

Abschlussbericht Zusatzprojekt der Umweltprobenbank des Bundes (UPB)

# "Klimabedingte Allelveränderungen in ausgewählten UPB-Probenarten"



Universität Trier Fachbereich VI – Biogeographie Universitätsring 15 54296 Trier Auftraggeber Umweltbundesamt Fachgebiet II 1.2 Corrensplatz 1 14195 Berlin



Abschlussbericht Zusatzprojekt der Umweltprobenbank des Bundes (UPB)

# "Klimabedingte Allelveränderungen in ausgewählten UPB-Probenarten"

**Markus Quack** 

**Axel Hochkirch** 

**Michael Veith** 

unter Mitarbeit der UPB-Projektgruppe Trier

September 2011

#### Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde ein individuenbasiertes sowie retrospektives Monitoring zur Untersuchung der genetischen Differenzierung von UPB-Probenarten durchgeführt. Hierzu wurden mittels Mikrosatellitenanalyse ausgewählte Populationen der Probenarten Brassen (*Abramis brama*), Aalmutter (*Zoarces viviparus*), Miesmuschel (*Mytilus edulis*) und Regenwurm (*Lumbricus terrestris*) untersucht.

Die Analysen an Individualproben hatten zum Ziel, den *status quo* der genetischen Ausstattung (Alleldiversität) zu beschreiben und darüber hinaus die genetische Vergleichbarkeit der Proben verschiedener Populationen zu überprüfen. Das retrospektive Monitoring an Homogenaten (Mischproben) sollte zeigen, ob bei den betrachteten Arten eine unter Umständen klimabedingte genetische Veränderung innerhalb der Zeitreihen nachweisbar ist. Daneben war die Frage zu klären, inwieweit die Archivproben der Umweltprobenbank für eine rückschauende Beschreibung der Allelveränderungen innerhalb dieser Populationen geeignet sind.

Im vorliegenden Bericht werden die Ergebnisse der populationsgenetischen Analysen ausführlich beschrieben und diskutiert. Dabei werden die Befunde aller vier Probenarten getrennt nach individuenbasiertem sowie retrospektivem Ansatz dargestellt. Zur Überprüfung zukünftiger Veränderungen der Allelzusammensetzung wird eine Wiederholung der Individualanalysen bei den Fischen in einem konstanten Rhythmus, z. B. ein- bis zweifache Generationsdauer, empfohlen. Für Studien, die neben populationsgenetischen auch Fragen zu Immunreaktionen oder hormonellen Wirkungen beantworten sollen, ist die Verwendung geeigneter Individualproben essenziell. Deshalb sollten zukünftig neben den Routine-Mischproben standardmäßig auch Einzelproben als Gewebeproben und/oder DNA-Stammlösungen für retrospektive Untersuchungen archiviert werden.

#### Abstract

An individual-based and retrospective monitoring concerning the genetic differentiation of species sampled by the German Environmental Specimen Bank (ESB) was conducted. For this purpose selected populations of bream (*Abramis brama*), eelpout (*Zoarces viviparus*), blue mussels (*Mytilus edulis*) and the earthworm *Lumbricus terrestris* were studied using microsatellite analysis. The aim of the study of individual samples was, to describe the current *status quo* of the genetic diversity (allelic richness) and to compare the genetic comparability of different populations. The retrospective monitoring of homogenates (pooled samples) was performed to uncover temporal genetic changes in the population that might be explained by climate change. Furthermore, this study was done to test, if the archived samples of the ESB are suitable for such a retrospective analysis at all.

In the report at hand the results of the population genetic analyses are presented in detail and discussed. In the course of this the results of all four species are presented separately for the individual-based and the retrospective approach. In order to check future changes in allelic composition, a repetition of the individual-based analysis is recommended in a constant interval, e.g. one to twofold generation time. For studies that are aiming on population genetic questions, but also on question concerning the immune response or hormonal effects, the use of suitable individual samples is essential. Therefore, it is necessary to archive individual tissue samples and/or DNA samples as a standard feature for retrospective analyses in addition to the routine pooled samples.

#### Inhaltsverzeichnis

1 2	Ziel des Vorhab	ens	1
2	Material und Me	thoden	4
2.1	Auswahl geei	gneter Probenarten	4
2.2	Auswahl geei	gneter Probenahmeflächen und Zeitreihen	6
2.3	Populationsge	enetische Methoden	8
	2.3.1 DNA-Is	olierung	9
	2.3.2 Mikrosa	atelliten-Analyse	9
	2.3.3 Statistis	sche Auswertung	17
3 I	Ergebnisse		18
3.1	Individuenbas	ierter Ansatz	18
	3.1.1 Brasser	n (Abramis brama)	18
	3.1.1.1	Untersuchungen 2009	18
	3.1.1.2	Untersuchungen 2010	23
	3.1.1.3	Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010	26
	3.1.2 Miesmu	uschel (Mytilus spp.)	
	3.1.2.1	Untersuchungen 2009	28
	3.1.2.2	Untersuchungen 2010	34
	3.1.2.3	Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010	37
	3.1.3 Aalmutt	ter (Zoarces viviparus)	38
	3.1.3.1	Entwicklung von Mikrosatellitenprimern	38
	3.1.3.2	Untersuchungen 2009	39
	3.1.3.3	Untersuchungen 2010	43
	3.1.3.4	Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010	46
	3.1.4 Regenv	vurm (Lumbricus terrestris)	47
	3.1.4.1	Untersuchungen 2009	47
	3.1.4.2	Untersuchungen 2010	51

		3.1.4.3	Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010	53
3.2	Retro	spektiver	Ansatz	54
	3.2.1	Brassen	(Abramis brama)	54
	3.2.2	Miesmus	schel (Mytilus spp.)	59
	3.2.3	Aalmutte	er (Zoarces viviparus)	62
	3.2.4	Regenwu	urm (Lumbricus terrestris)	66
3.3	Retro	spektive E	Betrachtung der Blutplasma-Einzelproben	66
4 Dis	skussi	ion		72
4.1	Individ	duenbasie	erter Ansatz	72
4.2	Retro	spektiver	Ansatz	76
4.3	Retro	spektiver	Ansatz mit Einzelproben (Blutplasmen)	83
5 Zu	samm	enfassur	ng und Fazit	85
6 Lit	eratur			89
Anha	ng			92

### 1 Ziel des Vorhabens

Die Folgen des Klimawandels sind das zentrale Thema in der Diskussion um die aktuelle und künftige Nutzung biologischer Ressourcen. Die bisherigen Prognosen lassen drastische Veränderungen in der Zusammensetzung der natürlichen Lebensgemeinschaften erwarten und der weitere Verlust biologischer Vielfalt scheint vorprogrammiert (Umweltbundesamt 2008). Während hierbei meist die Ebenen der Arten und Lebensgemeinschaften im Fokus der öffentlichen Diskussionen steht, spielt der intraspezifische Verlust von Alleldiversität, das heißt, der Verlust genetischer Vielfalt und damit einher gehend der Verlust an Anpassungsfähigkeit, bei Pflanzen- und Tierarten in der öffentlichen Wahrnehmung bestenfalls eine untergeordnete Rolle.

Allerdings geht der mitunter schleichende Verlust genetischer Vielfalt häufig einem demographischen Zusammenbruch voraus, kann mithin also als "Warnsignal" für noch folgende drastischere demographische Veränderungen verstanden werden. Ein genetisches Monitoring ausgewählter und Lebensraum typischer Arten kann somit Rückschlüsse auf die Dynamisierung populationsbiologischer Prozesse in der Landschaft und damit auch der Belastung der betreffenden Lebensräume zulassen.

Die Kenntnis über genetische Veränderungen in Populationen ist für die Interpretation der im Rahmen der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) gewonnenen Daten insbesondere bezüglich der Vergleichbarkeit der UPB-Zeitreihen von größter Bedeutung und stellt damit einen wesentlichen Beitrag zur Qualitätssicherung in der Routine dar.

