektiven PCR, Agarosegele zur Überprüfung der Ergebnisse gemacht. Pro Population wurde mit jenen Proben, die die besten Ergebnisse am Agarosebild lieferten,

weitergearbeitet. Die restlichen Proben wurden entweder verworfen oder die vorangegangene Extraktion, Restriktion und Ligation oder präselektive Amplifikation mit diesen Individuen wiederholt. Jene Individuen, die auf dem Agarosebild der präselektiven PCR die besten Resultate zeigten, wurden in der sich anschließenden selektiven PCR farbmarkiert und im GA3500 aufgetrennt.

#### 2.4.5.3 Selektive Amplifikation

In der selektiven Amplifikation werden die Fragmente farblabelled und erneut reduziert. Der Eco-Primer, der in der selektiven Amplifikation eingesetzt wird, ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt. Der Mse-Primer trägt keinen Farbstoff. Für jede Probe wurden drei separate selektive Amplifikationen mit jeweils unterschiedlichen fluoreszenzfarbmarkierten Eco-Primern durchgeführt. Für jede der drei selektiven Amplifikationen wurde der gleiche Mse-Primer verwendet.

Für die selektive Amplifikation wurden verschiedene Kombinationen von farbmarkierten Primern getestet und verglichen. Es wurde versucht herauszufinden, welche Kombination bei der Fragmentlängen-Analyse die größten Unterschiede und die besten Ergebnisse liefert. Tabelle 7 zeigt die angewandten Primerkombinationen.

Tabelle 7: Übersicht der EcoRI- und MseI-Primerkombinationen

Set-Nr.	Datum	Gelb	Grün	Blau	Rot	Mse
<b>Primersets00</b>	08.05.2013	NED-AAC	VIC-ACG	FAM-ACA	PET-AC(kt)	<b>Mse-CAC</b> M48
<b>Primersets01</b>	08.06.2013	NED-AAC	VIC-ACG	FAM-ACA		<b>Mse-CAC</b> M48
<b>Primersets02</b>	18.06.2013	NED-ACC	VIC-AAG	FAM-ACT		<b>Mse-CAC</b> M48
<b>Primersets03</b>	19.06.2013	NED-AAC	VIC-AAG	FAM-ACA		<b>Mse-CTA</b> M59
<b>Primersets04</b>	19.06.2013	NED-ACC	VIC-ACG	FAM-ACT		<b>Mse-CTA</b> M59
<b>Primersets05</b>	02.07.2013	NED-ACC	VIC-ACG	FAM-ACT		<b>Mse-CAG</b> <i>kt (M49)</i>
<b>Primersets06</b>	02.07.2013	NED-ACC	VIC-ACG	FAM-ACT		<b>Mse-CTC</b> <i>kt (M60)</i>

Der farbmarkierte Primer PET-AC wurde, auf Grund der schlechten Ergebnisse im Vorversuch, nicht ausgewählt. Ein AFLP-Lauf mit und ohne Aufreinigung der Proben mit

Sephadex zeigte, dass durch Sephadex gefilterte Proben bessere Ergebnisse bei der Sequenzierung lieferten.

Es wurde ebenfalls getestet, ob die Zugabe der halben Menge der selektiven Primer EcoRI und MseI, die halbe Menge an präselektiver PCR-Probe, oder eine Kombination aus halber Menge an Primern und halber Menge an präselektiver PCR-Probe, einen positiven Effekt auf das Ergebnis der Sequenzierung haben. Im Vergleich zwischen den sechs getesteten Primersets schnitten die Primerkombinationen 4 und 2 am besten ab. Die Unterschiedlichkeit der Marker zwischen den Proben war im Primerset 4 am höchsten. Aus diesem Grund wurde beschlossen, mit diesem weiterzuarbeiten. Das Primerset 4 besteht aus der in Tabelle 8 gezeigten Nukleinbasenfolge. Für jede der drei selektiven Amplifikationen wurde der Mse-Primer M59 verwendet.

Tabelle 8: Nukleinbasenfolge der ECO-Primer NED,VAM,VIC sowie des MSE-Primers M59

36 y NED	GAC TGC GTA CCA ATT C ACC
37 g VIC	GAC TGC GTA CCA ATT C ACG
38 b FAM	GAC TGC GTA CCA ATT C ACT
M59 CTA	GAT GAG TCC TGA GTA A CTA

Auch das optimale Verhältnis der farbkodierten Primer zu einander wurde getestet. Als Ausgangsbasis wurden jeweils 5µl der gelben, grünen und blauen farbkodierten selektiven Amplifikation für die Sequenzierung eingesetzt. Da der blaue Farbstoff zu große Ausschläge in der Auftrennung verursachte, wurde dieser für den Hauptversuch auf 4µl reduziert.

Alle Stränge, die mit dem Eco-Primer synthetisieren, werden in der selektiven Amplifikation fluoreszenzfarbmarkiert. Bei Strängen mit einem Eco-Primer an einem 5'-Ende und einem Mse-Primer wird das gesamte Fragment vermehrt und farblich markiert. Die Amplifikation führt zu einer weiteren Selektion der Fragmente. Auch hierbei reduziert sich die Fragmentarten-Anzahl auf 1/16, sodass als Ergebnis der präselektiven und der selektiven Amplifikation nur mehr 1/256 der ursprünglich vorhandenen Fragmentarten vorhanden ist. Die verbleibende Anzahl an Fragmenten ist reduziert genug, um bei einer Kapillarelektrophorese die einzelnen fluoreszenzmarkierten Stränge sichtbar zu machen. Für die selektive Amplifikation wurden 2µl der präselektiv amplifizierten Probe eingesetzt. Die Chemikalien-Zusammensetzung pro Probe ist in Tabelle 9 abgebildet.

Tabelle 9: Chemikalienzusammensetzung pro Probe für die selektive Amplifikation

<b>Selektive Amplifikation</b>	<b>per sample (in µl)</b>
10x Poylmerase Puffer	1,0
25mM dNTPS each (0,25mM)	0,10
Mse I Selektiver Primer (5 µM) 0,275µM final	0,70
EcoRI Selektiver Primer (1 µM) 0,055µM final	0,70
Dream Taq-Polymerase (1,25U/s.)	0,07
Wasser	5,43
Mastermix-Volumen	8,00
+ Template der Präselektiven PCR	2,00
<b>Endvolumen</b>	<b>10,00</b>

Die Proben durchliefen bei der Selektiven Amplifikation die in Tabelle 10 folgenden Zyklen:

Tabelle 10: Zyklen der selektiven PCR

1. 94°C / 2min

---

2. 94°C / 10sec
3. 65°C bis 56°C / 30sec
4. 72°C / 2min

---

5. **Zurück zu Schritt 2\* (9x)** \*Touchdown PCR, 1°C Abnahme per Cycle (10 Cycles)

---

6. 94°C / 10sec
7. 56°C / 30sec
8. 72°C / 2min

---

9. *Zurück zu Schritt 6 (23x)*

---

10. 60°C 30min
11. 10°C / hold

#### 2.4.5.3.1 Aufreinigung der Proben

Für die Aufreinigung der Proben wurde eine Filtermembran aus Sephadex hergestellt. Dafür wurden 5g Sephadexpulver mit 60ml 1x TE-Puffer versetzt und für drei Stunden bei Raumtemperatur zum Quellen gebracht. Anschließend wurden 200µl des gequollenen Sephadex auf eine Filterplatte aufgetragen, unter die eine „Wasteplatte“ zum Auffangen überschüssigen Wassers gelegt wurde. Die Platten wurde mittels der Großzentrifuge 5810R von Eppendorf bei 750 rcf (Relative Centrifugal Force) eine Minute zentrifugiert, um das Wasser aus der Filterplatte zu entfernen. Auf die komprimierte und entwässerte Sephadexschicht wurden ein weiteres Mal 200µl Sephadex aufgetragen und die Filterplatte wurde erneut eine Minute bei 750 rcf zentrifugiert. Ein drittes Mal wurden 200µl Sephadex auf die Filterplatte pipettiert und diesmal wurde 5 Minuten bei 750 rcf zentrifugiert, um das Restwasser aus der Filterschicht zu entfernen. Unter die Filterplatte wurde eine Poolplatte

gelegt und es wurden jeweils 4µl der selektiv amplifizierten Proben mit dem Adaptor FAM-ACT, 5µl der Probe mit VIC-ACG und 5 µl der Probe mit NED-ACC auf die Filtersäule pipettiert. Anschließend wurden die übereinanderliegenden Filter- und Poolplatten zusammen in der Großzentrifuge für 5 Minuten bei 750 rcf geschleudert, um die Proben mit Hilfe der Fliehkraft durch die Filtermembran in die Poolplatte zu befördern. Die Proben befanden sich nun gemischt und aufgereinigt in der Poolplatte.

#### 2.4.5.3.2 Zugabe des Größenstandards und Auftrennung der Fragmente im Sequencer

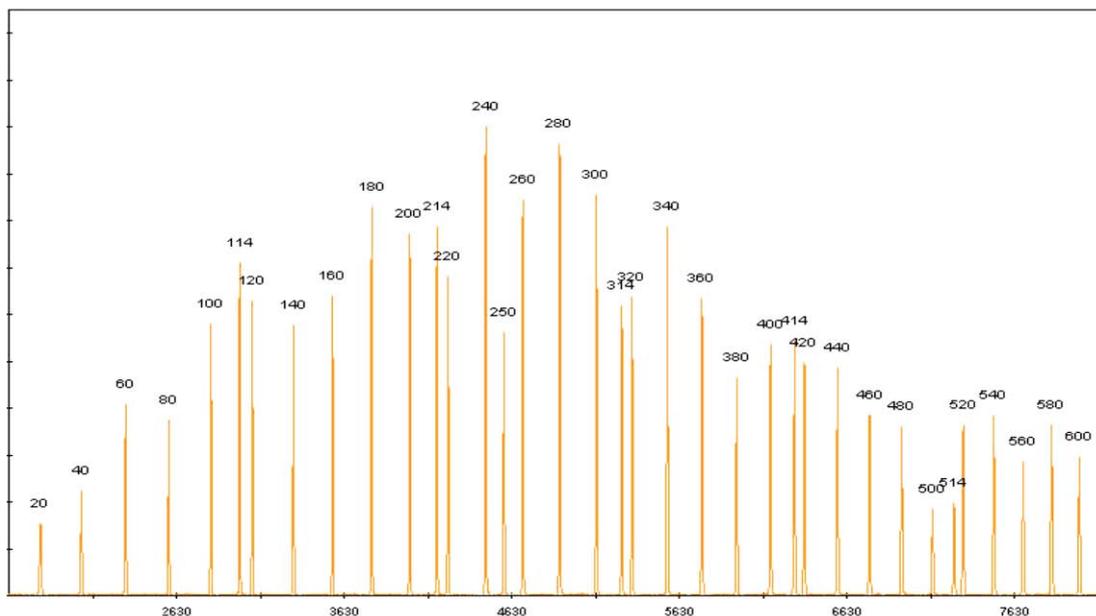


Abbildung 10: Basengrößen des Größenstandards LIZ 600 (LIFE TECHNOLOGIES, 2006)

Eine Chemikalienmischung aus dem fluoreszenzmarkierten Größenstandard LIZ 600 und HiDi-Formamid wurde angesetzt. Der Größenstandard dient bei der Auftrennung der Proben im Sequenziergerät als Referenz, da die Basenlänge dieser Fragmente bekannt ist. Somit kann auf die Länge der, durch die drei fluoreszenzfarbmarkierten Primer erzeugten, Fragmente rückgeschlossen werden. Der Größenstandard verfügt über 36 einzelsträngige Fragmente von 20 bis 600 bp (Basenpaare) (LIFE TECHNOLOGIES, 2006). Abbildung 11 zeigt die Basengrößen des Fluoreszenz-Größenstandards LIZ 600.

HiDi-Formamid ist stark deionisiert und wird eingesetzt, um möglicherweise suspendierte DNA-Fragmente wieder zu resuspendieren (LIFE TECHNOLOGIES, 2013). Das ist besonders wichtig, da bei der anschließenden Kapillarelektrophorese eine Probenaufnahme nicht nach Volumeneinheit, sondern elektrokinetisch nach molarer Konzentration erfolgt (XU, 1996). Pro Probe wurden 15µl HiDi-Formamid und 0,25µl LIZ 600 eingesetzt. Der Reagenzienmix wurde mit 1µl der gemischten und aufgereinigten Probe versetzt und bei 95°C für drei Minuten denaturiert. Danach wurden die Proben kurz auf Eis gelagert und

erneut zentrifugiert. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte auf dem Sequenzierer GA3500 von Life Technologies. Die Parameter der AFLP-Läufe sind der nachfolgenden Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Run Parameter der AFLP-Läufe

Run Parameter	
Injection Time	8 Sek.
Injection Volt	1,6 kV
Oven Temperature	60°C
PreRun Volt	15 kV
PreRun Time	180 Sek.
Capillary Length	50 cm
Run Time	22 Min 10 sek
Run Volt	19,5 kV
Dye Set	D5
Polymer	POP7
Laser Power	20 mW
Data Delay	1 Sek.

Durch die AFLP-Methode werden Banden von unterschiedlicher Länge erzeugt. Die unterschiedlichen Bandenlängen werden bei der Auftrennung detektiert und der Größe nach geordnet. Eine Bandenlänge repräsentiert einen Marker oder auch ein Plus-Allel. Die Bandenlänge wird in der Matrize eingetragen. Ist die Bande nicht vorhanden, wird sie als Null-Allel gewertet. In der Matrize wird das Feld freigelassen. Durch die in diesem Kapitel beschriebene AFLP-Methode ist es nicht möglich herauszufinden, ob das gefundene Allel haploid, diploid oder polyploid vorliegt (BENSCH und AKESSON, 2005). Eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Zuständen, wie sie bei co-dominanten Markern möglich ist, ist bei der AFLP-Methode nur indirekt durch die Bewertung der unterschiedlichen Anzahl an Kopien möglich. Die Anzahl der Kopien wird durch die Intensität der Banden, gegeben durch die rfu-Höhe, angezeigt (MURÁNI, 2004; BONIN et al. 2007).

## 2.5 Auswertung der Proben

Zur Auswertung der aufgetrennten Proben wurde mit den Programmen GeneMapper 5, TreeCon 1.3, Popgene 1.32, Excel 2010 sowie den Erweiterungsprogrammen für Excel GenAlex 6.5 und AFLPOP 1.1 gearbeitet.

### 2.5.1 Überprüfung der Roh-Daten (GeneMapper 5)

Die Ergebnisse der Auftrennung am Sequenzer wurden mit Hilfe der Software GeneMapper 5 überprüft. Hierbei wurden die drei farbkodierten Primer (NED-ACC, VIC-ACG, FAM-ACT) für jede Probe einzeln analysiert. Überprüft wurden die Quantität und Qualität der Marker im Bereich zwischen 60 und 600 bp, die Ähnlichkeit der Fragmentausschläge zwischen den Proben und das Vorhandensein von Offscale-Werten. Besonders der farbkodierte Primer FAM-ACT lieferte häufig Offscale-Werte, weshalb dieser bei der Auftrennung der Proben im Verhältnis zu VIC-ACG und NED-ACC reduziert wurde. Der Matrizenbereich zwischen 0 bis 60 sowie über 600 bp wurde für die Auswertung nicht berücksichtigt. Der Größenstandard LIZ 600 hat eine Darstellungsweite von 20-600 bp. Kürzere oder längere DNA Fragmente können deshalb in Relation zum Größenstandard nicht adäquat dargestellt werden. Der Bereich von 20 bis 60 bp blieb unberücksichtigt, weil in diesem Abschnitt noch Primerreste zu finden sein können, die die Auswertung verfälschen.

Bei schlechtem Gesamtergebnis der drei Primer wurde die selektive PCR für alle drei Primer wiederholt. Bei einem schlechten Ergebnis einzelner farbkodierter Adapteren wurden die selektive Amplifikation und die Auftrennung für die einzelne Farbe wiederholt.

Das Programm GeneMapper 5 stellt das Ergebnis der Auftrennung als Graph mit Höhendifferenzierung und als binäre Matrize dar. Je nach Peakhöhe wird eine Fragmentlänge, wie bereits in Kapitel 2.3.5.3.2 beschrieben, als vorhanden oder als fehlend in die Matrize eingetragen. Die Sensitivität kann individuell an das untersuchte Material angepasst werden. Für *Stratiotes aloides* wurde eine minimale Intensität von 100 rfu eingestellt, um eine Fragmentgröße als vorhanden zu bewerten. Nach Betrachtung der Proben in dem Programm GeneMapper 5 wurden Proben aus Österreich, Deutschland und den Niederlanden zur weiteren Auswertung ausgewählt. Die vom Programm erzeugten Matrizen für die Primer NED-ACC, VIC-ACG, FAM-ACT wurden je Farbe und Probe einzeln als Textdokument extrahiert und in Excel 2010 als Tabellen importiert.

### 2.5.2 Reduktion der Datenmatrix

Nach der Überprüfung der aufgetrennten Fragmente der Proben durch das Programm Gene Mapper 5 wurden insgesamt 87 Proben, davon 42 Proben aus Österreich, 37 Proben aus Deutschland und 8 Proben aus den Niederlanden, für eine weitere Analyse ausgewählt. Da bei einigen Proben eine der drei Farbsequenzierungen Ausfälle zeigte und für eine Bewertung alle drei Primer benötigt werden, wurden insgesamt 18 Proben aus der Analyse entfernt. Alle 13 Proben aus dem Gebiet der Wesermarsch wurden für die Auswertung

entfernt, da sie auf Grund der schlechten Qualität der extrahierten DNA keine auswertbaren Ergebnisse lieferten. Das Blattmaterial der Proben war bereits bei der Einwaage und Extraktion der DNA stark verschmutzt, teilweise verschimmelt oder bräunlich verfärbt. Auf dem Agarosegelbild der Restriktion und Ligation zeigten die beiden Populationen bereits Ausfälle. In Abbildung 12 bezeichnen die laufenden Nummern 21-35 die Individuen der Wesermarsch.

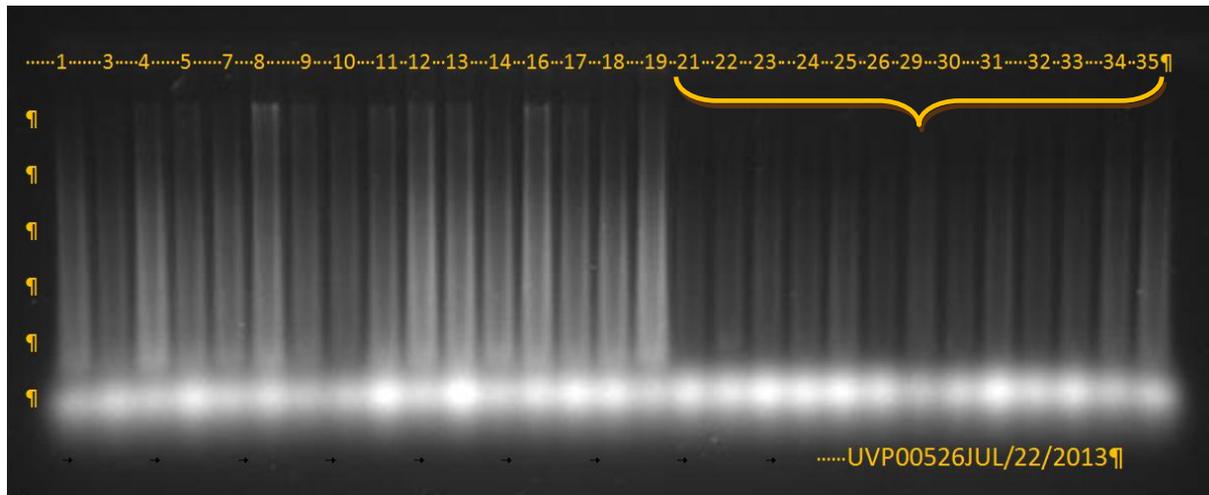


Abbildung 11: Ausfälle der Population Wesermarsch auf dem Agarosebild der Restriktion und Ligation

### 2.5.3 Auswertung der Daten (Excel 2010, GenAIEx 6.5, AFLPOP 1.1, TreeCon 1.3, Poppene 1.32)

Die Daten wurden in Hinblick auf genetische Diversität und genetische Differenzierung ausgewertet. Die genetische Diversität wurde auf regionaler und auch auf überregionaler Ebene erfasst. Auch die genetische Differenzierung wurde zunächst für die österreichischen Populationen durchgeführt. In weiterer Folge wurde eine Differenzierung der österreichischen zu den deutschen und niederländischen Populationen durchgeführt. Zur Bearbeitung der Daten diente Microsoft Excel (2010) mit den Erweiterungsprogrammen GenAIEx 6.5 (PEAKALL und SMOUSE, 2012) und AFLPOP 1.1 (DUCHESNE und BERNATCHEZ, 2002), sowie die Programme Poppene 1.3.2 (YEH et al., 1997) und TreeCon 1.3 (VAN DE PEER und DE WACHTER, 1994).

#### 2.5.3.1 Vorbereitung der Matrize

In der Matrize wird für jeden vorhandenen Wert eine Basenlänge angegeben. Es wurde verglichen, ob zwischen den Proben eine Ähnlichkeit in Bezug auf die Marker vorhanden ist. Für jeden Marker wurde über sämtliche Proben ein Mittelwert berechnet. Bei Abweichungen von  $\pm 0,60$  Basen wurden die Marker als gleich lang gewertet und untereinander angezeigt. Tabelle 11 zeigt eine Mustermatrize mit Mittelwerten der Markern ausgewählter Proben. In der Tabelle dienen die grün markierten Basengrößen 48 und 49 hierfür als Beispiel. Die

meisten der vorhandenen Marker der Basengröße 48 weichen um weniger als 0,60 Basen von der Basengröße 49 ab und können somit zusammengeführt werden. Die Summe der vorhandenen Marker je Basengröße wurde als Richtwert für die Monomorphie eines Markers herangezogen. War ein Marker bei 95% der Proben vorhanden, so wurde dieser als monomorph bewertet und deshalb gelöscht. Als Ausnahme wurden jene monomorphen Marker in der Analyse belassen, die nur an einem der drei Standorte fehlten. Sie lassen auf wirkliche Unterschiede zwischen den Flusssystemen und nicht auf Fehler und Unschärfen während des Versuchsablaufes schließen. Proben, denen im Gesamtverlauf Fragmente fehlen, die bei allen anderen Proben vorhanden sind, wurden aus der Analyse herausgenommen. Die orange markierte Probe 2012-1-007 dient hierfür als Beispiel. Marker, die auf Grund des Entfernens eines Individuums aus der Tabelle keinerlei Einträge mehr besaßen, wurden ebenfalls entfernt.

Tabelle 12: Mustermatrize mit Mittelwerten der Marker

	Sample Name	Size 36	Size 39	Size 40	Size 41	Size 42	Size 48	Size 49	Size 56	Size 57	Size 58	Size 59
	Mittelwert	60,44	63,93	65,23	65,86	66,93	74,59	75,23	82,12	83,08	84,52	85,34
AT	2012-1-001	0	0	0	0	66,98	0	75,21	82,23	0	0	85,38
AT	2012-1-003	60,42	64,03	65,27	0	66,92	0	75,2	82,12	0	0	85,42
AT	2012-1-004	0	0	0	0	0	0	75,25	82,23	0	0	85,38
AT	2012-1-005	60,56	0	0	0	66,97	74,9	0	82	0	0	0
AT	2012-1-007	0	0	0	0	0	0	75,24	0	0	0	85,38
AT	2012-1-008	0	0	0	0	66,81	75,02	0	82,02	83,09	0	85,37
AT	2012-1-009	60,28	0	0	65,85	67,1	0	75,16	82,12	0	0	85,29
AT	2012-1-010	60,28	0	0	0	66,82	75,02	0	82,12	0	0	0
AT	2012-2-001	0	0	0	65,92	66,99	0	75,31	0	83,09	84,5	0
AT	2012-2-002	60,41	0	0	0	67,07	0	75,24	82,23	0	0	0
AT	2012-2-004	60,42	63,91	65,15	0	67,09	0	75,15	82,13	0	0	85,32
AT	2012-2-006	60,42	0	65,34	0	67,01	74,31	0	82,14	0	0	0
AT	2012-2-007	60,42	0	65,2	0	67,01	0	75,27	82,12	83,18	0	0
AT	2012-2-008	60,42	0	65,31	0	66,97	0	75,16	82,12	83,17	0	0
AT	2012-2-009	60,42	63,63	65,16	0	66,96	0	75,16	82,26	0	0	85,43
AT	2012-5-001	60,41	0	0	65,86	67,08	0	75,25	0	83,15	0	0
AT	2012-5-004	60,55	0	0	0	66,99	74,42	0	82,11	83,03	0	85,41
AT	2012-5-007	60,55	64,1	0	0	67,08	0	75,25	82,25	0	0	85,42
AT	2012-5-009	60,55	0	0	65,87	67,09	0	75,26	82,23	0	0	0
	Summe	14	4	6	4	17	5	14	17	6	1	10

Die Tabelle wurde nun für eine weitere Bearbeitung mit GenAlEx in eine 0/1 Matrize umgewandelt. Alle vorhandenen Basenlängen wurden als 1 (= vorhanden) in die Matrize eingetragen. Nicht vorhandene Basenlängen wurden als Zahl 0 (= fehlend) in die Tabelle eingetragen.

### 2.5.3.2 Überprüfung der genetischen Diversität

Die genetische Diversität der Art wurde durch den Anteil polymorpher Loci, die genetische Diversität (h) nach NEI (1973), Shannon's Informations Index (I) nach LEWONTIN (1972) sowie durch eine AMOVA (Analysis of Molecular Variance) erhoben. Der Anteil polymorpher Loci, die durchschnittliche genetische Diversität je Locus und Shannon's Informations Index

wurden mit Hilfe des Programmes Popgene 1.32 ermittelt. Mit Hilfe von GenAlEx wurde eine binäre genetische Distanzanalyse zwischen den Populationen der drei Länder Österreich, Deutschland und den Niederlanden durchgeführt.

Bei der genetischen Distanzberechnung wird paarweise die Distanz zwischen Individuen erhoben. Die Distanz jedes Individuums zu sämtlichen anderen erhobenen Individuen wird berechnet. Die daraus entstandene Distanzmatrix diente der Analyse der molekularen Varianz. Durch die AMOVA wurde die genetische Variation zwischen den österreichischen Populationen erhoben.

### 2.5.3.3 Genetische Differenzierung zwischen den Populationen und Standorten

Für die Analyse der Hauptkoordinaten (Principal Coordinates Analysis - PCoA) wurde ebenfalls eine Distanzmatrix benötigt. Die PCoA ist eine multivariate Analyseverfahren, die es ermöglicht, zuvor berechnete Distanzen zwischen den Individuen eines Datensatzes in Form von Punkten innerhalb eines zweiachsigen Koordinatensystems darzustellen. Die Koordinatenpunkte wurden pro Population in einer anderen Farbe und Form dargestellt, um die Ähnlichkeit beziehungsweise Differenz zwischen den österreichischen Populationen graphisch zu erfassen. Die Methode wurde auch auf die Populationen der drei Länder angewandt.

Um auch das Verwandtschaftsverhältnis zwischen den einzelnen Individuen aufzeigen zu können, wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Dieses Distanznetzwerk hilft, genetische Differenzierungen zwischen den Standorten, Populationen und Individuen aufzuzeigen und Klone leichter erkennbar zu machen. Das ist bei einer großteils vegetativ vermehrenden Art wie *Stratiotes* besonders informativ. Die Erstellung eines Dendrogrammes durch das Programm TreeCon beruht auf einer Neighbour-Joining Analyse. Die Matrize des gelben Primers NED-ACC, welcher die großgeographische Abgrenzung am besten darstellte, wurde in eine Text-Editor-Datei konvertiert. Der Bootstrapping-Wert wurde auf 100 festgelegt. Als Prozentsatz für die Anzeige einer wiederholten Generierung eines Astes wurde ein Mindestwert von 50% festgelegt. Hohe Bootstrappingwerte (über 70%) zeigen Zweige und Knoten mit einer hohen Zuordnungs-/Positionswahrscheinlichkeit im Dendrogramm an. Es wurde ein ungewurzelter phylogenetischer Baum nach der Neighbour-Joining Methode von NEI und LI (1979) konstruiert. Anhand eines ungewurzelten Baumes können keine phylogenetischen Entwicklungen, sondern nur wahrscheinliche Gruppierungen dargestellt werden (WÄGELE, 1999).

Für die Bearbeitung durch das Programm AFLPOP 1.1 wurde die 0/1 Matrize in Excel 2010 von einer horizontalen Darstellung in eine vertikale Darstellung der Individuen transponiert. Für die Re-Allocation wurden die drei Standorte Österreich, Deutschland und Niederlande separat abgespeichert und in das Programm geladen. Es wurden alle drei Primerkombinationen als Grundlage ausgewählt. Danach wurde mit Hilfe des Programms versucht, die einzelnen Individuen wieder den Standorten zuzuordnen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der die Software die Individuen einem Standort zuordnet, wird durch das Programm als Log-Likelihood angegeben. Als minimale Log-Likelihood Differenz zur Wiederzuordnung der Individuen wurde der Wert 2 gewählt. Die höchste Log-Likelihood muss daher mindestens hundert Mal höher sein als die zweitgrößte Log-Likelihood.

Da der autochthone Ursprung der Population Obere Placken nicht gewiss ist, wurde durch Allocation versucht, die genetische Verwandtschaftsbeziehung zu den autochthonen Populationen zu erheben. Die ex-situ Schutzsammelpopulation aus der Stopfenreuther Au, die Population des Ölhafens Lobau sowie die Individuen aus Eckartsau wurden als mögliche Herkünfte angegeben.

### 2.5.3.4 Herkunftsermittlung für die Gartenhandelsindividuen

Für die österreichischen und deutschen Gartenhandelsindividuen wurde ebenfalls versucht, den genetischen Ursprung herauszufinden und sie einem Flusssystem zuzuordnen. Bei der Allocation wurden die Unteren Donauauen (Eckartsau, Stopfenreuther Au), die Lobau (Tischwasser, Ölhafen Lobau), die Oberen Donauauen (Obere Placken), die Rheinpopulationen (Buitenpolder, Kranenburger Bruch, Neukirchen-Vluyn) und die Population der Eider (Eider-Niederungen) als mögliche Herkünfte angegeben. Wieder wurden alle drei Primerkombinationen für die Berechnung gewählt. Für die minimale Log-Likelihood wurde wieder der Wert 2 angegeben. Im Anschluss wurde versucht, die vier Handelsindividuen Österreichs und Deutschlands den vorgeschlagenen Herkünften zuzuweisen.

### 3 ERGEBNISSE

Mit Hilfe der Auswertungsprogramme wurde die regionale und überregionale genetische Diversität erhoben. Auch eine genetische Differenzierung zwischen den Populationen wurde durchgeführt. Die drei Primer produzierten insgesamt 1283 Banden. Der gelbe Primer lieferte 530, der blaue Primer 361 und der grüne Primer 392 Fragmentlängen. Nach der Entfernung der Marker 20-60, der monomorphen Marker und der Zusammenlegung einiger Marker, blieben 820 Marker übrig. Davon lieferte der gelbe Primer 363 Marker, 180 Marker wurden durch den blauen Primer und 277 Marker vom grünen Primer detektiert. Von den österreichischen Individuen wurden insgesamt 31 für eine Analyse ausgewählt. Von den deutschen Standorten wurden 18 Individuen für die Auswertung belassen. Sieben niederländische Individuen wurden für die Untersuchung herangezogen. Vier Handelsexemplare aus Österreich und Deutschland wurden ebenso untersucht.

#### 3.1 Genetische Diversität

Für die Berechnung des Polymorphiegrades wurden 437 Marker des Primers NED-ACC herangezogen. Im Vergleich der österreichischen Standorte hat die Population Obere Placken der Oberen Donauauen mit 40,73% (178 Loci) den geringsten Anteil polymorpher Loci. Der absolute und prozentuale Anteil polymorpher Loci ist bei den Populationen Untere Donauauen und Lobau annähernd gleich. Die Populationen der Unteren Donauauen Stopfenreuther Au und Eckhartsau haben mit 74,37% (325 Loci) den höchsten Anteil polymorpher Marker. Die Lobau mit den Populationen Tischwasser und Ölhafen Lobau hat einen Anteil polymorpher Loci 73,91% (323 Loci). Die genetische Diversität ( $h$ ) und Shannon's Informations Index ( $I$ ) sind in der Tabelle 13 ersichtlich.