Die Entwicklung hochauflösender molekulargenetischer Methoden in den letzten zwei Jahrzehnten ermöglicht detailgenaue Beschreibungen der genetischen Konstitution von Individuen und Populationen und erlaubt die Detektion auch minimaler Veränderungen. Molekulargenetische Methoden können daher als Indikatoren für mittel- bis langfristige demographische Veränderungen genutzt werden.

Unter der Annahme, dass der Klimawandel Auswirkungen auf die qualitative Allelkomposition von Populationen hat, lassen sich drei unterschiedliche Arbeitshypothesen formulieren:

- Deterministische Veränderungen bevorzugen/benachteiligen bestimmte Allele aufgrund ihres adaptiven Wertes bzw. weil sie an adaptive Gene gekoppelt sind ("selective sweep"). Erwartung: An unterschiedlichen Standorten gehen jeweils die gleichen Allele verloren bzw. kommen hinzu.
- Durch eine kurzzeitige drastische, klimabedingte Verkleinerung der Populationen verstärkt sich der Effekt der genetischen Drift ("bottleneck"-Effekt). Erwartung: Abnahme der "allelic richness", wobei von Population zu Population jeweils andere Allele verloren gehen können.
- 3. Der Klimawandel führt zu einem vermehrten Dispersal wärmeadaptierter Genotypen einer Art. Erwartung: Verschiebung der Allelfrequenzen im Laufe der Jahre. Zunahme von Allelen aus "südlichen" Populationen.

Die UPB bietet hervorragende Voraussetzungen zur Analyse solcher Veränderungen auf molekulargenetischer Ebene: Durch die seit Mitte der 1980er Jahre veränderungsfrei gelagerten Proben bietet sich für viele Probenarten die Möglichkeit der retrospektiven Betrachtung von Veränderungen über die letzten 25 Jahre. Hierbei sind durch das engmaschige Netz der UPB-Probenahmegebiete alle Ökosystemtypen Deutschlands repräsentiert. Durch die regelmäßigen UPB-Routineprobenahmen besteht die Möglichkeit, ohne großen zusätzlichen Aufwand Proben zu akquirieren, die für die Analyse von Veränderungen in der Allelzusammensetzung ausgewählter UPB-Probenarten genutzt werden können (Umweltbundesamt 2008).

Für diese Studie wurde eine begrenzte Anzahl zu untersuchender Populationen exemplarisch ausgewählt. Deshalb werden die oben genannten Prozesse mitunter lediglich als Tendenzen rekonstruierbar sein. Dennoch bietet das Konzept der repräsentativen Flächenauswahl und der Probenartensets eine einmalige Chance, Allelveränderungen in Schlüsselarten zu untersuchen.

Dieses Vorhaben verfolgt zwei Ansätze:

#### Individuenbasierter Ansatz

Anhand von Gewebeproben ist es möglich, die genetische Ausstattung ("Alleldiversität") ausgewählter Probenarten-Populationen zu beschreiben. Dafür wurden während der UPB-Routineprobenahmen 2009 und 2010 an geeigneten Probenahmeflächen zusätzlich Gewebeproben von jeweils 30 Individuen gewonnen, als Einzelprobe eingelagert und genetisch analysiert. Dieser Ansatz verfolgt die Ziele:

- Schaffung einer Probengrundlage f
  ür zuk
  ünftige Vergleiche der Allelzusammensetzung verschiedener Populationen sowie
- Überprüfung der Vergleichbarkeit der Allelzusammensetzung von Einzelindividuen mit den entsprechenden Homogenaten dieser Probenahmeflächen.

Als Probenarten wurden Brassen (*Abramis brama*), Miesmuschel (*Mytilus edulis*), Aalmutter (*Zoarces viviparus*) und Regenwurm (*Lumbricus terrestris*) ausgewählt. Die Untersuchung erfolgte gezielt an diesem Artenset, da neben der besonderen Eignung der Tiere (siehe Kap. 2.1) auch verschiedene trophische Ebenen berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse liefern für die ausgewählten UPB-Populationen eine erste Beschreibung ihrer Allelkomposition. Dafür wurden molekulargenetische Verfahren für die UPB-Arten angepasst und die jeweiligen Assays optimiert. Es wurden grundlegende populationsgenetische Parameter erhoben, die eine detaillierte genetische Charakterisierung der ausgewählten Population und somit eine Beschreibung des "genetischen *status quo*" erlauben.

Einzelproben von **Brassen-Blutplasmen** (2002 bis 2008) ermöglichen darüber hinaus eine rückschauende Betrachtung von Veränderungen in der Allelzusammensetzung auf Individualebene. Da nur Blutplasmen der Brassen als Individual-Archivproben zur Verfügung stehen, besitzen diese Proben "Bindegliedcharakter". Sie ermöglichen einen längerfristigen und somit detaillierten Vergleich von Homogenat- und Individualproben, was eine tiefergehende Interpretation der gewonnenen Daten erlaubt.

#### **Retrospektiver Ansatz**

An ausgewählten UPB-Archivproben (Homogenate) wurde eine Zeitreihenanalyse auf Veränderungen der genetischen Variabilität unter Berücksichtigung klimabedingt gerichteter Allelveränderungen durchgeführt. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden sollte damit überprüft werden, ob in den ausgewählten Probenarten Veränderungen in der Allelzusammensetzung zu diagnostizieren sind. Dies könnte gegebenenfalls eine Einschränkung der Vergleichbarkeit der Probenreihen zur Folge haben. Die als Homogenate vorliegenden Jahresproben sind zwar für eine individuelle Genotypisierung ungeeignet, geben aber als gepoolte Populationsproben Aufschluss über Veränderungen des Genpools in dem betrachteten Zeitraum. Die dadurch gewonnene Kenntnis vergangener Veränderungen ist wichtig für die Bewertung der heute gefundenen Allelvielfalt und lässt darüber hinaus Rückschlüsse auf die genetische Vergleichbarkeit der Proben über den Untersuchungszeitraum zu.

Hierfür wurden die ausgewählten Homogenatproben mit identischen Methoden populationsgenetisch analysiert und die Nutzbarkeit von Homogenatproben für eine solche Fragestellung abschließend bewertet.

### 2 Material und Methoden

#### 2.1 Auswahl geeigneter Probenarten

Für ein genetisches Monitoring zur Analyse von Allelveränderungen sind nicht alle UPB-Probenarten gleichermaßen geeignet. Die Auswahl von Brassen (*Abramis brama*), Miesmuschel (*Mytilus* spp.), Aalmutter (*Zoarces viviparus*) sowie die Regenwurmart *Lumbricus terrestris* als Modellorganismen wird anschließend begründet.

Eine Analyse der UPB-Baumarten (*Fagus sylvatica, Populus nigra* X 'Italica', *Picea abies, Pinus sylvestris*) wäre nicht zielführend, da der Generationswechsel hier deutlich langsamer von statten geht und im bisher besammelten Zeitraum im Wesentlichen identische Bestände beprobt wurden. Ebenso soll *Dreissena polymorpha* im Rahmen dieser Untersuchungen zunächst nicht weiter berücksichtigt werden, da es sich bei der Mehrheit der Proben um aktiv ausgebrachte Individuen handelt, die aus dem Bodensee – und somit einer gemeinsamen Herkunft – entstammen. Zu einem späteren Zeitpunkt könnten eventuell die Probenarten Blasentang (*Fucus vesiculosus*), Silbermöwe (*Larus argentatus*), Reh (*Capreolus capreolus*) sowie die Regenwurmart *Aporrectodea longa* Berücksichtigung finden.