Tabelle 13: Deskriptiver Vergleich der genetischen Diversität innerhalb der österreichischen Standorte

	Obere Donau	Untere Donau	Lobau
<b>Individuen</b>	3	14	14
<b>Anteil polymorpher Loci</b>	178 = 40,73%	325 = 74,37%	323 = 73,9%
<b>genetische Diversität/Individuum (<math>h</math>) (NEI, 1973)</b>	0,181	0,206	0,1864
<b>Shannon's Information Index (<math>I</math>) (LEWONTIN, 1972)</b>	0,2593	0,325	0,301

Im großgeographischen Vergleich lag der Anteil polymorpher Loci von *Stratiotes aloides* in Österreich bei 95,28% (424 Loci) im Rheingebiet Deutschlands bei 35,51% (258 Loci), im

Gebiet der Eider in Deutschland bei 14,61% (65 Loci) und in den Niederlanden im Gebiet des Rheines bei 23,82% (106 Loci). Beim Vergleich der Individuen der beiden Flusssysteme Donau und Rhein lag der Anteil polymorpher Loci bei den Populationen der Donau (424 Loci/ 95,50%) deutlich über dem Wert der rheinländischen Populationen in Deutschland und den Niederlanden (174 Loci/ 39,19%). Die durchschnittliche genetische Diversität pro Individuum nach Nei und der Shannon's Informations Index für die Flusssysteme Donau und Rhein sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Deskriptiver Vergleich der genetischen Diversität von *Stratiotes* zwischen den Flusssystemen Donau und Rhein

	Populationen Donau	Populationen Rhein
Individuen	31	22
Anteil polymorpher Loci	424 = 95,50%	174 = 39,19%
genetische Diversität/Individuum (h) (NEI, 1973)	0,2116	0,1133
Shannon's Information Index (I) (LEWONTIN, 1972)	0,346	0,1748

### 3.2 Ergebnisse der AMOVA

Die AMOVA ergab, dass mit 85% der Großteil der erhobenen Unterschiede auf Variabilität zwischen den Individuen zurückzuführen ist. Der Prozentsatz genetischer Varianz zwischen den österreichischen Populationen beträgt 15%. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der AMOVA.

#### Percentages of Molecular Variance

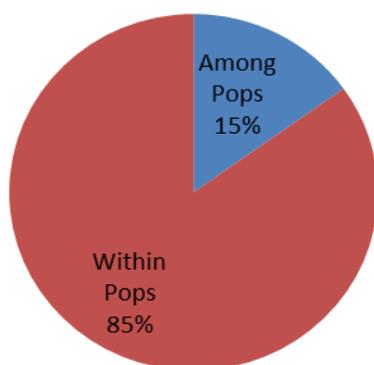


Abbildung 12: Ergebnis der AMOVA

### 3.3 Ergebnisse der Principal Coordinates Analysis (PCoA)

#### 3.3.1 Ergebnis der PCoA für Österreich

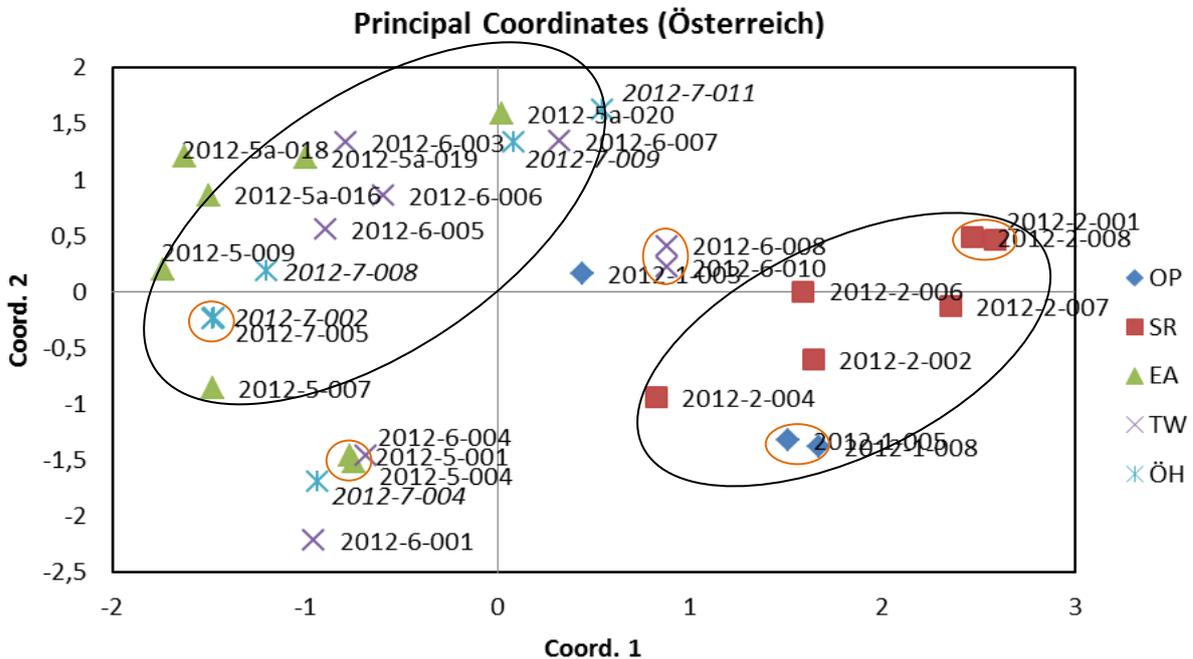


Abbildung 13: PCoA der Marker der Primer VIC und FAM für die Populationen Österreichs

Um die genetische Beziehung zwischen den Populationen Österreichs darzustellen, wurde eine PCoA durchgeführt. Abbildung 14 zeigt die PCoA des Standortes Österreich. Der Primer NED-ACC führte bei der geographischen Abgrenzung innerhalb der österreichischen Bestände zu keinem klaren Ergebnis. In der PCoA der Kombination der drei Primer führte der Primer NED-ACC zu einer größeren Streuung zwischen den Koordinatenpunkten, ohne dass dadurch Populationsgruppierungen klarer ersichtlich wurden. Der kumulierte Prozentsatz an Variation erklärt über die Achsen 1 und 2 betrug nur 24%. Die Entfernung dieses Primers führte zu einer besseren Darstellung der Populationsgruppierungen und zu einer niedrigeren Distanz zwischen den Individuen. Für die Berechnung der genetischen Distanz innerhalb Österreichs wurden deshalb nur die beiden Primer VIC-ACG und FAM-ACA herangezogen. Die Achse 1 erklärt 17,03%, die Achse 2 11,47% der Variation. Für die Verteilung der Individuen in der Distanzmatrix war in der österreichischen Population hauptsächlich der grüne Primer VIC-ACG verantwortlich. Eine klare Abgrenzung der Populationen ist nicht möglich. Die Individuen der Eckhartsau gruppieren sich zusammen mit der Population Ölhafen links der Achse 1. Die Population Obere Placken befindet sich zusammen mit der ex-situ Schutzsammlung aus der Stopfenreuther Au rechts der Achse 1. Die Individuen aus dem Tischwasser bilden kein Cluster und können keiner Gruppierung zugeordnet werden. Die Individuen der Populationen liegen im Koordinatensystem nicht eng, geklumpt bei einander, sondern sind teilweise weit voneinander entfernt. In jeder Population

findet sich -orange gekennzeichnet- ein Individuen-Paar, welches im Koordinatensystem sehr nahe bei einander liegt. Die Koordinatenpunkte der Individuen 2012-7-002 und 2012-7-005 liegen deckungsgleich übereinander.

### 3.3.2 Ergebnis der PCoA für Österreich, Deutschland und die Niederlande

Die genetische Untersuchung der Populationen in Österreich, Deutschland und den Niederlanden mittels einer weiteren PCoA führte zu einer deutlichen Abgrenzung der österreichischen Populationen gegenüber jenen aus den Niederlanden und Deutschland. Eine Unterscheidung zwischen den Standorten Deutschlands und der Niederlande war nicht möglich. Der Primer NED-ACC war maßgeblich für die großgeographische Abgrenzung der Standorte Österreich, Deutschland und Niederlande verantwortlich. Das Koordinatenbild, welches die PCoA des gelben Primers lieferte, war dem Koordinatenbild der PCoA aller drei Primer am ähnlichsten. Abbildung 15 zeigt die Koordinatendarstellung der PCoA der Gesamtheit aller Marker der drei Primer NED-ACC, VIC-ACG, FAM-ACT. 14,96% der Variation werden über die Achse 1 und 9,32% über die Achse 2 erklärt. Die Achse 1 trennt die Standorte Niederlande und Deutschland im linken Bereich des Koordinatensystems vom Standort Österreich im rechten Teil des Koordinatensystems ab. Die Populationen aus Deutschland und den Niederlanden lassen sich nicht voneinander abgrenzen. Die Bestände des Rheins und der Eider liegen ebenfalls in einem Cluster zusammen. Auffallend ist die wesentlich weitere Verteilung der österreichischen im Gegensatz zu den deutsch-niederländischen Clusterpunkten.

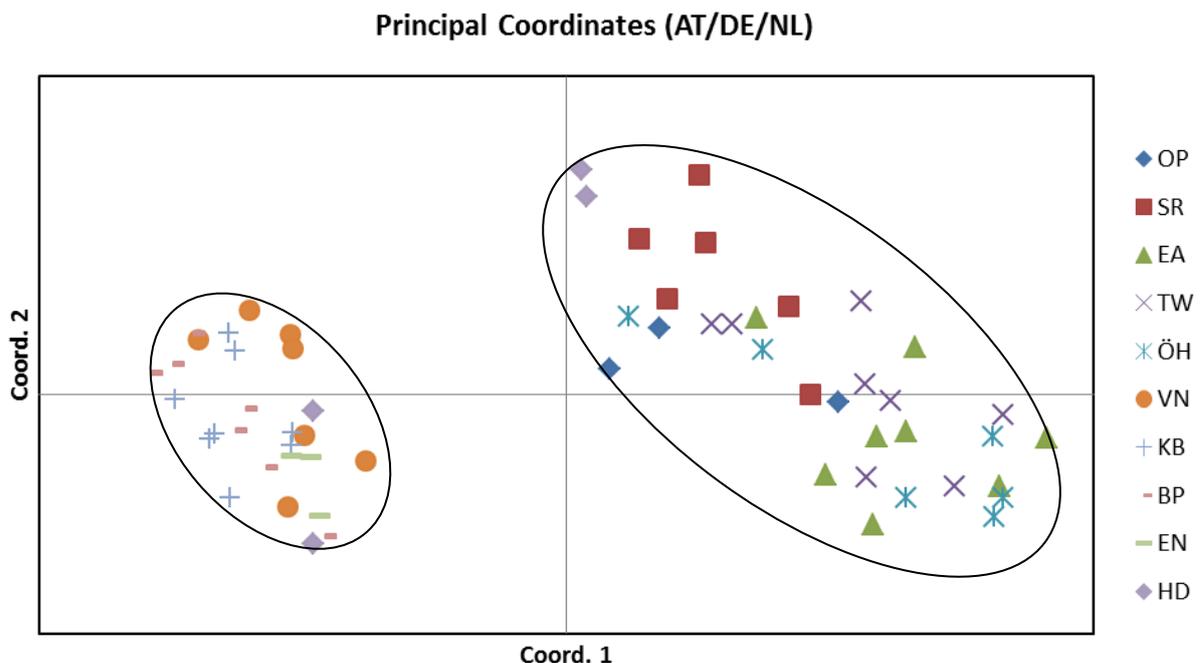


Abbildung 14: PCoA der Marker der drei Primer NED, FAM, VIC für alle Populationen der Standorte Österreich, Deutschland, Niederlande

### 3.3.3 Ergebnis der PCoA für die Handelspopulationen

Abbildung 16 zeigt die genetische Einordnung der Handelsexemplare zu den Flusssystemen Donau, Rhein und Eider. Die zwei Handelsindividuen aus Deutschland finden sich links der 1. Hauptachse zusammen mit den deutschen und niederländischen Individuen. Die österreichischen Handelsexemplare befinden sich rechts der 1. Hauptachse zusammen mit den österreichischen Beständen. Die österreichischen Handelsindividuen der Firma Hameter liegen sehr eng gruppiert zusammen. Die Handelsexemplare aus Deutschland, welche aus verschiedenen Gartenhandelsgeschäften stammen, sind auch genetisch weiter voneinander entfernt.

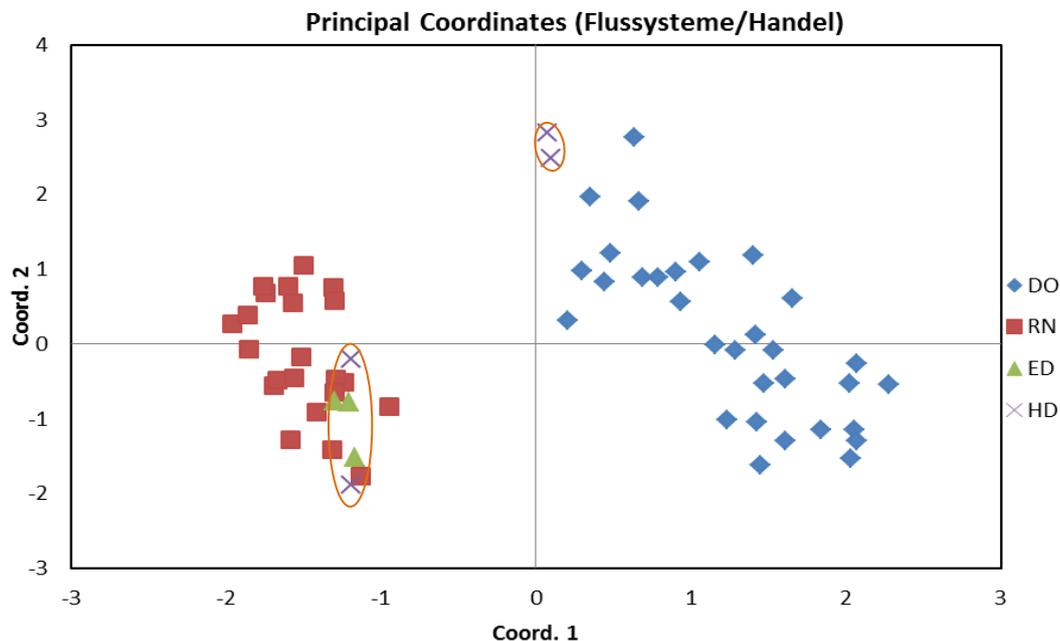


Abbildung 15: Vergleich der Handelspopulationen mit den Flusssystemen

### 3.4 Ergebnis der Neighbour-Joining Analyse der Standorte Österreich, Deutschland und Niederlande

Das Ergebnis der Neighbour-Joining Analyse ist in Abbildung 17 zu sehen. Für die Erstellung des Dendrogrammes wurde der Primer NED-ACC, der für die großgeographische Abgrenzung in der PCoA hauptverantwortlich war, herangezogen. Mit einer 91%igen Wiederholungsrate teilt sich der deutsch-niederländische Knotenpunkt des phylogenetischen Stammbaumes von den österreichischen Individuen 2012-5-004 und 1012-1-008 ab. Die österreichischen Individuen 2012-5-004 und 1012-1-008 und 2012-1-005 befinden sich auf einem gemeinsamen Knoten mit den deutschen und niederländischen Individuen, der sich mit einem niedrigen Bootstrappingwert (unter 50) von den restlichen österreichischen Individuen abgrenzt. Eine deutliche Abgrenzung der norddeutschen Population aus den