#### Brassen (Abramis brama)

Beim Brassen handelt es sich zwar um eine vergleichsweise euryöke Art, die sich einer breiten Amplitude an Umweltbedingungen anpassen kann, dennoch ist diese standorttreue Fischart eng an die Bedingungen der Flussunterläufe bzw. der Stauhaltungen und stehender Gewässer gebunden. Gewässerabschnitte Diese sind durch geringe Fließgeschwindigkeiten, einen breiten Gewässerquerschnitt, hohe Insolation und dadurch bedingte vergleichsweise hohe Gewässertemperaturen gekennzeichnet. Im Rahmen klimatischer Veränderungen sind an diesen Standorten weitere Temperaturanstiege zu erwarten, was sich auf die Populationstruktur auswirken kann.

Wenn bisher auch für *Abramis brama* keine spezifischen Mikrosatellitenprimer entwickelt wurden, so sind durch die Arbeiten von HOLMEN et al. (2005), GHASEMI et al. (2007) und HAMILTON & TYLER (2008) Cross-Amplifikationen von Mikrosatellitenprimern anderer Arten belegt, mit denen erfolgreich populationsgenetische Mikrosatelliten-Studien an Brassen durchgeführt werden können. GHASEMI et al. (2007) untersuchten die asiatische Unterart *Abramis brama orientalis*, indem sie drei für *Campostoma anomalum* entwickelte (DIMSOSKI et al. 2000) und zwei für *Danio rerio* entwickelte Primer (SHIMODA et al. 1999) erfolgreich nutzten. HOLMEN et al. (2005) konnten insgesamt acht Mikrosatellitenprimer, die für *Danio rerio* entwickelt wurden, erfolgreich auf *Abramis* übertragen. Kürzlich belegten HAMILTON & TYLER (2008) die Cross-Amplifikation von 20 *Rutilus rutilus*-Mikrosatellitenprimer für *A. brama*. Die damit vorliegenden Methoden können für die Überprüfung von gerichteten Allelverlusten bzw. Allelveränderungen genutzt werden.

Der Brassen eignet sich aus einem weiteren Grund in besonderem Maße für die Beantwortung o.g. Fragestellungen: Seit dem Jahr 2002 werden an allen Probenahmeflächen Brassen-Blutplasmen als

Einzelproben gewonnen. Werden diese für eine individualspezifische, retrospektive Genotypisierung genutzt, erlauben sie eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse der Homogenatanalysen.

#### Miesmuschel (Mytilus spp.)

Durch eine Vielzahl genetischer Untersuchungen zu Artdiagnostik, Hybridisierung und Phylogenie bei der Gattung *Mytilus* stehen heute zahlreiche Markersysteme für populationsgenetische Untersuchungen an *Mytilus* spp. zur Verfügung: INOUE et al. (1995) (*Me13/14, Me15/16, Me15/17*), SUCHANEK et al. (1997) (*cmg93*), RAWSON et al. (1996) (*Glu-3', Glu-5'*), DAGUIN & BORSA (1999) (*mac-1*) und BIERNE et al. (2002, 2003) (*Efbis*). QUACK & KOSUCH (2005) belegten mit ihren Untersuchungen die Eignung der Mehrzahl der genannten Markersysteme für populationsgenetische Studien an *Mytilus*-Arten. Durch die Untersuchungen von GARDESTRÖM et al. (2008) wurden zudem kürzlich weitere sechs Mikrosatelliten-Primer etabliert.

Neben der "technischen Eignung" von *Mytilus* spp. für ein Monitoring von Allelveränderungen ist das in jüngster Zeit mehrfach beschriebene Auftreten der Wärme liebenden Schwesterart *M. gallo-provincialis* im Bereich der westlichen Deutschen Bucht (LUTTIKHUIZEN et al. 2002, QUACK pers. Mitt.) ein weiterer Aspekt, der für klimabedingte Allelverschiebungen von Bedeutung sein kann. Neben verstärkter Nutzung von *M. galloprovincialis* in Muschelkulturen wird auch der Klimawandel als Triebfeder für die nordwärts gerichtete Ausbreitung der Art diskutiert (LUTTIKHUIZEN et al. 2002, GOSLING et al. 2008). Durch die potenzielle Introgression ihrer Gene in den Genpool der einheimischen *M. edulis* vermag *M. galloprovincialis* wesentlichen Einfluss auf die genetische Konstitution von *M. edulis* zu nehmen. Es ist davon auszugehen, dass ein Fortschreiten des Klimawandels diesen Durchmischungsprozess und die dadurch bedingten Veränderungen auf Allelebene forciert.

#### Aalmutter (Zoarces viviparus)

Zoarces viviparus eignet sich außerordentlich gut für ein genetisches Monitoring: Zum einen belegen die Arbeiten von PÖRTNER et al. (2001), ZAKHARTSEV et al. (2003) und PÖRTNER & KNUST (2007), dass die Aalmutter sensitiv auf klimainduzierte Veränderung gewässerphysikalischer Parameter reagiert, zum anderen sind in den letzten Jahrzehnten deutliche Rückgänge in den Fangzahlen und in den abgeschätzten Populationsgrößen der Aalmutter sowohl in Nord- als auch in der Ostsee zu beobachten (Magnus Appelberg, Swedish Board of Fisheries, und Jakob Strand, Universität Aarhus – National Environmental Research Institute (NERI), mündl. Mitteilungen sowie Erhebungen durch Fänge für die UPB-Routineprobenahme). Bei steigenden Temperaturen im küstennahen Bereich der Nord- und Ostsee (WILTSHIRE & MANLY 2004) ist von einer Abwanderung der Individuen bzw. von einer deutlichen Einschränkung des Genpools dieser Populationen auszugehen.

Für *Zoarces viviparus* standen zum Zeitpunkt der Projektplanung noch keine geeigneten Mikrosatellitenprimer zur Verfügung, diese wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung speziell entwickelt (siehe Kap. 2.3.2).

#### Regenwurm (Lumbricus terrestris)

Der endogäisch lebende *L. terrestris* ist aufgrund der Pufferfunktion des Bodens in vermutlich wesentlich geringerem Maße von Temperaturschwankungen des umgehenden Mediums betroffen. Veränderungen treffen den Regenwurm bezüglich des Bodenwasserhaushaltes und den damit in Zusammenhang kleiner werdenden Aktivitätsfenstern. Der Regenwurm hat seine Hauptaktivität im Frühjahr und Herbst. Eine zeitliche Ausdehnung erhöhter Trockenheit in den Sommermonaten kann unter Umständen zur Folge haben, dass sich das Aktivitätsmuster der Würmer nachteilig verändert und damit die Reproduktion der Tiere eingeschränkt wird. Eine solche Veränderung wäre im Genpool der Populationen ablesbar.

Von VELAVAN et al. (2007) wurden zehn Mikrosatellitenprimer speziell für *Lumbricus terrestris* entwickelt, womit die Grundlagen für populationsgenetischen Analysen an dieser Probenart geschaffen wurden.

#### 2.2 Auswahl geeigneter Probenahmeflächen und Zeitreihen

Für die Untersuchungen wurden aus Praktikabilitätsgründen pro Probenart drei Populationen bzw. Probenahmeflächen (PNF) ausgewählt (siehe Tab. 1):

- Brassen: Elbe/Hamburg-Blankenese (Norden), Donau/Jochenstein (Süden), Saar/Güdingen (Westen), Gewährleistung der räumlichen Repräsentativität für Deutschland von 17 Brassen UPB-PNF,
- Miesmuschel: Jadebusen, Sylt-Königshafen, Darßer Ort (alle UPB-PNF),
- Aalmutter: Transekt Varel-Mellum, Meldorfer Bucht, Darßer Ort (alle UPB-PNF),
- Regenwurm: Halle/Würfelwiese, Leipzig gesamt, Saartal (alle UPB-PNF, auf denen routinemäßig Lumbricus terrestris gesammelt wird).