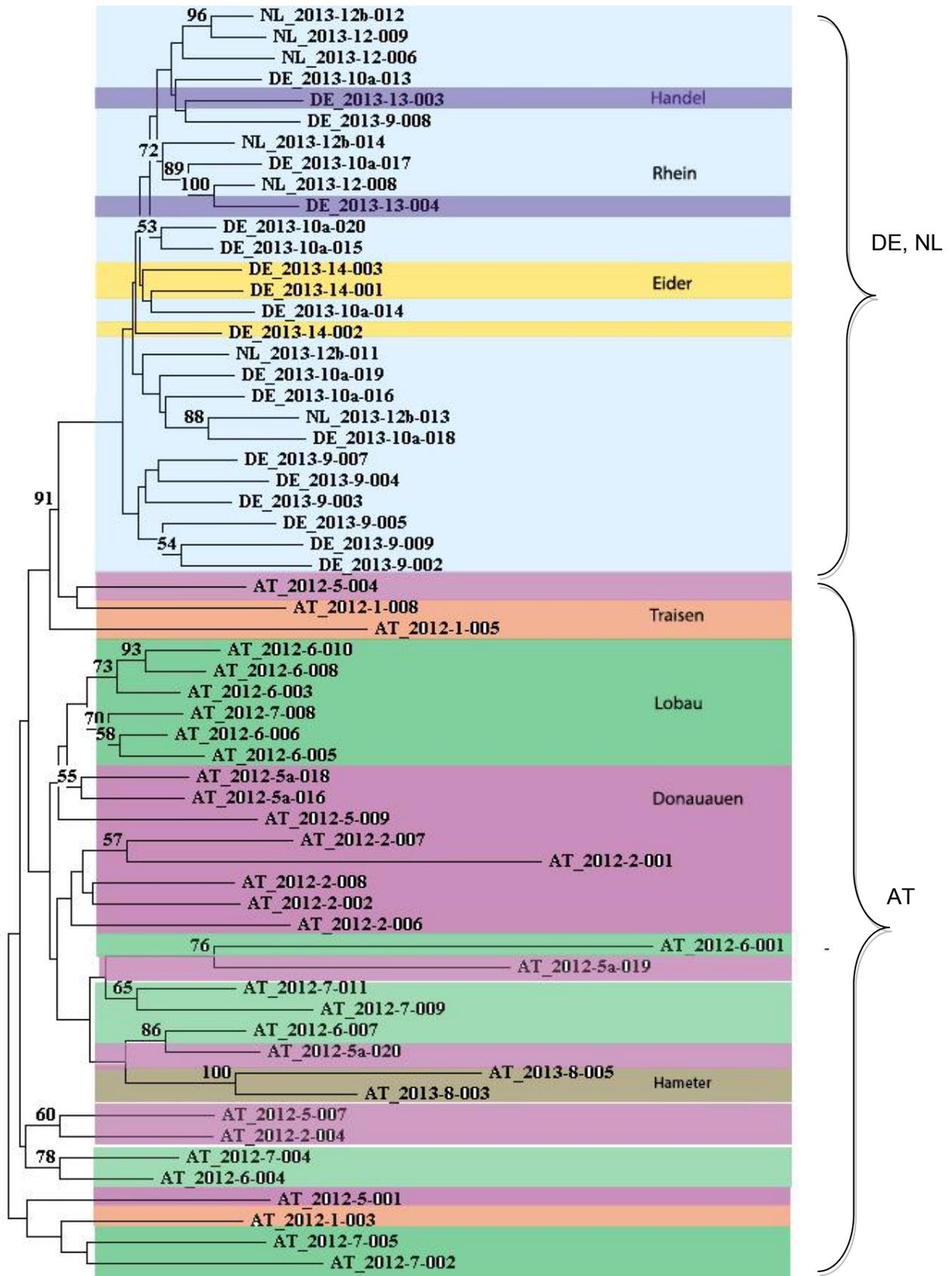


Abbildung 16: Neighbour-Joining Baum des Primers NED-ACC

Eider-Niederungen von den Populationen am Rhein ist nicht möglich. Die Population grenzt sich mit einer unter 50% liegenden Wiederholungshäufigkeit von den anderen Individuen ab. Einzelne Individuen-Paare innerhalb der Populationen zeigen wie bereits in der PCoA eine hohe genetische Ähnlichkeit. Die Population der Eider lässt sich nicht eindeutig von den Individuen des Rheins trennen. Einzelne Populationen lassen sich weder in Österreich, Deutschland noch in den Niederlanden mit einem über 50% gelegenen Bootstrappingwert abgrenzen.

Bei den rheinländischen Beständen in den Niederlanden sowie im Tischwasser in der Lobau finden sich einzelne Individuen-Paare mit einer hohen Ähnlichkeit. Die Individuen aus dem Gartenhandel „Hameter“ zweigen sich mit einer Wiederholungshäufigkeit von 100% von den Individuen der Lobau und der Donauauen ab. Die Individuen 1012-6-010 und 1212-6-008 befinden sich auf einem gemeinsamen Knoten, der mit einer 93-prozentigen Wiederholungsfrequenz dargestellt wurde. Die niederländischen Exemplare 2013-12b-012 und 2013-12-006 bilden einen Knoten mit einer Häufigkeit von 96%. Von insgesamt 56 Knoten weisen nur 20 Knoten einen Bootstrappingwert über 50% auf.

### 3.5 Ergebnisse der Allocation und Re-Allocation

#### 3.5.1 Ergebnis der Re-Allocation für die Individuen der Standorte AT, DE und NL

Durch Re-Allocation durch das Programm AFLPOP 1.1 für die Standorte Österreich, Deutschland und Niederlande konnten circa 90% der Individuen ihren Herkünften zugewiesen werden. Die Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Re-Allocation. Die Re-Allocation wurde mit allen drei Primerkombinationen durchgeführt. Die österreichischen Individuen konnten zur Gänze wieder den Standorten zugeteilt werden. Von den sieben niederländischen Individuen wurden vier Exemplare dem Standort Deutschland und zwei den Niederlanden zugeordnet. Ein niederländisches sowie ein deutsches Individuum konnten keinem Standort zugeordnet werden.

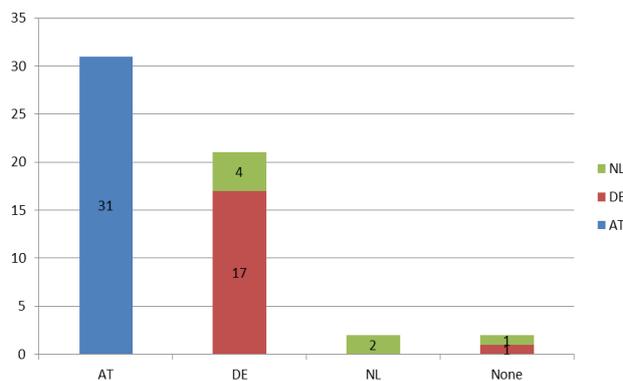


Abbildung 17: Ergebnis der Wiederzuordnung der Populationen AT, DE, NL

### **3.5.2 Ergebnis der Allocation für die Individuen des Standortes Obere Placken**

Die Allocation des Standortes Obere Placken ergab die Zuordnung eines Individuums zum autochthonen Bestand des Ölhafens Lobau und zweier Individuen zur ex-situ Schutzsammlung aus der Stopfenreuther Au.

### **3.5.3 Ergebnis der Allocation für die Handelsindividuen**

Durch Allocation der Handlsexemplare wurden alle Individuen (2) des österreichischen Gartenhandels „Hameter“ dem Flusssystem Donau und alle Exemplare (2) aus Deutschland dem Flusssystem Rhein zugeordnet. Innerhalb des Flusssystems Donau wurden die österreichischen Handlsexemplare dem Standort Untere Donauauen zugeordnet.

## 4 DISKUSSION

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse für die genetische Diversität und Differenzierung der österreichischen Bestände diskutiert. Die genetische Diversität zwischen den Beständen Österreichs, Deutschlands und der Niederlande wird verglichen und die Differenzierung zwischen den Standorten, den Beständen und innerhalb der Bestände bewertet und begründet. Die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen werden geprüft und gegebenenfalls verifiziert oder falsifiziert.

### 4.1 Vergleich der österreichischen Populationen

#### 4.1.1 Diskussion der genetischen Diversität

Der Anteil polymorpher Loci ist in den Unteren Donauauen mit 74,37% am höchsten. Hierbei ist jedoch die Stichprobengröße zu berücksichtigen, da die Intrapopulationsvariabilität bei einer geringeren Stichprobenzahl deutlich abnimmt (SOLKAL und ROHLF, 2012). Die Anzahl der Individuen in den Unteren Donauauen und in der Lobau ist mit jeweils 14 Individuen fast fünf Mal so hoch wie in den Oberen Donauauen (3 Individuen). In den Unteren Donauauen und in der Lobau wurden jeweils zwei Populationen besammelt, wohingegen in den Oberen Donauauen nur eine Population (nur eine Population vorhanden) untersucht wurde. Die circa 45% höhere genetische Diversität der beiden Standorte kann dadurch erklärt werden.

Die Untersuchungen der genetischen Diversität nach Nei und Shannon's Informations Index ergaben, dass diese ebenfalls am Standort Untere Donauauen am höchsten sind. Da ein Teil des untersuchten Standortes Untere Donauauen die Schutzsammlung aus der Stopfenreuther Au beinhaltet, kann anhand der Ergebnisse angenommen werden, dass die Schutzsammlungspopulation immer noch über eine hohe genetische Diversität verfügt. Da die Schutzsammlungspopulation nur einen Teil des ursprünglichen Pflanzenmaterials (genetischer Flaschenhals) der rezent ausgestorbenen Stopfenreuther Au-Population umfasst, ist die Gefahr einer genetischen Verarmung bei dieser Population besonders hoch (GABRIEL, 1994). Die Ergebnisse der Untersuchung der genetischen Diversität lassen darauf schließen, dass sich die ex-situ Population rezent in einem guten Zustand befindet.

#### 4.1.2 Diskussion der AMOVA und der PCoA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde angenommen, dass, wegen des klonalen Wachstums und der fehlenden generativen Vermehrung (monoklonale/oligoklonale Bestände), innerhalb der Populationen die genetische Diversität gering ist und dass die genetische Diversität zwischen den Populationen, wegen der geographisch isolierten Entwicklung der Bestände höher ist (Hypothese 1).

In Anbetracht dieser Überlegungen sind die Ergebnisse der AMOVA überraschend. Mit 85% ist der Großteil der genetischen Diversität auf Unterschiede innerhalb der Populationen zurückzuführen. Nur 15% sind auf genetische Unterschiede zwischen den Populationen zurückzuführen. Die von JORDAN et al. (2010) durchgeführte AMOVA für das Projekt der Bundesstiftung Umwelt führte zu ähnlichen Ergebnissen. Hier betrug die Variabilität zwischen den Populationen 12%. Dies entspricht dem von uns gefundenen Wert der genetischen Diversität zwischen den österreichischen Populationen. Als mögliche Begründung wurde hier eine mangelnde Differenzierung der Bestände angegeben. Auch in Österreich war eine klare Abgrenzung zwischen den Populationen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Die fehlende Populationsstruktur kann möglicherweise durch populationshistorische Zusammenhänge erklärt werden. Die rezenten Populationen stellen Relikte von ehemals großen, zusammenhängenden Beständen dar, weshalb eine genetische Differenzierung schwer möglich ist. Ein anderer möglicher Grund für die durch die AMOVA aufgezeigte Diversität innerhalb der Bestände ist, dass die genetische Vielfalt zwischen den österreichischen Krebscherenindividuen größer ist, als bislang angenommen wurde. Auch das Ergebnis der Berechnung polymorpher Loci lässt darauf schließen, dass die Diversität mit rund 74% in den Unteren Donauauen und der Lobau für diese, sich hauptsächlich vegetativ vermehrende, Art ungewöhnlich hoch ist. Insbesondere da eine Verbreitung von Individuen durch Verdriften bei Überschwemmungsereignissen durch die Regulierung des Donaustromes stark reduziert ist, ist das Ergebnis überraschend.

Weshalb also ist die genetische Diversität innerhalb der Populationen so hoch? Auch hier liegt eine mögliche Erklärung in der historischen Verbreitung der Art. Die Gattung *Stratiotes* existiert seit mehreren Millionen Jahren (Eozän). Ein historisches Vorkommen beider Geschlechter der Krebschere entlang der Donaustaaten wurde von COOK und URMI-KÖNIG (1983) durch fossile Funde belegt. Vor rund 170 Jahren war die *Stratiotes aloides* in den Donaugebieten noch herdenweise anzutreffen. Sowohl männliche als auch weibliche Individuen waren damals in Österreich heimisch. In dieser Zeit dürfte sowohl Genfluss durch Verdriftung von Individuen bei Überschwemmungsereignissen als auch eine sexuelle

Vermehrung möglich gewesen sein. Durch diese Voraussetzungen konnte sich über hunderttausende Generationen ein großer Genpool bilden.

Auch die PCoA ergibt keine deutliche Abgrenzung zwischen den österreichischen Populationen. Da die Individuen der einzelnen Bestände nicht wie bei monoklonalen Beständen geklumpt, sondern in unterschiedlicher Distanz zueinander liegen, scheinen sie nicht den gleichen genetischen Ursprung zu besitzen. Nur einzelne Individuen-Paare innerhalb der Bestände liegen sehr eng beieinander, was auf ein enges Verwandtschaftsverhältnis (klonale Individuen) schließen lässt.

Die Ergebnisse der Berechnung der genetischen Diversität, der AMOVA und der PCoA lassen darauf schließen, dass die österreichischen Reliktbestände nicht, wie angenommen, monoklonal beziehungsweise oligoklonal sind. Durch die hohe genetische Diversität innerhalb der Populationen kann angenommen werden, dass die Bestände polyklonal sind. Die Populationen dürften sich also nicht jeweils aus einem einzelnen männlichen, oder weiblichen Individuum klonal entwickelt haben, sondern unterschiedlichen genetischen Ursprungs sein. Anders als bei den von KOPPITZ et al. (2000) untersuchten *Phragmites australis* (windbestäubt+windverbreitet) Beständen, bei denen sich nach der Phase der Besiedelung (hohe genetische Diversität) nur einige geeignete Klone durchsetzen und so der Grad der genetischen Diversität mit der Zeit in den Beständen abnimmt, lässt die genetische Diversität der *Stratiotes*-Reliktbestände darauf schließen, dass die Bestände sehr alt sind. Ihre überraschend hohe genetische Diversität kann auf den, in früheren Zeiten möglichen, Genfluss (sexuelle Reproduktion/ Transfer von Individuen durch Überschwemmungen) zurückgeführt werden. Die Hypothese 1 kann widerlegt werden: Eine sexuelle Fortpflanzung in und zwischen den Beständen ist vermutlich rezent in Österreich nicht möglich. Die hohe genetische Diversität innerhalb der Reliktbestände könnte jedoch in einem großen, durch die Evolution geschaffenen Genpool begründet liegen. Auf methodische Ursachen, die hier möglicherweise eine Rolle spielten, wird in Kapitel 4.4.2 eingegangen.

### **4.1.3 Autochthone Herkunft des Bestandes Obere Placken**

Da die autochthone Herkunft des Pflanzenmaterials der Population Obere Placken nicht restlos geklärt ist, wurde die genetische Verwandtschaft zu den anderen Donauau-Populationen untersucht. Durch die Populations-Assignment Software AFLPOP 1.1 (Allocation) wurden zwei Individuen des Bestandes der autochthonen ex-situ Schutzsammlung aus der Stopfenreuther Au und ein Individuum der autochthonen Population Ölhafen Lobau zugeordnet. Auch in der PCoA ist die genetische Nähe zwischen

diesen Beständen erkennbar. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Pflanzenmaterial der Oberen Placken autochthonen Ursprungs ist.

Die Berechnung polymorpher Loci ergab für den Bestand eine um circa 45% geringere genetische Diversität. Um genauere Angaben hierzu machen zu können, bedarf es eines größeren Stichprobenumfanges. Die geringere genetische Diversität könnte neben der geringen Stichprobenanzahl darin begründet liegen, dass der Bestand stark von den anderen Populationen isoliert ist (rund 55 km zu den Beständen der Lobau - siehe Kapitel 2.1.3).

### **4.1.4 Abgeleiteter Folgen für den Naturschutz**

Die erhobenen Daten zeigen nur den derzeitigen Stand der genetischen Diversität und Differenzierung der Bestände. Es können keine Aussagen getroffen werden, ob die Diversität innerhalb der Populationen während der letzten Jahre zurückgegangen ist und die mittlere Fitness der Populationen möglicherweise bereits abgenommen hat.

Wie zu Anfang erwähnt, sind der Erhalt von genetischer Diversität und damit die Anpassungsfähigkeit für das langfristige Überleben einer Art wichtige Voraussetzungen. Für die Untersuchung vom Aussterben bedrohter Arten mit ehemals großen Beständen wie *Stratiote aloides*, ist die Beachtung der aktuellen genetischen Diversität besonders wichtig, denn ihr Genpool ist bereits durch einen genetischen Flaschenhals gegangen.

Da sich die Krebschere vorwiegend asexuell vermehrt, findet kaum genetische Rekombination statt. Die Mutationslast ist bei sich vegetativ vermehrenden Arten besonders hoch, denn die Nachkommen tragen jedenfalls die gleiche wie, teilweise aber auch eine höhere Mutationslast als, die Elternindividuen. Die Mutationslast für die Tochtergeneration kann nicht wie bei sich sexuell fortpflanzenden Arten durch Rekombination verringert werden. Nur durch Selektionsmechanismen können schädliche Mutationen vom Rest der Population ferngehalten werden. Werden die Umweltbedingungen für eine Art durch naturschutzfachliche Eingriffe verbessert, so kann das in weiterer Folge zu einer Verringerung des Selektionsdrucks führen. Nicht rezessive, subletale Mutationen können sich daher in der Population eher behaupten. Die mittlere Fitness einer Population reduziert sich dadurch (GABRIEL, 1994). GABRIEL (1994, 164) beschreibt die naturschutzfachliche Zwickmühle wie folgt: „Eine Verbesserung der Fitness der Einzelindividuen kann zu einem erhöhten Aussterberisiko der Population führen.“ Dieser schleichende Fitnessverlust kann lange Zeit ohne Auswirkungen bleiben, bis der Verlust an mittlerer Fitness einen Schwellenwert überschreitet. Die Population kann dann schlagartig aussterben.

Die Anhäufung subletaler Mutationen und der einhergehende Fitnessverlust wurden von GABRIEL und LYNCH (1990) als *Mutational Meltdown* beschrieben. Das Wissen über die vorhandene genetische Diversität innerhalb der Krebscherenpopulationen in Österreich stellt daher eine wichtige Information für erhaltende Maßnahmen im Naturschutz dar. Für naturschutzfachliche Maßnahmen, wie beispielsweise die Verbesserung und Optimierung der Standortbedingungen in den verlandungsgefährdeten Beständen, sollte dies mitberücksichtigt werden.

Auch durch Stressfaktoren (suboptimale Umweltbedingungen z.B. Verlandungsgefahr) kann es in polyklonalen Populationen zu einer Reduzierung der ökologischen Plastizität und genetischen Diversität kommen. Einige Klone verschwinden durch den Einfluss von Stressfaktoren. Ihr Platz kann durch an die Stressfaktoren angepasste, vegetativ expandierende Individuen übernommen werden. KOPPITZ und NEUHAUS (1993) beschrieben dieses Phänomen an *Phragmites australis*.

Da selbst durch das Spitzenhochwasser an der Donau im Sommer 2013 in den untersuchten Populationen keine Anbindung der Gewässer an die überschwemmten Auebereiche erfolgte (HUDLER, mündliche Mitteilung) und damit eine Verfrachtung von Krebscherenindividuen selbst bei diesem Hochwasserereignis nicht erfolgen konnte, ist eine natürliche Verbreitung von Individuen der untersuchten Bestände sehr unwahrscheinlich. Weil anhand der Ergebnisse davon ausgegangen werden kann, dass die untersuchten Bestände autochthonen Ursprungs sind, könnten im Rahmen naturschutzfachlicher Ausgleichsmaßnahmen eine Verbreitung und ein Austausch von Individuen der autochthonen Populationen durch den Menschen erfolgen. Somit würde ein Genfluss zwischen den Populationen wieder hergestellt werden. Das Fehlen von Dispersion durch natürliche Flusssdynamik könnte somit teilweise ausgeglichen werden.

## 4.2 Vergleich der Standorte Österreich, Deutschland und Niederlande

### 4.2.1 Diskussion der genetischen Diversität

Der Anteil polymorpher Loci ist im Vergleich der Standorte Österreich, Deutschland (Rhein), Niederlande (Rhein) und Deutschland (Eider) in Österreich mit 95,28% (424 Loci) am höchsten. Auch Shannon's Informations Index und die genetische Diversität nach Nei sind in den österreichischen Populationen am höchsten. Die Population der Eider weist mit 14,61% polymorphen Loci (65 Loci) den geringsten Anteil auf. Zu beachten ist wiederum der ungleiche Stichprobenumfang (siehe Kapitel 4.1.1) von 31 (Österreich) zu 3 Individuen

(Deutschland, Eider). Um die genetische Diversität für die Population Eider-Niederungen genauer bestimmen zu können, bedürfte es einer größeren Probenanzahl.

Mit 95,50% (424 Loci) ist der Anteil an polymorphen Loci der Donaupopulationen im Vergleich zu den rheinländischen Populationen (39% = 174 Loci) höher. Auch Shannon's Informations Index ( $I = 0,346$ ) und die genetische Diversität nach Nei ( $h = 0,2116$ ) sind hier höher als bei den Populationen am Rhein. Die von LAMBERTINI et al. (2007) durchgeführten Untersuchungen zwischen *Phragmites australis* Beständen ergaben für die ebenfalls hauptsächlich klonal fortpflanzende Wasserpflanze ähnliche Werte. Die Stichprobengröße ist in den rheinländischen Populationen ein wenig niedriger (Donau: 31 Individuen, Rhein: 22 Individuen). Die Anzahl der Individuen ist jedoch ausreichend, um für die Rheinländischen Populationen von einer tatsächlich niedrigeren genetischen Diversität ausgehen zu können.

### **4.2.2 Diskussion der genetischen Differenzierung (PCoA, Neighbour-Joining, Re-Allocation)**

Da zwischen den Flusssystemen kein Austausch stattfindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit angenommen, dass sich die Populationen der besammelten Flusssysteme genetisch voneinander abgrenzen (Hypothese 2).

Die Individuen der Donau bilden ein eigenes Cluster und trennen sich in der PCoA klar von den Individuen des Rheins und der Eider ab. Die Population Eider Niederungen bildet mit den Populationen am Rhein ein gemeinsames Cluster und lässt sich nicht abgrenzen. Die weite Verteilung der Clusterpunkte der österreichischen Krebscherenindividuen, im Vergleich zur engen Gruppierung der deutsch-niederländischen Individuen, lässt darauf schließen, dass die genetischen Unterschiede innerhalb des Standortes Österreich größer sind. (Auf methodische Probleme wird, wie bereits erwähnt, in weiterer Folge eingegangen.) Die Ergebnisse der Berechnung polymorpher Loci für die Bestände von Rhein und Donau zeigen die gleichen Tendenzen. Die hohe genetische Verwandtschaft der nordrhein-westfälischen- mit den niederländischen Individuen, ist nicht verwunderlich, da alle Exemplare aus dem Rhein stammen und die geographische Distanz zwischen den deutschen und niederländischen Populationen gering ist (ca. 13 km). Die ex-situ Schutzsammelungsexemplare aus Neukirchen-Vluyn lassen sich zu den Individuen des Rheins zuordnen. Die fehlende genetische Abgrenzung der Krebscherenbestände, der rund 380 km voneinander entfernten, Populationen der Eider und des Rheins ist überraschend. Auch bei den Untersuchungen von EBERSBACH (2010) war keine klare Abgrenzung zwischen den Individuen aus den Gebieten Niederrheinland und Brandenburg - und somit auch keine

Differenzierung zwischen den Beständen der Flusssysteme – möglich. Aus der Population der Eider konnten nur drei Individuen für die Berechnungen herangezogen werden. Für eine genauere genetische Differenzierung der Individuen der Flusssysteme, sollten die Berechnungen mit einer größeren Stichprobenmenge erfolgen.

Das Ergebnis des durch Neighbour-Joining Analyse erstellten Dendrogrammes führte zu keiner deutlichen Abgrenzung der Flusssysteme. Die Population an der Eider lässt sich mit einem unter 50% liegenden Bootstrappingwert von den rheinländischen Populationen abgrenzen. Das Distanznetzwerk konnte leider weder die Flusssysteme der drei Standorte noch die Populationen mit einer ausreichenden (Bootstrappingwert über 50%) Sicherheit gruppieren. Der Grund für die schlechte Auflösung der Gruppen könnte in der Wahl des Primers liegen. Der Primer NED-ACC lieferte in der PCoA eine großgeographische Abgrenzung zwischen den Flusssystemen Donau und Rhein/Eider. Für eine genauere Abgrenzung zwischen den Donau-Populationen war der Primer VIC-ACG verantwortlich. Durch das Dendrogramm lassen sich vereinzelt zwischen Individuen hohe Verwandtschaftsgrade (klonale Strukturen) erkennen, wie beispielsweise bei den Gartenhandels-Exemplaren der Firma „Hameter“, sowie bei einzelnen Individuenpaaren der niederländischen Rhein-Populationen und der österreichischen Population Lobau.

Das Ergebnis der Re-Allocation der Individuen zu den Standorten Österreich, Deutschland und Niederlande zeigt, dass circa 90% der Individuen ihrer Herkunft zugeordnet werden können. Der Ursprung aller 31 österreichischen Individuen konnte durch die Re-Allocation erhoben werden.

Auf Grund der Ergebnisse der PCoA und der Re-Allocation kann die Hypothese 2 bedingt bestätigt werden. Durch die PCoA konnte eine Differenzierung zwischen den Flusssystemen Donau und Rhein/ Eider aufgezeigt werden. Eine Abgrenzung zwischen den Individuen der Flüsse Eider und Rhein war jedoch nicht möglich.

### 4.3 Diskussion der Handelsindividuen

Das Ergebnis der PCoA und der Allocation für die Gartenhandelsexemplare zeigt, dass alle Handelsindividuen den jeweiligen nächstgelegenen Flusssystemen zugeordnet werden können. Die Krebscherenexemplare entstammen also nicht anderen Ländern, oder Flusssystemen, sondern sind jeweils heimischer Herkunft. Die beiden Exemplare der Firma „Hameter“ sind einander genetisch sehr ähnlich und dürften klonalen Ursprungs zu sein.

## 4.4 Methodische Probleme

Durch die AFLP-Methode können in relativ kurzer Zeit viele Marker produziert werden. Im Rahmen dieser Masterarbeit war die Methode gut geeignet, da sie rasch zu Ergebnissen führte und vorab keine Marker vorhanden waren. Für längerfristige Projekte könnte es in der Populationsgenetik sinnvoll sein, mit Mikrosatelliten zu arbeiten, da viele Auswertungsprogramme ursprünglich für co-dominante Marker geschrieben wurden und ihre Anwendung für dominante Marker oft nicht geeignet ist (MEUDT und CLARKE, 2007; BONIN et. al., 2007).

### 4.4.1 Trocknung der Proben mit Silikagel

Für die Arbeit mit AFLP ist die Qualität der DNA der Proben sehr wichtig (MEUDT und CLARKE, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Pflanzenproben in Silikagel getrocknet, um später die DNA zu extrahieren. Proben, bei denen ein schnelles Trocknen nicht möglich war, zeigten bräunliche Verfärbungen und es bildete sich teilweise Schimmel. Dadurch kam es zu einem Abbau des Blattmaterials und der DNA. Bei Schimmelbefall kann dies sogar zur Mitextraktion von artfremder DNA führen. Beides hat zur Folge, dass die Qualität der DNA deutlich sinkt. Um die DNA nach der Probenahme bestmöglich zu erhalten, wäre das Tieffrieren der Proben in flüssigem Stickstoff die beste Methode (CHASE und HILLS, 1991). Diese Art der Probennahme ist für die Arbeit im Gelände jedoch kaum praktikabel.

### 4.4.2 Angewendete Extraktionsmethoden

Die meisten österreichischen Individuen wurden durch das Gerät QIAcube von QIAGEN maschinell extrahiert. Die im QIAcube extrahierten Pflanzenproben wurden bei einer Frequenz von 25 Hertz für 10 Minuten geschüttelt. Die dadurch entstandenen Scherkräfte könnten negativen Einfluss auf die Qualität der DNA gehabt haben. Eine schonendere Zerkleinerung des Pflanzenmaterials durch Mörsern per Hand war, wie bereits in Kapitel 2.3.1 erläutert, nicht möglich. Die Zerkleinerung des pflanzlichen Materials der deutschen und niederländischen Proben erfolgte somit zur Reduktion von Scherkräften bei reduzierter Frequenz und Dauer bei 20 Hertz für fünf Minuten. Ein Grund für den Qualitätsunterschied der Proben könnte auch in der Spülung der DNeasy Mini Spin Column-Membran während der Extraktion liegen. Die Membran wird mit 500µl AW-Puffer gespült. Bei einem färbigen Durchfluss kann die Spülung bei einer händischen Extraktion wiederholt werden. Bei einer maschinellen Extraktion wird die Membran nur einmal gespült. Die Ergebnisse der Nano-Drop Messung nach der Extraktion der DNA für die maschinell und händisch extrahierten

Proben zeigen deutlich unterschiedliche Werte und lassen auf einen Qualitätsunterschied zwischen den extrahierten Individuen schließen. Die Extraktion per Hand sowie eine Zerkleinerung der Probe bei reduzierter Frequenz dürften bei *Stratiotes aloides* zu einer höheren DNA-Qualität, sowie einer höheren DNA-Menge führen.

### **4.4.3 Verlässlichkeit der Ergebnisse**

Um die Qualität der AFLPs zu überprüfen, sollten mindestens 5-10% der Proben erneut ab der Einwaage der Proben bearbeitet werden. Die Proben sollten hierfür anonymisiert und in zufälliger Reihenfolge beschriftet werden. Die Wiederholung des AFLP-Verfahrens mit einem Teil der Proben ist die einzige objektive Möglichkeit, die Qualität und Verlässlichkeit der Resultate zu überprüfen, denn die Fehlerrate im AFLP-Prozess kann nicht direkt gemessen werden. Sie kann nur durch die Replikation des Verfahrens bei einer Untergruppe geschätzt werden (MEUDT und CLARKE, 2007). Einzelne oder mehrere Verfahrensschritte wurden im Rahmen der Laborarbeit mit einigen Individuen oder Populationen wiederholt, da die Agarosegelbilder, Nanodrop-Messwerte oder auch die Fragmentkurve nach der Auftrennung keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten. Auf Grund der längeren Optimierung der AFLP-Methodik für die Bearbeitung von *Stratiotes*-Proben (es wurde zum ersten Mal mit einer Wasserpflanze gearbeitet) war es im Rahmen dieser Masterarbeit nicht möglich, eine komplette Wiederholung aller Laborschritte bei 5-10% der Individuen durchzuführen. Dadurch kann zur Verlässlichkeit der Daten im Rahmen dieser Arbeit keine objektive Aussage getroffen werden.

## 5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der genetische Diversität und eine Differenzierung der letzten in Österreich existierenden autochthonen Bestände von *Stratiotes aloides*, sowie die genetische Differenz zwischen den Populationen Österreichs, Deutschlands und der Niederlande. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die genetische Diversität der relikttären Krebscherenbestände in Österreich überraschend hoch ist. Anders als vermutet dürften die Populationen nicht monoklonal beziehungsweise oligoklonal zusammengesetzt sein. Die Intrapopulations-Diversität lässt vermuten, dass die Bestände eine polyklonale Struktur aufweisen. Die untersuchten Populationen können auf Grund der Untersuchungen als autochthon angesehen werden. Eine klare genetische Abgrenzung zwischen den Populationen der Donau und der Bestände Rhein/Eider konnte gezeigt werden.

Um den Genfluss zwischen den österreichischen Populationen wieder zu ermöglichen, könnten autochthone Individuen im Zuge naturschutzfachlicher Maßnahmen von Hand in neue Gewässer und bestehende Populationen eingebracht werden. Zusätzlich könnte überlegt werden Individuen der beiden blühenden Bestände Ölhafen Lobau (männlich) und Obere Placken (weiblich) zusammenzuführen, um so eine generative Vermehrung wieder zu ermöglichen. Da jedoch innerhalb ihres natürlichen Verbreitungsgebietes in Europa die Krebschere auch bei Präsenz männlicher und weiblicher, blühender Individuen nur an wenigen Standorten vitale Samen produziert (SMOLDERS et al., 1995), ist der Reproduktionserfolg durch eine Zusammenführung männlicher und weiblicher Krebscherenexemplare ungewiss. Da die Gattung *Stratiotes* seit circa 48 Millionen Jahren existiert, könnte es auch möglich sein, dass für die Krebschere, innerhalb ihrer ökologischen Nische, eine generative Fortpflanzung nicht mehr nötig ist, da sie bereits optimal angepasst ist. (Die Voraussetzung für eine erfolgreiche, vegetative Verbreitung ist jedoch durch anthropogene Flussregulationen stark eingeschränkt).