	PN	PNF	Bezeichnung	Ind./Pop	n 2009	n 2010
Brassen	Juli-August	3	Güdingen, Hamburg- Blankenese, Jochenstein	30	90	90
Miesmuschel <sup>1</sup>	Juni	3	Jadebusen, Sylt-Königshafen, Darßer Ort	30	90	90
Aalmutter	Mai-Juni	3	Transekt Varel-Mellum, Meldorfer Bucht, Darßer Ort	30	90	90
Regenwurm	Oktober	3	Halle/Würfelwiese, Leipzig, Saartal	30	90	<u> </u>

Tab. 1: Probenanzahlen der ausgewählten Probenarten (Individuenbasierter Ansatz, n=630)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> ein Probenahmetermin der 2-monatigen UPB-Routineprobenahme

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> vereinbarungsgemäße Einstellung der Untersuchungen vor der Regenwurm-Probenahme 2010, Erläuterung in Kap. 3.1.4.2

Veränderungen auf Allelebene sind nur dort belegbar, wo eine ausreichende Zahl von Generationen berücksichtigt wird. Aus diesem Grund ist die Länge der vorliegenden Zeitreihen ein weiteres Kriterium für die Flächenauswahl.

Der Brassen wird mit drei Jahren geschlechtsreif, so dass bei den in Tab. 2 dargestellten Zeitreihen von max. 17 Jahren von bis zu ca. fünf Generationen ausgegangen werden kann. Die PNF Jochenstein wurde trotz der erst seit 2002 durchgeführten Routineprobenahme aufgrund der räumlichen Repräsentativität ausgewählt (siehe Kap. 2.1).

Wie aus Tab. 2 ebenfalls hervorgeht, liegen zur Miesmuschel Zeitreihen von 17, 20 bzw. 22 Jahren vor. Vor dem Hintergrund einer angenommenen Geschlechtsreife von ca. drei Jahren ist deshalb bei der Miesmuschel von ca. sechs bis sieben Generationen auszugehen.

Ähnliches gilt für die Aalmutter, deren Probenreihen einen Zeitraum von bis zu 17 Jahren abdecken. Da die Geschlechtsreife mit ca. zwei Jahren erreicht ist, werden etwa sieben Generationen berücksichtigt (siehe Tab. 2).

In Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen reproduziert *L. terrestris* jährlich. Somit kann bei den vorliegenden 15 bzw. 16 Jahreshomogenaten von etwa 10-15 Generationen ausgegangen werden.

An allen genannten Probenahmeflächen wurden Untersuchungen zur Alleldiversität der jeweiligen Populationen sowie retrospektive Untersuchungen zur Allelzusammensetzung der Jahreshomogenate durchgeführt. Dazu wurden im Rahmen des individuenbasierten Ansatzes Gewebeproben aus den Jahren 2009 und 2010 von jeweils 30 Individuen analysiert. Bei der retrospektiven Betrachtung der Jahreshomogenate wurden alle verfügbaren Homogenate der entsprechenden Probenahmeflächen berücksichtigt. Die Summe der jeweiligen Probenzahlen ergeben sich aus Tab. 1 und Tab. 2.

Zusätzlich wurden die bisher vorhandenen Einzelproben der Brassen-Blutplasmen aus den o.g. Populationen hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution sowie möglicher Allelveränderungen gescreent (Tab. 3). Dieser Ansatz dient zur Verbesserung der Datenlage für eine weiterführende Interpretation der erzielten Ergebnisse.

Probenart	PNF	Jahre	n
Brassen	Güdingen/Saar	1992, 1994-2008	16
	Hamburg-Blankenese/Elbe	1993-2008	16
	Jochenstein/Donau	2002-2008	7
Miesmuschel	Jadebusen/Eckwarderhörne	1985-1986, 1990, 1992-2008	21
	Sylt-Königshafen (inkl. südlich Lister Hafen)	1986, 1988, 1990, 1992-2008	20
	Darßer Ort	1992-1996, 1998-2008	16
Aalmutter	Transekt Varel-Mellum	1994-2008	15
	Meldorfer Bucht (inkl. Trischen)	1992-2000, 2002-2008	16
	Darßer Ort	1994-1996, 1998-2008	14
Regenwurm	Halle/Würfelwiese	1993-1997, 2000-2008	14
	Leipzig Gesamtgebiet	1994-2008	15
	Saartal	1994-2008	15

Tab. 2:Ausgewählte Zeitreihen bei den vier Modellorganismen und Übersicht über alle verwendeten<br/>Homogenatproben (Retrospektiver Ansatz, n=185)

Tab. 3: Übersicht über die analysierten Blutplasma-Proben von Brassen

PNG	PNF	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Σ
Saar	Güdingen	20	20	20	20	20	20	20	140
Elbe	Hamburg-Blankenese	20	20	20	20	20	20	20	140
Donau	Jochenstein	20	20	20	20	20	20	20	140
Σ		60	60	60	60	60	60	60	420

#### 2.3 Populationsgenetische Methoden

Mikrosatelliten sind nicht codierende Bereiche des Kerngenoms, die durch kurze repetitive Nukleotid-Sequenzen gekennzeichnet sind (sogenannte *"simple sequence repeats"*, SSRs). Aufgrund dieser Eigenschaften gelten sie als die variabelsten Bereiche des Genoms und sind inzwischen für populationsgenetische Analysen die Methode der Wahl. Mit Hilfe von SSRs lassen sich die genetische Variabilität in Populationen oder die genetische Differenzierung zwischen Populationen analysieren, aber auch Elternschaftsanalysen und Identitätsnachweise führen. Aufgrund der hohen Auflösung von Mikrosatelliten-Daten lassen sich auch Individuen unbekannter Herkunft einer Population zuordnen (Assignment-Tests). Da Mikrosatelliten co-dominante Marker sind, ist es möglich, Heterozygotiegrade direkt zu bestimmen. Allerdings ist dies nur bei individuenbasierten Probenahmen möglich. Bei gepoolten Proben (Homogenaten) kommt es zu einer Durchmischung, bei der zwar die genetische Variabilität der Population durch die Zahl der Allele, nicht aber durch den Heterozygotiegrad darstellbar ist. Zwar wäre eine Analyse der gepoolten Daten auch mit Hilfe anderer Marker (z.B. Amplified Fragment Length Polymorphism [AFLP]) denkbar, zur bestmöglichen Vergleichbarkeit der Ergebnisse von individuenbasiertem und retrospektivem Ansatz werden aber identische Marker verwendet.

#### 2.3.1 DNA-Isolierung

Bei allen Proben erfolgt die DNA-Isolation mit einem handelsüblichen DNA-Extraktions-Kit: QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit. Bei den Gewebe- und Homogenatproben werden je 20 g, bei den Plasmaproben der Brassen 150 µl abgemessen und die DNA laut Anleitung des Kits isoliert (1. Lysierung der Zellen der Proben mit 180 µl ATL-Puffer und Zerstörung von Proteinen mit 20 µl Proteinkinase K (55°C für 1-3 h); 2. Weitere Degradierung der Zellmembranen und Denaturierung der Proteine durch 200 µl AL-Puffer (Inkubation bei 70°C für 10 min); 3. Fällung der DNA mittels 200 µl 99%-igem Ethanol; 4. Freilegung der DNA durch mehrfache Abzentrifugation der in Waschpuffer gelösten Zellreste durch Trennsäulen (nacheinander je 500 µl Waschpuffer AW 1 und AW 2); 4. Eluierung der DNA aus der Trennsäule mithilfe von 200 µl AE-Puffer).

Die so gewonnene DNA-Stammlösung wird im Falle der Gewebe- und Homogenat-Proben für die folgenden Arbeitsschritte 1:10 verdünnt. Die DNA-Quantifizierung erfolgte mit dem Qubit-Fluorometer (Invitrogen). Hierbei wird mit Hilfe des Quant-iT dsDNA BR Assay Kit die DNA durch einen fluoreszierenden Farbstoff angefärbt. Die Farbmoleküle lagern sich an die DNA an und absorbieren das UV-Licht, wodurch im darauffolgenden Schritt die DNA durch den Qubit-Fluorometer auf der Grundlage des Vergleichs mit zwei Standardlösungen (0ng/µl und 100ng/ µl) quantifiziert werden kann.

#### 2.3.2 Mikrosatelliten-Analyse

Aus statistischen Gründen wurde die Nutzung von zehn Mikrosatelliten-Primern pro Art angestrebt. Dazu wurden bereits publizierte art- bzw. gattungsspezifische Mikrosatelliten-Primer hinsichtlich ihrer potenziellen Eignung überprüft. Die in den Tab. 5 bis Tab. 9 gelisteten Markersysteme wurden ausgewählt. Die entsprechenden Primer werden sowohl für die Individual- als auch für die Homogenatanalysen verwendet. Bei einer Auswahl von circa 10 Loci steht auch bei unzureichendem Verlauf des einen oder anderen Assays immer noch eine statistisch ausreichende Zahl auswertbarer Loci zur Verfügung.

Die Durchführung der PCRs erfolgte in allen Fällen mittels Thermocycler der Firmen Biometra, Eppendorf und Labnet. Die Fragementlängenanalysen wurden auf einem MEGABACE 1000-Sequenzierer der Firma GE Healthcare durchgeführt. Die PCRs wurden mithilfe des Mastermixes 5Prime HotMasterMix durchgeführt, wobei pro Probe 4,5 µl des mit den Primern versetzten Mastermixes (2,2 µl Mastermix, 2,9 µl Wasser (für Plasmaproben aufgrund des geringeren DNA-Gehaltes 2,65 µl Wasser) und 0,1 µl pro Primer) mit 0,5 µl DNA angesetzt wurden. Mithilfe von Gradienten-PCRs und Gelelektrophorese wurde zunächst die optimale Annealing-Temperatur ermittelt, wobei die Temperaturen aus den Literaturangaben als Orientierung dienten (vgl. Tab. 5ff). Die übrigen PCR-Temperaturen waren wie folgt: Initiale Denaturierung: 94°C, 120 sec.; Denaturierung: 94°C, 30 sec.; Annealing: 30 sec.; Synthese: 65°C, 60 sec.; Finale Extension: 65° C, 10 min. Der zentrale Zyklus wurde 33 mal wiederholt.

Die verwendeten Annealing-Temperaturen sind in Tab. 4 dargestellt. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, konnten bei der Miesmuschel trotz einer breit angesetzten Temperaturskala (40-65°C) und wiederholten Versuchen bei verschiedenen DNA- und Mastermix-Konzentrationen, mit den Primern *MT279* und *MT288* keine und mit den Primern *Mgµ2* und *Mgµ7* nur Fragmentlängen außerhalb des erwarteten Längenbereichs festgestellt werden. Da somit keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden diese Loci für die weitere Laborarbeit nicht weiter berücksichtigt. Ähnliches gilt für die Verwendung von *LTM026*, *LTM109*, *LTM208* und *LTM278* bei der Analyse von *Lumbricus terrestris*. Auch hier konnte trotz einer breiten Temperaturskala bei den Gradienten-PCRs (37-63°C) und wiederholten Versuchen bei verschiedenen DNA- und Mastermix-Konzentrationen keine Annealing-Temperatur ermittelt werden, die eine erfolgreiche Amplifikation von PCR-Produkten erlaubte. Aus diesem Grund wurden diese Primer von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Für die Probenart Aalmutter standen Mikrosatelliten-Primer nicht zur Verfügung und wurden speziell angefertigt. Diese Entwicklungsaufgabe wurde von der Firma GENterprise GmbH, Mainz, übernommen. Inhalte dieser Arbeiten waren Vortests zur quantitativen Detektion von Mikrosatelliten in genomischer DNA, Anreicherung von Mikrosatelliten-Loci und Konstruktion einer Mikrosatelliten-Bank, Sequenzierung der Mikrosatelliten sowie die Etablierung und Optimierung des PCR-Assays. Insgesamt wurden 35 Primerpaare entworfen und synthetisiert. Von diesen wurden 32 PCR-Produkte sequenziert, während bei den drei übrigen Loci aufgrund von Replikationsproblemen auf eine Sequenzierung variabel, so dass für diese Arbeit 24 mögliche Primerpaare zur Verfügung standen. In Vortests wurden mittels Gelelektrophorese 10 Primerpaare ausgewählt, welche die besten PCR-Ergebnisse lieferten (vgl. Tab. 4, Tab. 7 und Kap. 3.1.3.1).

Brassen	I										
Locus	Ca1	Ca3	CypG24	CypG27	CypG30	Lid1	Lid8	Rhca20	Rru3	Z21908	
Ta [°C]	54°C	56°C	59°C	50°C	60°C	52°C	55°C	45°C	58°C	50°C	
Miesmuschel											
Locus	Me15/16	MT203	MT279	MT282	MT288	Mgµ1	Мдµ3	Mgµ4	Mgµ5	Mgµ6	
Ta [°C]	55°C	55°C	k.A.	55°C	k.A.	50°C	55°C	53°C	k.A.	k.A.	
Aalmutt	er										
Locus	A01-Zvi1	B08-Zvi2	B10-Zvi1	B12-Zvi1	C01-Zvi1	D01-Zvi1	D10-Zvi1	E10-Zvi1	F03-Zvi2	H03-Zvi1	
Ta [°C]	59°C										
Regenw	urm										
Locus	LTM 026	LTM 109	LTM 128	LTM 163	LTM 165	LTM187	LTM 193	LTM 208	LTM 252	LTM 278	
Ta [°C]	k.A.	k.A.	60°C	60°C	63°C	~60°C	60°C	k.A.	37°C	k.A.	

## Tab. 4: Mittels Gradienten-PCR ermittelte Annealing-Temperatur [Ta] bei den verwendeten PCR-Assays

Locus	Primersequenz (5'-3')	Modifikation	Repeat	Ta [°C]	Allel- zahl	Allel- größe	Accession Nr.	Quelle
Ca1	F: AAGACGATGCTGGATGTTTAC	NED	(CA) <sub>24</sub>	58	3	107-117	AF277473	Dimsoski et al. 2000, Holmen et al. 2005,
	R: CTATAGCTTATCCCGGCAGTA							Ghasemi et al. 2007, Hamilton & Tyler 2008
Ca3	F: GGACAGTGAGGGACGCAGAC	FAM	(TAGA) <sub>14</sub>	55	4	251-311	AF277475	Dimsoski et al. 2000, Holmen et al. 2005,
	R: TCTAGCCCCCAAATTTTACGG							Ghasemi et al. 2007, Hamilton & Tyler 2008
CypG24	F: CTGCCGCATCAGAGATAAACACTT	HEX	(CAGA) <sub>19</sub>	TD	4	172-192	k.A.	Baerwald & May 2004,
	R: TGGCGGTAAGGGTAGACCAC							Hamilton & Tyler 2008
CypG27	F: AAGGTATTCTCCAGCATTTAT	HEX	(TAGA) <sub>8</sub>	TD	6	284-320	k.A.	Baerwald & May 2004,
	R: GAGCCACCTGGAGACATTACT							Hamilton & Tyler 2008
CypG30	F: GAAAAACCCTGAGAAATTCAAAAGA	NED	(TAGA) <sub>7</sub>	TD	3	164-209	k.A.	Baerwald & May 2004,
	R: GGACAGGTAAATGGATGAGGAGATA							Hamilton & Tyler 2008
Lid1	F: TAAAACACATCCAGGCAGATT	NED	(CT) <sub>5</sub> (CA) <sub>20</sub>	53	3	252-258	AB112732	Barinova et al. 2004,
	R: GGAGAGGTTACGAGAGGTGAG							Hamilton & Tyler 2008
Lid8	F: AAATGCTAATGTTTCATCCATA	HEX	(GA) <sub>11</sub>	53	3	111-125	AB112735	Barinova et al. 2004,
	R: AAGCCTTCCTCTTGTTCC							Hamilton & Tyler 2008
Rhca20	F: CTACATCTGCAAGAAAGGC	FAM	(GA) <sub>17</sub>	50	5	84-110	k.A.	Girard & Angers 2006
	R: CAGTGAGGTATAAAGCAAGG							Hamilton & Tyler 2008
Rru3	F: GGGGAGTCTGGCTTCAGG	HEX	(ACTC) <sub>5</sub> N <sub>21</sub>	55	4	150-159	AB112739	Barinova et al. 2004,
	R: CGGCACACAGGGAGGTTA		(GT)7A(TG)6					Hamilton & Tyler 2008
Z21908	F: ATTGATTAGGTCATTGCCCG	FAM	k.A.	TD	4	145-179	k.A.	http://zfin.org,
	R: AGGAGTCATCGCTGGTGAGT							Hamilton & Tyler 2008