Da europaweit an vielen Orten, an denen die Krebschere heimisch ist, ein Rückgang der Art verzeichnet werden kann, bedarf es einer Ausweitung der untersuchten Regionen und Populationen, um einen europaweiten Überblick über den Gefährdungsgrad der Art schaffen zu können. Eine genetische Analyse der Krebscherenbestände in den Altgewässern entlang des gesamten Donauverlaufes könne eine länderübergreifende Übersicht über die Vitalität und Diversität der bestehenden Populationen entlang des Flussverlaufes schaffen. Auch eine genetische Erforschung von Beständen in Regionen, in denen die Krebschere

nicht von Aussterben bedroht ist (zum Beispiel Polen), wäre als möglicher Referenzwert für vitale und fertile Populationen zu überlegen. Eine Erweiterung der genetische Untersuchungen an *Stratiotes aloides* durch die Etablierung von Mikrosatelliten im Rahmen zukünftiger Forschungstätigkeit, könnte helfen weitere Fragen über diese, genetisch wenig erforschte, Art zu beantworten und die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellten Theorien zu bestätigen.

## QUELLENVERZEICHNIS

BENNIKE, O. und HOEK, W. (1999) Late Glacial and early Holocene records of *Stratiotes aloides* L. from northwestern Europe. *Review of Palaeobotany and Palynology*, Vol. 107. S. 259–263.

BENSCH, S. und ÅKESSON, M. (2005) Ten Years of AFLP in Ecology and Evolution: Why so few Animals? *Molecular Ecology*. Vol. 14. S. 2899–2914.

BONIN, A.; EHRICH, D. und MANEL, S. (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: A toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, Vol. 16. S. 3737–3758.

CHASE, M. W. und HILLS, H. H. (1991) Silica Gel: An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. *Taxon: International Journal of Plant Taxonomy, Phylogeny and Evolution* Vol. 40. No. 2. S. 215-220.

COOK, C. und URMI-KÖNIG, K. (1983) A Revision of the Genus *Stratiotes* (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*, Vol. 16. S. 213-249.

DUCHESNE, P. und L. BERNATCHEZ. 2002. AFLPOP: A computer program for simulated and real population allocation based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, Vol. 3. S. 380-383.

HUDLER, A. (2014) Populationsbiologie und Gefährdung der Krebschere (*Stratoides aloides*) in Niederösterreich und Wien (Donau). Masterarbeit. in Bearbeitung. Universität für Bodenkultur.

JORDAN, R.; KESSEL, R. und KUNDEL, W. (2010) Erprobung von Managementmaßnahmen in Bremen zum Erhalt der Krebschere als Leitart für die ökologisch wertvollen Graben-Grünland-Gebiete der Kulturlandschaft Nordwestdeutschlands – Endbericht 2010. unveröffentlichter Bericht.

KOPPITZ, H.; KÜHL, H. und KOHL, J.G. (2000) Zur Bedeutung der genetischen Diversität von *Phragmites australis* für die Entwicklung von Schilfbeständen. In: Bundesamt für Naturschutz [Hrsg.]: Erfassung und Schutz der genetischen Vielfalt von Wildtierpopulationen.. Münster: Landwirtschaftsverlag. Schriftreihe für Vegetationskunde. Heft 32, S. 57-60.

KÜHL, H. und NEUHAUS, D. (1993) The genetic variability of *Phragmites australis* investigated by Random Amplified Polymorphic DNA. In: OSTERNDORP, W. KRUMSCHEID-PLANKERT, P. [Hrsg.]: Seeuferzerstörung und Seeuferrenaturierung in Mitteleuropa. Stuttgart: Gustav Fischer. *Limnologieaktuell*. Nr. 5, S. 9-18.

KÜRY, D. (2009) Krebschere (*Stratiotes aloides*) in Naturschutzweihern der Schweiz. *BAUHINIA*. Vol 21. S. 49–56.

LAMBERTINI, C.; GUSTAFSSON, M.H.G.; FRYDENBERG, J.; SPERANZA, M. und BRIX, H. (2007) Genetic Diversity Patterns in *Phragmites australis* at the population, regional and continental scales. *Aquatic Botany*. Vol. 88. S. 160-170.

LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J. und JAIN, S. K. (1994) *Conservation Genetics*. Basel: Birkhäuser Verlag.

MARKGRAF, F. und ZOLLER, H. (1981) *Gustav Hegi - Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Band 1. Teil 2. 3. überarbeitete Auflage. Berlin und Hamburg: Verlag Paul Parey.

MEUDT, H.M. und CLARKE, C. (2007) Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science*, Vol. 12, No. 3, S. 106-117.

MULDERIJ, G.; MOOIJ, W.M.; SMOLDERS, A.J.P. und VAN DONK, E. (2005) Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from *Stratiotes aloides*, *Aquatic Botany*. Vol. 82. S. 284–296.

MURÁNI, E. (2004) *Anwendung von AFLP zur Detektion von QTL für Schlachtkörperqualität beim Schwein*. Göttingen: Cuvillier Verlag.

NEI, M und LI, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (PNAS)*, Vol. 76, Nr.10, S. 5269–5273.

NIKLFIELD, H. und GRIMS, F. (1999): *Rote Listen gefährdeter Pflanzen Österreichs*. 2. neu bearbeitete Auflage. Graz: Austria Medien Service.

OELKE, M. (2003) *Untersuchungen zur genetischen Diversität am Beispiel der Segetalart Euphorbia exigua L. auf unterschiedlichen Standorten des Norddeutschen Tieflandes*. Diplomarbeit. Humboldtuniversität zu Berlin.

PAUN, O. und SCHÖNSWETTER, P. (2012) Amplified Fragment Length Polimorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods in Molecular Biology*, Vol. 862. S. 75-87.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. (2012) GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. Vol. 28. S. 2537-2539.

POTT, R. und REMY, D. (2000) *Gewässer des Binnenlandes*. Stuttgart: Ulmer Verlag.

ROSENTHAL, G. (2003) Bedeutung evolutionsbiologischer Prozesse für Landschaftsplanung und Naturschutz. *Natur und Landschaft*. Vol. 12, S. 497-565.

SARNEEL, J.M. (2010) *Colonisation processes in riparian fen vegetation*. Doktorarbeit. Utrecht Universität.

SCHRATT-EHRENDORFER, L. (1999) *Geobotanisch-ökologische Untersuchungen zum Indikatorwert von Wasserpflanzen und ihren Gesellschaften in Donaualtwässern bei Wien*.

In: Biologiezentrum Linz, Hrsg. Geobotanik und Ökologie der Donaualtwässer bei Wien (Wasser- und Verlandungsvegetation). unveröffentlichte Arbeit.

SMOLDERS, A.J.P; HARTOG, C und ROELOFS, J. G. M (1995) Germination and seedling development in *Stratiotes aloides* L. Aquatic Botany. Vol. 51. S. 269-279.

SMOLDERS, A.J.P; HARTOG, C. und ROEFELS, J.M.G. (1995) Observations on Fruiting and Seed-Set of *Stratiotes aloides* L. in the Netherlands. Aquatic Botany, Vol. 51. S. 259-268.

SMOLDERS, A.J.P; LAMERS, L. P. M., HARTOG, C. und ROEFELS, J.M.G (2003) Mechanisms involved in the decline of *Stratiotes aloides* L. in The Netherlands: sulphate as a key variable. Hydrobiologia, S. 603–610.

SOLKAL, R. R. und ROHLF, F. J. (2012) Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 4. überarbeitete Auflage. New York: Freeman.

TARKOWSKA-KUKURYK, M. (2006) Water Soldier *Stratiotes aloides* L. (Hydrocharitaceae) as a Substratum for Macroinvertebrates in a shallow eutrophic lake. Polish Journal of Ecology. Vol. 54, Nr. 3, S. 441-451.

VAN DE PEER, Y. und DE WACHTER, R. (1994) TreeCon for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Applic. Biosci. Vol 10. S. 569-570.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KULPER, M. und ZABEAU, M. (1995) AFPL: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. Vol. 23. No. 21. S. 4407-4414.

WÄGELE, J. W. (1999) Homologie, Apomorphien und Grundmuster in der molekularen Systematik (Vergleichende Analyse von DNA-Sequenzen aus phylogenetischer Sicht). In: Schmitt, M., Hrsg. Phylogenetik und Moleküle. 1. Band. Schwelm: Edition Archeae. S. 83-120. Verfügbar in: [http://www.museum-koenig.de/web/ZFMK\\_Mitarbeiter/WgeleJW/Publikationen/1999HomologienApomorphienundGrundmuster.pdf](http://www.museum-koenig.de/web/ZFMK_Mitarbeiter/WgeleJW/Publikationen/1999HomologienApomorphienundGrundmuster.pdf) [Abfrage am: 15.11.2013].

XU, Y. (1996) Tutorial: Capillary Electrophoresis. The Chemical Educator. Vol. 1, NO. 2. s.p. Verfügbar in: [http://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/CE\\_tutorial.pdf](http://www.colby.edu/chemistry/CH332/laboratory/CE_tutorial.pdf) [Abfrage am 17.10.2013].

YEH, FRANCIS C., YANG, R-C., BOYLE, TIMOTHY, B.J., YE, Z-H. und MAO, JUDY X. (1997) POPGENE 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta.

## VERWENDETE MANUALS

APPLIED BIOSYSTEMS (2007) AFLP® Plant Mapping- Protocol.

LIFE TECHNOLOGIES (2006) GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard.

Verfügbar in: [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_082407.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_082407.pdf) [Abfrage am: 30.10.2013].

LIFE TECHNOLOGIES (2013) Hi-Di™ Formamide. Verfügbar in:

<http://www.lifetechnologies.com/search/global/searchAction.action?query=HiDi&resultPage=1&resultsPerPage=15&autocomplete=> [ Abfrage am 28.12.2013].

THERMO SCIENTIFIC (2009) User Manual - NanoDrop 2000/2000c Spectrometer. Wilimington: Thermo Fisher Scientific.

THERMO SCIENTIFIC (2010) Nucleic Acid - Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. Verfügbar in:

[http://www.nanodrop.com/ND1/files/nanodrop\\_nucleicacid\\_olv\\_rev\\_3\\_11\\_r.pdf](http://www.nanodrop.com/ND1/files/nanodrop_nucleicacid_olv_rev_3_11_r.pdf) [Abfrage am 01.10.2013].

QIAGEN (2006) DNeasy Plant Handbook.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ableger- und Turionbildung bei einer Krebschere (HUNDLER, 2013).....	2
Abbildung 2: Der Jahreszyklus der Krebschere (POTT UND REMY, 2000).....	5
Abbildung 3: Verbreitung von <i>Stratiotes aloides</i> in Europa ●weibliche ▲männliche Pflanzen (modifizierte Grafik nach COOK und URMI-KÖNIG, 1983).....	6
Abbildung 4: Probenstandorte in Wien und Niederösterreich .....	10
Abbildung 5: Probenstandorte in Österreich, Deutschland und den Niederlanden.....	12
Abbildung 7: 0,8% Gelbild nach der Extraktion.....	17
Abbildung 8: Schnittstellen des EcoRI und MseI Enzymes (NEW ENGLAND BIOLABS, 2013).....	18
Abbildung 9: Agarosebild der Restriktion und Ligation .....	20
Abbildung 10: Gelbild der präselektiven Amplifikation .....	21

Abbildung 11: Basengrößen des Größenstandards LIZ 600 (LIFE TECHNOLOGIES, 2006) .....	25
Abbildung 12: Ausfälle der Population Wesermarsch auf dem Agarosebild der Restriktion und Ligation.....	28
Abbildung 13: Ergebnis der AMOVA .....	33
Abbildung 14: PCoA der Marker der Primer VIC und FAM für die Populationen Österreichs	34
Abbildung 15: PCoA der Marker der drei Primer NED, FAM, VIC für alle Populationen der Standorte Österreich, Deutschland, Niederlande.....	35
Abbildung 16: Vergleich der Handelspopulationen mit den Flusssystemen .....	36
Abbildung 17: Neighbour-Joining Baum des Primers NED-ACC .....	37
Abbildung 18: Ergebnis der Wiederzuordnung der Populationen AT, DE, NL .....	38

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Entfernungen zwischen den untersuchten Populationen in Niederösterreich und Wien.....	11
Tabelle 2: Anzahl, Status und Flusssystem der entnommenen Proben.....	13
Tabelle 3: Reagenzien und Mengenangaben pro Probe für die Restriktion und Ligation.....	18
Tabelle 4: Nukleinbasensequenz der Adaptorpaare EcoRI und MseI .....	19
Tabelle 5: Chemikalien und Mengen der präselektiven Amplifikation pro Probe.....	20
Tabelle 6: Stadien der präselektiven PCR im Cyclor .....	21
Tabelle 7: Übersicht der EcoRI-und MseI-Primerkombinationen .....	22
Tabelle 8: Nukleinbasenfolge der ECO-Primer NED,VAM,VIC sowie des MSE-Primers M59 .....	23
Tabelle 9: Chemikalienzusammensetzung pro Probe für die selektive Amplifikation.....	24
Tabelle 10: Zyklen der selektiven PCR.....	24

Tabelle 11: Run Parameter der AFLP-Läufe .....	26
Tabelle 12: Mustermatrize mit Mittelwerten der Marker .....	29
Tabelle 13: Deskriptiver Vergleich der genetischen Diversität innerhalb der österreichischen Standorte.....	32
Tabelle 14: Deskriptiver Vergleich der genetischen Diversität von <i>Stratiotes</i> zwischen den Flusssystemen Donau und Rhein .....	33

# ANHANG

# 1 PROBENVERWALTUNG

	Stratiotes aloides Fundorte	Staat	Bdsland/Prov.	Fluss	Status	Proben	Datum	Koordinaten	Höhe	Info
001	Zwentendorfer Au	Österreich	Niederösterreich	Donau	autocht ?	10	27.03.2012	48°22'20.76"N15°47'29.61"E	189m	!! von Sammlung 27.03.2012 (1-1) / (2-1)
002	Stopfenreuther Au (Schacht)	Österreich	Niederösterreich	Donau	Ex-situ / autoch.	10	-	keine Daten (Ex Situ)	-	Aus Stopfenreuther Au (nun im BoGaTeich; markiert)
003	Wesermarsch-Bremen	Deutschland	Bremen	Weser	autochthon	10		N53 08.0 38.6 E08 39.0 24.6		eingewogen, sehr schlechtes Material, wenig Material
004	Ganderkesee (!! NSG Kühkopf)	Deutschland	Hessen	Rhein	Ex-situ / autoch.	5		keine Daten (Ex Situ)		auch schlecht, bräunlich
005	Eckartsau Sammlung 12.9.2012	Österreich	Niederösterreich	Donau	autochthon	15		N48 08.0 10.5 E16 46.0 52.8	158m	Material sehr schmutzig
005a	Fadenbach Eckartsau	Österreich	Niederösterreich	Donau	autochthon	5		N48 08.0 10.5 E16 46.0 52.8	"	
006	Tischwasser	Österreich	Wien	Donau	autochthon ?	10		N48 11 34.49 E16 28 54.84		
007	Ölhafen Lobau	Österreich	Wien	Donau	autochthon/ angeimpft	15		N48 10 48.55 E16 29 47.30		lfd-Nr 81 = 2013-07-011T (Turion)
	"	Österreich	Wien	Donau	autochthon	9	05.06.2013	N48 10 48.55 E16 29 47.30		Nachsammlung in Ölhafen wegen Blüte (alle Männl.)
008	Hameter	Österreich	Niederösterreich	Handel	Ware	6		keine Daten (Handelsw.)	-	GB=Gartenbedarf / 1. Extraktion war zu wiederholen
009	NABU Teich Neukirchen-Vluyn	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Rhein	Ex-situ / autoch.	11	10.07.2013	N51 26 48.6 E6 32 35.2		
010	Kranenburger Bruch (KLE)	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Rhein	angesalbt	12	11.07.2013	N51 47 16.3 E6 01 35.6	10m	1. von 3 Kolken
010a	"	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Rhein	angesalbt	8	11.07.2013	N51 47 14.6 E6 01 37.7	5m	2 / 3 Kolken
010b	"	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Rhein	angesalbt	0	11.07.2013	N51 47 14.6 E6 01 37.7	3m	3/3 aber Kolk nicht besammelt (stark verlandet, Schilf)
011	Fischteich "De Moeidties"	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Rhein	??	9	12.07.2013	N51 51 04.0 E6 10 14.6	9m	
012	Buitenpolder (Rhein Altarm; NL)	Niederlande	Gelderland	Rhein	autochthon	10	12.07.2013	N51 54 03.3 E6 03 39.9	4m	stark verschimmelt
012b	Buitenpolder (Rhein Altarm; NL)	Niederlande	Gelderland	Rhein	autochthon	40	12.07.2013	N51 54 03.5 E6 03 44.6	7m	Proben ok
013	Handel-NRW	Deutschland	NRW	Handel	Ware	5	10.07.2013	keine Daten (Handelsw.)		1-3 = Staudenförster; 4-5= Holzum
014	Eider-Niederung (Meggerkoog)	Deutschland	Schleswig-Holstein	Eider	autochthon	2		N54 21 55.82 E9 22 47.45		
	Eider-Niederung Bergenhusen-Badestelle	Deutschland	Schleswig-Holstein	Eider	autochthon	1		N54 22 06.41 E9 20 55.39		
	Eider-Niederung Bergenhusen-NABU	Deutschland	Schleswig-Holstein	Eider	Ex-situ / autoch.	2		N54 22 27.17 E9 19 24.49		

## 2 LABORDATEN: NANODROP, RES/LIG, PRÄSEL. PCR, SEL. PCR

Stratiotes aloides	Pop.Lbl	FlussS ys.	Status			[mg]	Rest	Datum	Datum	DNA	Nanod.	Eindpft.	Verd.	ReLig	Bewert.	PreSEL	Bewert	Selective
Standort				lfd Nr.	Probenname	/ WH	/ WH	Extraktion	Rnase	Nanod	WH	Nanod.		Datum		Datum		Datum
1 Obere Placken /	AT-NÖ	Donau	?	1	2012-1-001	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	96,8	-		unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	ok	06.08.2013
Zwentendorf	AT-NÖ	Donau	?	2	2012-1-002	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	60,5								
	AT-NÖ	Donau	?	3	2012-1-003	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	155,4	-		01:01,5	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	?	4	2012-1-004	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	70,6	-	98	unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	ok	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	?	5	2012-1-005	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	124,8	-		unverd	22.07.2013	mittel	24.07.2013	ok	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	?	6	2012-1-006	16	ja	23.10.2012	24.10.2012	66,2								
	AT-NÖ	Donau	?	7	2012-1-007	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	81,4	-		unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	?	8	2012-1-008	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	70,3	-	130,9	unverd	22.07.2013	ok	24.07.2013	ok	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	?	9	2012-1-009	20	ja	03.10.2012	04.05.2012	210,9	-		01:02	22.07.2013	mittel	24.07.2013	ok	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	?	10	2012-1-010	21	ja	03.05.2012	04.05.2012	262,8	-		01:02,5	22.07.2013	mittel	24.07.2013	ok	
2 Hainburg (Schacht)	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	11	2012-2-001	17	ja	21.12.2012	08.01.2013	103,9			unverd	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	12	2012-2-002	18	ja	21.12.2012	08.01.2013	102,9			unverd	22.07.2013	ok	24.07.2013	ok	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	13	2012-2-003	20	ja	21.12.2012	08.01.2013	171,8			01:01,5	22.07.2013	ok	24.07.2013	failed	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	14	2012-2-004	21	ja	21.12.2012	08.01.2013	112,2			unverd	22.07.2013	ok	24.07.2013	ok	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	15	2012-2-005	18	ja	21.12.2012	08.01.2013	278,6								
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	16	2012-2-006	22	ja	21.12.2012	08.01.2013	108,9			unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	17	2012-2-007	22	ja	21.12.2012	08.01.2013	196,6			01:02	22.07.2013	ok	24.07.2013	ok	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	18	2012-2-008	18	ja	21.12.2012	08.01.2013	180,3			01:02	22.07.2013	ok	24.07.2013	mittel	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	19	2012-2-009	18	ja	21.12.2012	08.01.2013	170,9			01:01,5	22.07.2013	ok	23.07.2013	mittel	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	ex-situ / autoch.	20	2012-2-010	17	ja	21.12.2012	08.01.2013	134,2								
3 Wesermarsch	DE-Nds	Weser	autochthon	21	2012-3-001	9	ja	23.01.2013	23.01.2013	494,1			01:05	22.07.2013	failed	23.07.2013	ok	30.07.2013
	DE-Nds	Weser	autochthon	22	2012-3-002	17	ja	23.01.2013	23.01.2013	657,2			01:07	22.07.2013	failed	23.07.2013	ok	30.07.2013
	DE-Nds	Weser	autochthon	23	2012-3-003	11	ja	23.01.2013	23.01.2013	833,5			01:10	22.07.2013	failed	24.07.2013	ok	30.07.2013
	DE-Nds	Weser	autochthon	24	2012-3-004	6	ja	23.01.2013	23.01.2013	620,8			01:06	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	30.07.2013
	DE-Nds	Weser	autochthon	25	2012-3-005	12	ja	23.01.2013	23.01.2013	833,9			01:10	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	30.07.2013
	DE-Nds	Weser	autochthon	26	2012-3-006	1	ja	05.02.2013	25.02.2013	676,2			01:07	22.07.2013	failed	24.07.2013	ok	30.07.2013
	DE-Nds	Weser	autochthon	27	2012-3-007	9	ja	05.02.2013	25.02.2013	712,5								
	DE-Nds	Weser	autochthon	28	2012-3-008	11	ja	05.02.2013	25.02.2013	766,7								
	DE-Nds	Weser	autochthon	29	2012-3-009	14	ja	05.02.2013	25.02.2013	980			01:09	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	30.07.2013
	DE-Nds	Weser	autochthon	30	2012-3-010	20	ja	05.02.2013	25.02.2013	866,9			01:09	22.07.2013	mittel	24.07.2013	ok	06.08.2013
4 Wesermarsch	DE-Nrw	Rhein	autochthon	31	2012-4-001	14/20	ja	05.02.2013	25.02.2013	291,6			01:03	22.07.2013	mittel	24.07.2013	ok	30.07.2013
Material aus Gartenteich	DE-Nrw	Rhein	autochthon	32	2012-4-002	18/19	ja	05.02.2013	25.02.2013	661,3			01:07	22.07.2013	failed	24.07.2013	ok	06.08.2013

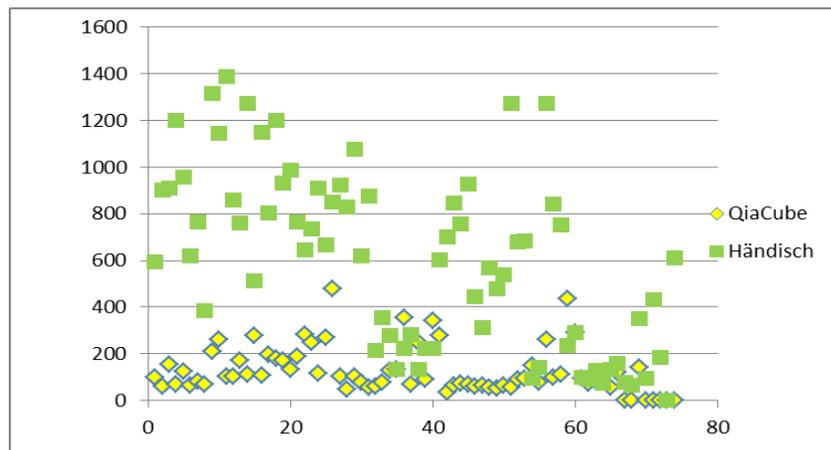
K.Handke	DE-Nrw	Rhein	autochthon	33	2012-4-003	15/19	ja	05.02.2013	25.02.2013	444,1			01:04	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	30.07.2013
org stammt es aus NSG	DE-Nrw	Rhein	autochthon	34	2012-4-004	14/15	ja	05.02.2013	25.02.2013	1191,9			01:11	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	06.08.2013
Kühkopf	DE-Nrw	Rhein	autochthon	35	2012-4-005	15/20	ja	05.02.2013	25.02.2013	1551,7			01:12	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	30.07.2013
5 Eckartsau 12.9.2012	AT-NÖ	Donau	autochthon	36	2012-5-001	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	190,2			01:02	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	autochthon	37	2012-5-002	15	ja	23.10.2012	24.10.2012	280,6								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	38	2012-5-003	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	246,5								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	39	2012-5-004	14	ja	23.10.2012	24.10.2012	117,7			unverd	22.07.2013	mittel	24.07.2013	ok	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	autochthon	40	2012-5-005	8	ja	23.10.2012	24.10.2012	271,7								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	41	2012-5-006	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	480,4								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	42	2012-5-007	11	ja	23.10.2012	24.10.2012	101,8			unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	autochthon	43	2012-5-008	13	ja	23.10.2012	24.10.2012	47,6								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	44	2012-5-009	15	ja	23.10.2012	24.10.2012	104,8			unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	autochthon	45	2012-5-010	11	ja	23.10.2012	24.10.2012	76,8								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	46	2012-5-011	11	ja	23.10.2012	24.10.2012	55,3								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	47	2012-5-012	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	60,7								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	48	2012-5-013	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	77,6								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	49	2012-5-014	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	130,8								
	AT-NÖ	Donau	autochthon	50	2012-5-015	12	ja	21.12.2012	08.01.2013	134,8								
5b Fadenbach Eckartsau	AT-NÖ	Donau	autochthon	51	2012-5a-016	17	ja	23.01.2013	23.01.2013	353,8			01:03,5	22.07.2013	failed	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	autochthon	52	2012-5a-017	20	ja	23.01.2013	23.01.2013	69,1	94							
	AT-NÖ	Donau	autochthon	53	2012-5a-018	16	ja	23.01.2013	23.01.2013	249,7			01:02,5	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-NÖ	Donau	autochthon	54	2012-5a-019	18	ja	23.01.2013	23.01.2013	88,2			unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	mittel	06.08.2013
	AT-NÖ	Donau	autochthon	55	2012-5a-020	17	ja	23.01.2013	23.01.2013	341,2			01:03,5	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	30.07.2013
6 Tischwasser	AT-VIE	Donau	autochthon	56	2012-6-001	15	ja	23.10.2012	24.10.2012	278,1			01:03	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	57	2012-6-002	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	36,6	62							
	AT-VIE	Donau	autochthon	58	2012-6-003	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	65,3	104	unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	30.07.2013	
	AT-VIE	Donau	autochthon	59	2012-6-004	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	72,4	110	unverd	22.07.2013	ok	24.07.2013	failed	30.07.2013	
	AT-VIE	Donau	autochthon	60	2012-6-005a	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	68,1	103	unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	mittel	30.07.2013	
	AT-VIE	Donau	autochthon	61	2012-6-006	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	62,2	93,7	unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	mittel	30.07.2013	
	AT-VIE	Donau	autochthon	62	2012-6-007	21	ja	23.10.2012	24.10.2012	64,7	100	unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	mittel	30.07.2013	
	AT-VIE	Donau	autochthon	63	2012-6-008	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	56,1	81	unverd	22.07.2013	ok	24.07.2013	ok	30.07.2013	
	AT-VIE	Donau	autochthon	64	2012-6-009	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	51,4	78							
	AT-VIE	Donau	autochthon	65	2012-6-010	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	66,7	98	unverd	22.07.2013	ok	24.07.2013	mittel	30.07.2013	
7 Ölhafen Lobau	AT-VIE	Donau	autochthon	66	2012-7-001	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	56,2								
	AT-VIE	Donau	autochthon	67	2012-7-002	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	89,7			unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	30.07.2013

	AT-VIE	Donau	autochthon	68	2012-7-003	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	96,1			unverd		mittel	01.07.	failed	07.05.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	69	2012-7-004	20	ja	23.10.2012	24.10.2012	150,3			01:01,5	22.07.2013	mittel	24.07.2013	ok	30.07.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	70	2012-7-005	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	78,8			unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	71	2012-7-006	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	259,8								
	AT-VIE	Donau	autochthon	72	2012-7-007	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	98,3			unverd	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	73	2012-7-008	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	111,8			unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	ok	30.07.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	74	2012-7-009	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	437,4			01:04	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	75	2012-7-010	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	291,8								
	AT-VIE	Donau	autochthon	76	2012-7-011	16	ja	23.10.2012	24.10.2012	95,1			unverd	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	77	2012-7-012	21	ja	23.10.2012	24.10.2012	72,1								
	AT-VIE	Donau	autochthon	78	2012-7-013	19	ja	23.10.2012	24.10.2012	80,1								
	AT-VIE	Donau	autochthon	79	2012-7-014	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	82,7								
	AT-VIE	Donau	autochthon	80	2012-7-015	17	ja	23.10.2012	24.10.2012	55,8								
	AT-VIE	Donau	autochthon	81	2012-7-11T	18	ja	23.10.2012	24.10.2012	120,2								
8 Hameter	AT-GB	Handel AT	Ware	82	2013-8-001	21/18	ja/ja	23.04./ 29.04.2013	06.05.2013	45,1	99,5		unverd	22.07.2013	mittel	24.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-GB	Handel AT	Ware	83	2013-8-002	19/20	ja/ja	23.04./ 29.04.2013	06.05.2013	85,3	91,9							
	AT-GB	Handel AT	Ware	84	2013-8-003	20/19	ja/ja	23.04./ 29.04.2013	06.05.2013	131,8	129,5		unverd	22.07.2013	ok	23.07.2013	mittel	06.08.2013
	AT-GB	Handel AT	Ware	85	2013-8-004	20/19	ja/ja	23.04./ 29.04.2013	06.05.2013	45,5	73,2							
	AT-GB	Handel AT	Ware	86	2013-8-005	19/20	ja/ja	23.04./ 29.04.2013	06.05.2013	133,2	135		01:01,5	22.07.2013	mittel	23.07.2013	mittel	30.07.2013
	AT-GB	Handel AT	Ware	87	2013-8-006	20/19	ja/ja	23.04./ 29.04.2013	06.05.2013	186,6	160							
1 Traisen Altwasser	AT-NÖ	Donau	autochthon	88	2012-1-011	20/20	ja/ja	29.04.2013	06.05.2013	40,5	76							
	AT-NÖ	Donau	autochthon	89	2012-1-012	18/19	ja/ja	29.04.2013	06.05.2013	67	65							
	AT-NÖ	Donau	autochthon	90	2012-1-013	21/20	ja/ja	29.04.2013	06.05.2013	60	350							
	AT-NÖ	Donau	autochthon	91	2012-1-014	21/17	ja/ja	29.04.2013	06.05.2013	40	96							
	AT-NÖ	Donau	autochthon	92	2012-1-015	20/20	ja/ja	29.04.2013	06.05.2013	45,3	430							
	AT-NÖ	Donau	autochthon	93	2012-1-016	19/20	ja/ja	29.04.2013	06.05.2013	88,5	186							
7 Ölhafen Lobau	AT-VIE	Donau	autochthon	94	2013-7-016	22	ja	29.07.2013	29.07.2013	595			01:06	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	Kommentar:
männliche Pflanzen	AT-VIE	Donau	autochthon	95	2013-7-017	22	ja	29.07.2013	29.07.2013	900			01:09	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	nach erneuter
Blühend	AT-VIE	Donau	autochthon	96	2013-7-018	19	ja	29.07.2013	29.07.2013	910			01:09	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	Extraktion und
	AT-VIE	Donau	autochthon	97	2013-7-019	21	ja	29.07.2013	29.07.2013	1201			01:12	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	Gelbild am
	AT-VIE	Donau	autochthon	98	2013-7-020	22	ja	29.07.2013	29.07.2013	957			01:09	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	01.08.2013
	AT-VIE	Donau	autochthon	99	2013-7-021	21	ja	29.07.2013	29.07.2013	619			01:06	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	Pop. aufgegeben
	AT-VIE	Donau	autochthon	100	2013-7-022	20	ja	29.07.2013	29.07.2013	763			01:07	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	
	AT-VIE	Donau	autochthon	101	2013-7-023	20	ja	29.07.2013	29.07.2013	386			01:04	22.07.2013	failed	23.07.2013	failed	
	AT-VIE	Donau	autochthon	102	2013-7-024	19	ja	29.07.2013	29.07.2013	1315								