#### Tab. 5: Eckdaten der verwendeten Primer- bzw. Primerkombinationen für Abramis brama

Tab. 6:	Eckdaten der verwendeten Primer- bzw	. Primerkombinationen für Mytilus spp.
---------	--------------------------------------	--

Locus	Primersequenz (5'-3')	Modifikation	Repeat	Ta [°C]	Allel- zahl	Allel- größe	Accession Nr.	Quelle
Me15/16	Me 15: CCAGTATACAAACCTGTGAAGAC	NED	k.A.	56	3	126-180	k.A.	Inoue et al. 1995
	Me16: TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAGA							
Mgµ1	F:ATCAGAATGGCAAAGAAAAA	HEX	(TG)n(AT)n	56	8	178-184	AF445370	Presa et al. 2002
	R:ACTATGATGGCTGAGAGGATA							
Mgµ3	F: AAACTAAAAACTTCATCTAATCCC	HEX	(TG)n	60	4	145-151	AF445372	Presa et al. 2002
	R:AAGCAATCCAAAGTGAGAGG							
Mgµ4	F:CCTTACTATGCGTCGTTCAA	HEX	(TG)n	53	7	91-131	AF445373	Presa et al. 2002
	R:TGACCAACACTCCAAAAATC							
Mgµ5	F: ACTTCTCCGGTAACATAATA	FAM	(TTG)n	60	6	134-150	AF445374	Presa et al. 2002
	R: AGTCTTTCCCCTATGATGA							
Mgµ6	F:GGGAAAGACTGCCTAACAAT	FAM	(AAT)n	60	6	220-238	AF445375	Presa et al. 2002
	R: CTCTTACATAGAAAATGGTTCG							
MT203	F: GTTTTCCGAATGGCGAGATA	FAM	(CA) <sub>8</sub>	50	8	174-206	BV725482	Gardeström et al. 2008
	R: ACAACCAGTTCAATAGCGACA							
MT279	F: GTTGGTTGAAACAGTTTGGTAGC	NED	(CA)7	50	9	229-285	BV725483	Gardeström et al. 2008
	R: CGATCGGATTTTGTATAATGCTT							
MT282	F: TGCCACATTGTTTTCAAGGA	HEX	(GT) <sub>9</sub>	50	9	336-354	BV725484	Gardeström et al. 2008
	R: TTCACGACAGCGACTATGAAA							
MT288	F: CAAATGAATAGCGATAGAAGAACA	HEX	(TG) <sub>8</sub>	55	6	231-269	BV725485	Gardeström et al. 2008
	R: GCATATTTGTCCCAATTTGATAG							

Locus	Primersequenz (5'-3')	Modifikation	Repeat	Ta [°C]	Allel- zahl	Allel- größe	Accession Nr.	Quelle
A01_Zvi1	ACTTAAAGCACAGATCACTGAC	HEX	(AAG) <sub>14</sub>	59	k.A.	240	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	ATGCAGTATGACGAGAACCG							
B08_Zvi2	ACAGTTGTGCTGACGCTCAC	HEX	(TG) <sub>33</sub>	59	k.A.	268	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	CTGGTTCATTTGTTTACGCCTC							
B10_Zvi1	TGCTGCGACGGATCATCAGT	FAM	(CA)23	59	k.A.	391	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	ATCGGCCTCGTTCAGTTATG							
B12_Zvi1	GTTGAACTGTTGTTACCTGCGA	HEX	(TC)11	59	k.A.	172	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	GTTGGCTTCATGCCTCGTC							
C01_Zvi1	GGATGTGATGGATCTGCACTG	FAM	(GT)21	59	k.A.	229	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	TGAAGCGCAGTCCGAAGTAG							
D01_Zvi1	ACTGAGGCTACACGGTACGT	HEX	(AG)23	59	k.A.	355	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	CATGTATAGAACTGTGCCGAG							
D10_Zvi1	CCTGGCAACTTTCCAAACAG	TAMRA	(AC)21	59	k.A.	270	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	ATAGATCTGACATGCATTCGTC							
E10_Zvi1	AGTTGGCGATTACCCAGGC	FAM	(TG)16	59	k.A.	266	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	CTGTCGTAAATGCACAAGTGTC							
F03_Zvi2	TAAACGAAGTCTGAGCTCTGC	FAM	(CA)32	59	k.A.	354	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	CTTTGTCGGTATCGCATCCTC							
H03_Zvi1	AGCGCAGCATGAAGGCGAT	TAMRA	(AAC)8	59	k.A.	182	in Vorbereitung	Kinitz et al. 2011
	AGAGCAAAACGGCGACAATG							

#### Tab. 7: Eckdaten der verwendeten Primer- bzw. Primerkombinationen für Zoarces viviparus

Locus	Primersequenz (5'-3')	Modifikation	Repeat	Ta [°C]	Allel- zahl	Allel- größe	Accession Nr.	Quelle
LTM 026	F: GTGCCTCTGTCTAATGTCTGCTCGTGTGTA	NED	(GT) <sub>17</sub>	55	18	150-298	AM419426	Velavan et al. 2007
	R: GCCGCTCTTTATACGCTCGTCGC							
LTM 109	F: CGAACAAGATTACATACAACACAGGT	HEX	(GT) <sub>19</sub>	52	15	124-336	AM419427	Velavan et al. 2007
	R: TTGGAGTGTACAGAATATGGCATGCA							
LTM 128	F: CACGCTGTTGTTTCGCTCTTTGTT	NED	(CA) <sub>11</sub> (TCTG) <sub>20</sub>	60	14	192-268	AM182478	Velavan et al. 2007
	R: CCGGGGACTGAGGAGAGAAAGACA							
LTM 163	F: GCCGGAGCGTTAGGAGCGATAG	FAM	(TGAC) <sub>12</sub>	60	12	138-216	AM182479	Velavan et al. 2007
	R: GGATACGCCCGACTCACCACTAA							
LTM 165	F: TGACTGACACGCACCAACTAACTAACT	HEX	(TCAC) <sub>15</sub>	60	14	152-212	AM182480	Velavan et al. 2007
	R: TGGCTTAAGCTAGTGATTGAGTGAGTGA							
LTM 187	F: CTTCGTTTTCTTAGCCTCAGCATATG	HEX	(TC) 17	60	11	190-388	AM419428	Velavan et al. 2007
	R: CCGAATTGAAGACGTGCATCCA							
LTM 193	F: TCATTCCCCGACATCCAACAGA	FAM	(TGA) <sub>10</sub>	60	11	204-312	AM182481	Velavan et al. 2007
	R: TGCGTAAAGCCAATGAACCTGC							
LTM 208	F: AGGCAGGTAATCATTCAAGCAGAGAGAGA	NED	(GA) <sub>23</sub>	60	5	170-206	AM419429	Velavan et al. 2007
	R: CGATTGTTTCTCCGTTTAGCGTTCTTAT							
LTM 252	F: ACTCGTCAAAGGTACGCACTC	FAM	(CA) <sub>43</sub>	52	15	156-368	AM419430	Velavan et al. 2007
	R: AGCAATGCAAAGTTGCAAACATACAC							
LTM 278	F: TGGAATCTACAGAATATGGCATGC	HEX	(CA) <sub>40</sub>	52	13	188-298	AM419431	Velavan et al. 2007
	R: GCACCGAGCAATGGAAGTTT							