9 NABU Teich	DE_NRW	Rhein	autochthon	103	2013-9-001	19	ja	14.08.2013	19.08.2013	1146			01:11	20.08.2013	failed	21.08.2013	failed	
Neukirchen- Vluyn		Rhein	autochthon	104	2013-9-002	21	ja	14.08.2013	19.08.2013	1390			01:14	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Rhein	autochthon	105	2013-9-003	19	ja	14.08.2013	19.08.2013	859			01:09	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	22.08.2013
		Rhein	autochthon	106	2013-9-004	20	ja	14.08.2013	19.08.2013	760			01:08	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Rhein	autochthon	107	2013-9-005	21	ja	14.08.2013	19.08.2013	1275			01:13	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	22.08.2013
		Rhein	autochthon	108	2013-9-006	20	ja	14.08.2013	19.08.2013	515			01:05	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	22.08.2013
		Rhein	autochthon	109	2013-9-007	19	ja	14.08.2013	19.08.2013	1150			01:11	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	22.08.2013
		Rhein	autochthon	110	2013-9-008	19	ja	14.08.2013	19.08.2013	805			01:08	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	27.08.2013
		Rhein	autochthon	111	2013-9-009	20	ja	14.08.2013	19.08.2013	1200			01:11	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	27.08.2013
		Rhein	autochthon	112	2013-9-010	21	ja	14.08.2013	19.08.2013	930			01:09	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	
		Rhein	autochthon	113	2013-9-011	21	ja	14.08.2013	19.08.2013	988			01:10	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	
10 Kranenburger Bruch (KLE)	DE_NRW	Rhein	angesalbt	114	2013-10-001	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	765			01:08					
		Rhein	angesalbt	115	2013-10-002	18	ja	03.10.2013	08.10.2013	647			01:06					
		Rhein	angesalbt	116	2013-10-003	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	734			01:07					
		Rhein	angesalbt	117	2013-10-004	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	908			01:09					
		Rhein	angesalbt	118	2013-10-005	21	ja	03.10.2013	08.10.2013	666			01:07					
		Rhein	angesalbt	119	2013-10-006	20	ja	03.10.2013	08.10.2013	849			01:08					
		Rhein	angesalbt	120	2013-10-007	21	ja	03.10.2013	08.10.2013	925			01:09					
		Rhein	angesalbt	121	2013-10-008	20	ja	03.10.2013	08.10.2013	831			01:08					
		Rhein	angesalbt	122	2013-10-009	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	1076			01:10					
		Rhein	angesalbt	123	2013-10-010	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	619			01:06					
		Rhein	angesalbt	124	2013-10-011	22	ja	03.10.2013	08.10.2013	878			01:09					
		Rhein	angesalbt	125	2013-10-012	17	ja	08.10.2013	16.10.2013	214			01:02					
10 A Kranenburger Bruch (KLE)	DE_NRW	Rhein	angesalbt	126	2013-10a-013	20	ja	13.08.2013	14.08.2013	356			01:03	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	27.08.2013
		Rhein	angesalbt	127	2013-10a-014	21	ja	13.08.2013	14.08.2013	277			01:03	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	27.08.2013
		Rhein	angesalbt	128	2013-10a-015	21	ja	13.08.2013	14.08.2013	133			01:01,5	20.08.2013	mittel	21.08.2013	ok	22.08.2013
		Rhein	angesalbt	129	2013-10a-016	20	ja	13.08.2013	14.08.2013	223			01:02	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	22.08.2013
		Rhein	angesalbt	130	2013-10a-017	20	ja	13.08.2013	14.08.2013	283			01:03	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	27.08.2013
		Rhein	angesalbt	131	2013-10a-018	20	ja	13.08.2013	14.08.2013	132			01:01,5	20.08.2013	mittel	21.08.2013	ok	27.08.2013
		Rhein	angesalbt	132	2013-10a-019	21	ja	13.08.2013	14.08.2013	222			01:02	20.08.2013	mittel	21.08.2013	ok	22.08.2013
		Rhein	angesalbt	133	2013-10a-020	19	ja	13.08.2013	14.08.2013	221			01:02	20.08.2013	mittel	21.08.2013	ok	22.08.2013
11 Fischteich "De Moeidtjes"	DE_NRW	Rhein	?	134	2013-11-001	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	478			01:05					
		Rhein	?	135	2013-11-002	21	ja	03.10.2013	08.10.2013	123			unverd.					
		Rhein	?	136	2013-11-003	17	ja	03.10.2013	08.10.2013	305			01:03					

		Rhein	?	137	2013-11-004	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	522			01:05					
		Rhein	?	138	2013-11-005	20	ja	03.10.2013	08.10.2013	172			01:00,7					
		Rhein	?	139	2013-11-006	20	ja	03.10.2013	08.10.2013	316			01:03					
		Rhein	?	140	2013-11-007	21	ja	03.10.2013	08.10.2013	1060			01:10					
		Rhein	?	141	2013-11-008	19	ja	03.10.2013	08.10.2013	1338			01:13					
		Rhein	?	142	2013-11-009	21	ja	03.10.2013	08.10.2013	133			unverd.					
12 Buitenpolder	NL_GL	Rhein	autochthon	143	2013-12-001	21	ja	14.08.2013	14.08.2013	601			01:06	20.08.2013	mittel	21.08.2013	mittel	
(Rhein Altarm; NL)		Rhein	autochthon	144	2013-12-002	18	ja	14.08.2013	14.08.2013	701			01:07	20.08.2013	mittel	21.08.2013	mittel	
stark verschimmelt		Rhein	autochthon	145	2013-12-003													
143-147,		Rhein	autochthon	146	2013-12-004													
152 erstmal nicht extrah.		Rhein	autochthon	147	2013-12-005													
		Rhein	autochthon	148	2013-12-006	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	845			01:09	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Rhein	autochthon	149	2013-12-007	19	ja	14.08.2013	14.08.2013	757			01:08	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Rhein	autochthon	150	2013-12-008	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	928			01:09	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Rhein	autochthon	151	2013-12-009	21	ja	14.08.2013	14.08.2013	446			01:05	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	22.08.2013
		Rhein	autochthon	152	2013-12-010													
12 b Buitenpolder	NL_GL	Rhein	autochthon	153	2013-12b-011	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	313			01:03	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	22.08.2013
(Rhein Altarm; NL)		Rhein	autochthon	154	2013-12b-012	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	570			01:06	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	22.08.2013
Proben ok		Rhein	autochthon	155	2013-12b-013	19	ja	14.08.2013	14.08.2013	479			01:05	20.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Rhein	autochthon	156	2013-12b-014	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	538			01:05	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	22.08.2013
13 Handel-NRW	DE_NRW	Handel-DE	Ware	157	2013-13-001	21	ja			680			01:07	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	
1-3=Staudenförster(157-159)		Handel-DE	Ware	158	2013-13-002	20	ja	13.08.2013	14.08.2013	682			01:07	20.08.2013	failed	21.08.2013	ok	27.08.2013
4-5= Holzum (160-161)		Handel-DE	Ware	159	2013-13-003	21	ja	13.08.2013	14.08.2013	1275			01:13	21.08.2013	failed	21.08.2013	ok	27.08.2013
13 Handel-NRW		Handel-DE	Ware	160	2013-13-004	21	ja	13.08.2013	14.08.2013	93			unverd	21.08.2013	mitte	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Handel-DE	Ware	161	2013-13-005	20	ja			143			01:01,5	21.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	
14 Eider-Niederung (SH)	DE_SH	Eider	autochthon	162	2013-14-001	19	ja	14.08.2013	14.08.2013	1275			01:13	25.08.2013	failed	21.08.2013	ok	22.08.2013
1-2 = Meggerkoog		Eider	autochthon	163	2013-14-002	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	841			01:08	26.08.2013	mittel	21.08.2013	mittel	22.08.2013
3 = Bergenhusen		Eider	autochthon	164	2013-14-003	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	751			01:08	27.08.2013	failed	21.08.2013	mittel	22.08.2013
4-5= Bergenhusen-NABU		Eider	ex-situ / autoch.	165	2013-14-004	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	235			01:02	28.08.2013	ok	21.08.2013	mittel	27.08.2013
		Eider	ex-situ / autoch.	166	2013-14-005	20	ja	14.08.2013	14.08.2013	290			01:03	29.08.2013	mittel	21.08.2013	mittel	22.08.2013

### 3 HÄNDISCH UND MASCHINELL EXTRAHIERTE PROBEN:



## 4 AUSWAHL DER PROBEN FÜR DEN LAUF UND BEWERTUNG DER PROBEN

Lfd. Nr.	Probenname	38b	37g	36y	Lauf	Wh.	38b	37g	36y	Kommentar
1	2012-1-001	1	1	2	2013_07_31_RG_01	ja			2013_08_06_RG_05	
3	2012-1-003	2	1	1	2013_07_31_RG_01	ja	2013_08_06_RG_01			
4	2012-1-004	0	0	0	2013_07_31_RG_01	ja	2013_08_06_RG_01	2013_08_06_RG_03	2013_08_06_RG_05	37g auswertbar
5	2012-1-005	1	1	1	2013_07_31_RG_01					
7	2012-1-007	2	2	2	2013_07_31_RG_01	ja	2013_08_06_RG_01	2013_08_06_RG_03	2013_08_06_RG_05	37g auswertbar
8	2012-1-008	1	0	1	2013_07_31_RG_01	ja		2013_08_06_RG_03		
9	2012-1-009	0	2	1	2013_07_31_RG_01	ja	2013_08_06_RG_01	2013_08_06_RG_03		38b auswertbar
10	2012-1-010	0	2	1	2013_07_31_RG_01	ja	2013_08_28_RG_02	2013_08_06_RG_03		38b nicht auswertbar
11	2012-2-001	0	0	0	2013_07_31_RG_02	ja	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	
12	2012-2-002	0	0	0	2013_07_31_RG_02	ja	2013_08_06_RG_01	2013_08_06_RG_04	2013_08_01_RG_01	
13	2012-2-003	0	0	0	2013_07_31_RG_02	ja	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	38b viell. auswertbar
14	2012-2-004	2	2	1	2013_07_31_RG_02					38b/37g auswertbar
16	2012-2-006	2	2	1	2013_07_31_RG_02					38b/37g auswertbar
17	2012-2-007	2	2	2	2013_07_31_RG_02	ja	2013_08_06_RG_01			37g/36g auswertbar
18	2012-2-008	2	2	2	2013_07_31_RG_02	ja	2013_08_06_RG_02			38b/37g/36g auswertbar
19	2012-2-009	2	2	2	2013_07_31_RG_02	ja	2013_08_06_RG_02			
21	2012-3-001	0	0	0	2013_07_31_RG_03	ja	2013_08_06_RG_02			
22	2012-3-002	2	2	2	2013_07_31_RG_03	ja	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	
23	2012-3-003	2	2	2	2013_07_31_RG_03	ja	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	
24	2012-3-004	1	1	1	2013_07_31_RG_03					
25	2012-3-005	1	1	1	2013_07_31_RG_03					
26	2012-3-006	0	1	1	2013_07_31_RG_03	ja	2013_08_05_RG_01			38b viell. auswertbar
29	2012-3-009	1	1	1	2013_07_31_RG_03					
30	2012-3-010	1	2	1	2013_07_31_RG_03	ja		2013_08_06_RG_04		
31	2012-4-001	2	2	2	2013_07_31_RG_04	ja	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	
32	2012-4-002	2	0	2	2013_07_31_RG_04			2013_08_06_RG_04		37g viell. auswertbar
33	2012-4-003	1	1	1	2013_07_31_RG_04					
34	2012-4-004	2	1	2	2013_07_31_RG_04	ja	2013_08_06_RG_02		2013_08_06_RG_05	38b viell. auswertbar
35	2012-4-005	2	1	1	2013_07_31_RG_04	ja	2013_08_06_RG_02			38b viell. auswertbar
82	2013-8-001	1	1	1	2013_07_31_RG_04					
84	2013-8-003	1	2	1	2013_07_31_RG_04	ja		2013_08_06_RG_04		37g viell. auswertbar

86	2013-8-005	1	2	1	2013_07_31_RG_04	ja		2013_08_06_RG_05		37g viell. auswertbar
36	2012-5-001	0	1	2	2013_07_31_RG_05	ja	2013_08_06_RG_03			
39	2012-5-004	1	1	2	2013_07_31_RG_05					
42	2012-5-007	1	1	2	2013_07_31_RG_05					
44	2012-5-009	1	1	2	2013_07_31_RG_05					
51	2012-5a-016	1	1	2	2013_07_31_RG_05					
53	2012-5a-018	1	1	2	2013_07_31_RG_05					
54	2012-5a-019	1	1	2	2013_07_31_RG_05					36y viell. auswertbar
55	2012-5a-020	0	2	1	2013_07_31_RG_05	ja	2013_08_28_RG_03			37g viell. auswertbar
56	2012-6-001	2	2	2	2013_07_31_RG_06					
58	2012-6-003	2	2	2	2013_07_31_RG_06	ja	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	2013_08_01_RG_01	
59	2012-6-004	2	2	2	2013_07_31_RG_06				2013_08_06_RG_06	38b/37g/36g viell. ausw.
60	2012-6-005a	1	2	1	2013_07_31_RG_06					37g auswertbar
61	2012-6-006	1	1	1	2013_07_31_RG_06					
62	2012-6-007	1	1	1	2013_07_31_RG_06					
63	2012-6-008	1	1	1	2013_07_31_RG_06					
65	2012-6-010	1	1	1	2013_07_31_RG_06					
67	2012-7-002	1	1	1	2013_07_31_RG_07					
81	2012-7-003	0	1	2	2013_07_31_RG_07	ja	2013_08_06_RG_03		2013_08_06_RG_06	
69	2012-7-004	1	1	1	2013_07_31_RG_07					
70	2012-7-005	1	1	1	2013_07_31_RG_07					
72	2012-7-007	1	1	1	2013_07_31_RG_07					
73	2012-7-008	1	1	1	2013_07_31_RG_07					
74	2012-7-009	1	1	1	2013_07_31_RG_07					
76	2012-7-011	0	1	1	2013_07_31_RG_07	ja	2013_08_28_RG_03			
104	2013-9-002	0	0	2	2013_08_23_RG_01		2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	
105	2013-9-003	1	1	1	2013_08_23_RG_01					
106	2013-9-004	1	2	1	2013_08_23_RG_01			2013_08_28_RG_02		
107	2013-9-005	1	1	1	2013_08_23_RG_01					
108	2013-9-006	1	1	1	2013_08_23_RG_01					
109	2013-9-007	1	1	1	2013_08_23_RG_01					
110	2013-9-008	2	0	2	2013_08_23_RG_01		2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	
111	2013-9-009	1	0	1	2013_08_23_RG_01			2013_08_28_RG_02		
126	2013-10a-013	0	1	1	2013_08_23_RG_02		2013_08_28_RG_03			
127	2013-10a-014	1	2	1	2013_08_23_RG_02			2013_08_28_RG_02		37g auswertbar
128	2013-10a-015	1	1	1	2013_08_23_RG_02					
129	2013-10a-016	1	1	2	2013_08_23_RG_02					
130	2013-10a-017	2	2	1	2013_08_23_RG_02		2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	
131	2013-10a-018	1	0	1	2013_08_23_RG_02			2013_08_28_RG_01		

132	2013-10a-019	1	1	1	2013_08_23_RG_02					
133	2013-10a-020	1	1	1	2013_08_23_RG_02					
148	2013-12-006	2	2	1	2013_08_23_RG_03	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01		
149	2013-12-007	0	1	1	2013_08_23_RG_03	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01		
150	2013-12-008	0	0	2	2013_08_23_RG_03	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	36y	auswertbar
151	2013-12-009	2	1	1	2013_08_23_RG_03					
153	2013-12b-011	1	1	1	2013_08_23_RG_03					
154	2013-12b-012	1	1	1	2013_08_23_RG_03					
155	2013-12b-013	2	2	2	2013_08_23_RG_03	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	37g,36y	auswertbar
156	2013-12b-014	2	1	1	2013_08_23_RG_03					
158	2013-13-002	1	2	1	2013_08_23_RG_04					
159	2013-13-003	1	2	1	2013_08_23_RG_04	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01		
160	2013-13-004	2	2	2	2013_08_23_RG_04	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01		
162	2013-14-001	1	1	1	2013_08_23_RG_04					
163	2013-14-002	1	1	1	2013_08_23_RG_04					
164	2013-14-003	1	1	1	2013_08_23_RG_04					
165	2013-14-004	1	2	2	2013_08_23_RG_04	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01	2013_08_28_RG_01		
166	2013-14-005	1	1	1	2013_08_23_RG_04					

<b>Legende:</b>	0	ausgefallen
	1	gut
	2	schwach/ok/zu hoch