 Tab. 8:
 Eckdaten der verwendeten Primer- bzw. Primerkombinationen für Lumbricus terrestris

Locus	Primersequenz (5'-3')	Modifikation	Repeat	Ta [°C]	Allel- zahl	Allel- größe	Accession Nr.	Quelle
A1028	F: GTAGTTTATGCAGGTAGCCC	FAM	(ATG) <sub>23</sub> (CAA) <sub>5</sub>	52	k.A.	360	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: GTACCTGAGATCCCTCAGCA							
B0109	F: AGCCCTATAAGGTTGACTCAG	HEX	(ATT) <sub>6</sub>	52	k.A.	248	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: ACTCCAAGCCGATCACGTG							
B0118	F: ATCGTCGTTCTTAGACACCTC	HEX	(ATT) <sub>6</sub>	52	k.A.	248	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: CCTGTGTTGTCATAAGCTGTC							
B0222	F: ATCAAGATCCACCAGCGGTG	HEX	(CA) <sub>5</sub> (ACAG) <sub>14</sub>	59	k.A.	332	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: GGGCCGTAAATCTGTTTCGAC							
B0519	F: TGCCCTGAGGTATTTCATTCC	FAM	(TAT) <sub>10</sub>	59	k.A.	260	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: ATATCTAGCGGGAAGCCGTC							
C0431	F: CCTTGGCTACAGAGAGGTAG	TAMRA	(TTA) <sub>29</sub>	59	k.A.	288	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: ACTTTCGGTCACAATTCAGCG							
C0642	F: GCAGTGCGTTTGTCAGGC	FAM	(TTA) <sub>30</sub>	59	k.A.	328	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: CTCCGACTTTATGTATGCTCAG							
D1005	F: TACCGCCTTAAAATGCTGTGTC	HEX	(CA) <sub>8</sub>	59	k.A.	227	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: TCGACCTTTGCGTCATAGTGA							
D1236	F: TTTCCGAGGTACATACGATCC	HEX	(TTA) <sub>8</sub>	52	k.A.	196	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: CCGTAGCTTCAGAGGCAC							
E0537	F: TTTCGACGAGTAGCAGAGGA	FAM	(CAT) <sub>3</sub> (CAG) <sub>6</sub>	59	k.A.	213	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: AACCCAGATCACGTATGGTC							

#### Tab. 9: Eckdaten der verwendeten Primer- bzw. Primerkombinationen für Aporrectodea longa

#### Fortsetzung:

Locus	Primersequenz (5'-3')	Modifikation	Repeat	Ta [°C]	Allel- zahl	Allel- größe	Accession Nr.	Quelle
F0212	F: TTAGCAGGTGTCTCCACACG	FAM	(ACCAT) <sub>4</sub>	59	k.A.	164	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: CGCTCGCCACTGACTTATAG							
H0716	F: CGTGCCTAAGAGTTTTCGGC	TAMRA	(CGCT) <sub>5</sub>	52	k.A.	256	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: TCGCACCAATCGAACGCCA							
H0906	F: ACCAATCCCGCTATTCTCATG	FAM	(TCTG) <sub>5</sub> A(CT) <sub>4</sub>	53	k.A.	240	in Vorbereitung	Strunk et al. 2011
	R: ACTCCAAGCCGATCACGTG							

#### 2.3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten des individuenbasierten Ansatzes erfolgte mit Hilfe des Programmes GenAlEx Version 6.1 (PEAKALL & SMOUSE 2006). Als wichtigste Kriterien zur Charakterisierung der untersuchten Populationen wurden hierbei die Anzahl der Allele (*Na*) sowie die Anzahl effektiver Allele (*Ne*<sup>3</sup>) sowie beobachtete Heterozygotie (*H<sub>o</sub>*) und die nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) erwartete Heterozygotie (*He*) herangezogen. Aus diesen Daten wurden die Fixierungsrate (*F*), die Genetische Distanz und Ähnlichkeit nach Nei (1972) sowie der  $F_{ST}$ -Wert abgeleitet und ein Assignment-Test durchgeführt. Zur tiefergehenden Interpretation der Daten wurde die *allelic richness* mit der Software FSTAT Version 2.9.3 (GOUDET 1995) berechnet. Diese gibt die Anzahl an Allelen pro Locus bezogen auf die kleinste Stichprobengröße wieder. Zudem wurde ein Assignment-Test basierend auf einer Bayes'schen Analyse durchgeführt, um die jeweiligen Populationsstrukturen zu identifizieren und zu visualisieren. Hierfür wurde das Programm STRUCTURE Version 2.3.3 (PRITCHARD et al. 2000, HUBISZ et al. 2009) verwendet.

Die Auswertung der Ergebnisse der Homogenatanalyse ist im Vergleich dazu nur sehr eingeschränkt möglich, da zur Anwendung dieser Parameter statistische Voraussetzungen zu erfüllen sind, die von Homogenaten nicht erbracht werden. Homogenate erfüllen aufgrund ihres Mischprobencharakters weder alle zur Anwendung der genannten Parameter erforderlichen Voraussetzungen der Hardy-Weinberg-Regel, noch kann aufgrund des Dominanzproblems<sup>4</sup> die Allelfrequenz und die Frequenz des Nullallels innerhalb einer Population berechnet werden. Die statistische Auswertung der Homogenate muss sich demnach auf die Berechnung der Ähnlichkeitsmaße und deren weitere Verwendung in Cluster- oder Hauptkomponentenalysen beschränken. Aufgrund der zu erwartenden Überschätzung der Homogenat-Ähnlichkeit durch die in der Populationsgenetik üblicherweise genutzten Ähnlichkeitsindizes, wie beispielsweise die Band-Sharing-Rate (BSR; Sörensen-Index, Czekanowski-Index), wurde deshalb auf ein einfacheres Ähnlichkeitsmaß zurückgegriffen. Die Einfache Ähnlichkeit (SM, *simple matching coefficient*) berücksichtigt sowohl das gemeinsame Auftreten als auch das gemeinsame Fehlen einer Bande als gleichwertige Information.

Die vergleichsweise guten Datenlage bei der Analyse der Brassen-Homogenatproben erlaubte außerdem die Verwendung des populationsgenetischen Auswerteprogrammes ARLEQUIN Version 3.5.1.2 (Excoffier et al. 2009). Hier wurde die ermittelte 0/1-Matrix als RFLP-Datensatz eingelesen und analysiert, wobei die einzelnen Jahre als Individuen innerhalb der Populationen codiert wurden. Damit wurde die Erhebung zusätzlicher populationsgenetischer Parameter wie Theta-Pi und F<sub>ST</sub> sowie die Darstellung eines *minimum spanning trees* ermöglicht.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Das Programm GenAlEx verwendet diese Abkürzung standardmäßig; zur Vermeidung von Verwirrung weisen wir an dieser Stelle jedoch darauf hin, dass *Ne* in der Populationsgenetik normalerweise die genetisch effektive Populationsgröße beschreibt, eine Populationskenngröße, die wir für den vorliegenden Bericht nicht berechnet haben.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Theoretisch ist davon auszugehen, dass in einem Homogenat ein Allel als anwesend betrachtet werden kann, wenn es zumindest in einem Individuum des Homogenates anwesend ist. Es kann somit anhand des Homogenates nicht unterschieden werden, ob ein Allel in den Populationen nur ein einziges Mal oder in mehreren oder sogar allen Individuen auftritt. Da dies aber – in Form der Allelfrequenz – ein wichtiges Kriterium in populationsgenetischen Analysen darstellt, geht mit der Homogenatbildung ein wesentlicher Informationsverlust einher, wenn Populationen durch die aus ihnen gebildeten Homogenate genetisch charakterisiert werden sollen.

## 3 Ergebnisse

#### 3.1 Individuenbasierter Ansatz

Ziel des individuenbasierten Ansatzes ist die genetische Charakterisierung ausgewählter Populationen und Arten. Neben der Beschreibung des *status quo* der Allelzusammensetzung dieser Populationen wird mit der Probengewinnung und genetischen Analyse gleichzeitig eine Grundlage für spätere vergleichende Untersuchungen gelegt. Auf Basis dieser Vergleiche sind Rückschlüsse über Veränderungen in der Allelzusammensetzung über die Jahre möglich.

Bei der Untersuchung von 30 Individuen pro Population handelt es sich um eine in der Populationsgenetik üblicherweise genutzte Stichprobe. Die Wiederholung von Probenahme und Analyse einer identischen Zahl an Individuen im Folgejahr ermöglicht darüber hinaus eine Validierung der bei der Erstuntersuchung erzielten Ergebnisse.

#### 3.1.1 Brassen (Abramis brama)

#### 3.1.1.1 Untersuchungen 2009

Die Probenahmen an Brassen erfolgten an allen drei Probenahmeflächen parallel zu den Routine-Probenahmen 2009<sup>5</sup> (KLEIN et al. 2010a). Dabei wurden von den jeweils 20 in der Routine gefangenen Brassen ein Stück des rechten Filets entnommen und separat für diese Untersuchungen verpackt bzw. eingefroren. Um die notwendige Stichprobe von 30 Individuen zu erreichen, wurden jeweils zusätzlich zehn weitere Tiere gefangen und identisch behandelt. Aufgrund ungenügender Fangergebnisse in Folge eines anhaltenden Niedrigwasserereignisses musste in Jochenstein/Donau ein Zusatztermin für die Probenahme wahrgenommen werden.

Im Rahmen der populationsgenetischen Analyse der Brassen-Einzelindividuen wurden von allen Tieren DNA aus dem Muskelgewebe extrahiert und hinsichtlich ihrer Allelzusammensetzung mittels Mikrosatellitenanalyse untersucht. Mit neun der zehn in Tab. 5 gelisteten Marker konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Der Marker *Ca3* wurde aufgrund schlechter Replikation aus der weiteren Untersuchung herausgenommen.

Wie aus Tab. 10 hervorgeht, konnten an den neun Loci zwei bis 23 Allele detektiert werden, was eine gute Grundlage für die populationsgenetische Charakterisierung darstellt. Allerdings unterscheiden sich die neun Loci hinsichtlich ihrer Variabilität deutlich. Während am Locus *RhCa20* lediglich zwei Allele detektiert wurden, weisen *CypG27* und *CypG30* mit 20 bzw. 23 Allelen einen deutlich höheren Informationsgehalt auf. Hinsichtlich des Beitrages der Loci *CypG24* und *Z21908* zum Gesamtergebnis ist darauf hinzuweisen, dass beide Loci signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen. Insbesondere bei *Z21908* sind Nullallele zu vermuten.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> In der Folge wird aus Praktikabilitätsgründen die Elbe-PNF Blankenese mit "Hamburg" bezeichnet.

Betrachtet man die über alle Primer ermittelten populationsgenetischen Kenngrößen, so wird deutlich, dass sich die drei Populationen hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution unterscheiden (Tab. 11). Sowohl die Allelzahl als auch die *allelic richness* sind bei der Donau-Population aus Jochenstein höher als bei der Elbe- und Saar-Population. Die Diversitätsmaße der Elbe-Population werden maßgeblich vom Locus *CypG27* und *Z21908* geprägt, deren Ergebnisse, wie zuvor bereits erwähnt, aufgrund der signifikanten Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorsichtig zu interpretieren sind (Tab. 12). Die höhere Anzahl effektiver Allele in der Elbe-Population ist auf eine gleichförmigere Verteilung der Allele zurückzuführen.

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
Ca1	NED	10	96-122	110
CypG24	HEX	9	168-206	188
CypG27	HEX	20	278-338	286
CypG30	NED	23	165-255	211
Lid1	NED	11	244-268	254
Lid8	HEX	7	113-133	127
RhCa20 <sup>6</sup>	FAM	2	102-104	102
Rru3	HEX	7	151-169	165
Z21908	FAM	8	146-186	146

Tab. 10: Eckdaten der verwendeten Loci in der Brassen-Individualanalyse 2009

Je mehr Allele in einer Population vorhanden sind und je einheitlicher deren relative Häufigkeit ist, desto höher ist  $H_e$ . Weicht  $H_o$  stark von  $H_e$  ab, so ist dies meist auf nicht zufällige Paarungen innerhalb der Population zurückzuführen (etwa durch Strukturierung der Population oder Inzucht). Das  $H_o/H_e$ -Verhältnis kann demnach als Indikator für die genetische Ausstattung einer Population verwendet werden. Aus Tab. 11 geht hervor, dass die Abweichungen der beiden Werte verhältnismäßig gering sind, wenngleich die Jochensteiner Population einen erhöhten Inzuchtkoeffizienten (F) aufweist. Hieraus kann geschlossen werden, dass entweder eine Unterstrukturierung der Population oder erhöhte Inzucht vorliegt.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> In Folge der Ergebnisse der Untersuchungen 2010 wurden die Allelgrößen bei Marker *RhCa20* neu gescort. Demnach wurde das Allel mit einer Fragmentlänge von 102 bp häufigstes Allel. Einfluss auf die Ergebnisse hatte dieser Vorgang nicht.

allelic richness (AR), beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ ) erwartete Heterozygotie ( $H_e$ ) und Fixierungsindex (F) der untersuchten Brassen-Populationen über alle Loci (2009)							
	Ν	Na	Ne	AR	Но	He	F
Güdingen	28,7±0,6	6,44±1,46	3,87±0,74	5,87±3,76	0,617±0,072	0,669±0,051	0,093±0,063
Hamburg	28,2±0,8	8,22±1,83	5,13±1,28	7,56±4,83	0,643±0,076	0,720±0,048	0,117±0,075

8,28±4,43

0,615±0,081

0,716±0,064

4,99±1,01

22,7±0,6

Jochenstein

8,67±1,62

Tab. 11: Durchschnittliche Stichprobengröße (N), Anzahl der Allele (Na), Anzahl effektiver Allele (Ne),

Die im paarweisen Vergleich errechneten genetischen Distanzen zeigen, dass sich die genetisch diversere Donau-Population vergleichsweise deutlich von den beiden anderen Populationen differenzieren lässt (Tab. 13). Zwischen den beiden Populationen von Güdingen und Hamburg besteht nur eine vergleichsweise geringe genetische Distanz. Bestätigt wird dieses Muster durch die Analyse der F<sub>ST</sub>-Werte (Tab. 14). F<sub>ST</sub> ist das klassische Maß genetischer Differenzierung. Je höher der Wert ist, umso verschiedener sind die Populationen. Allerdings wird die übliche Skala (0-1) bei sehr polymorphen Markern (wie Mikrosatelliten) meist bei weitem nicht erreicht. Tab. 14 zeigt, dass die Differenzierung zwischen Jochenstein und Güdingen deutlich höher ist als zwischen Hamburg und Güdingen.

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein	Gesamt
Ca1	4,195	5,443	7,710	6,696
CypG24	4,698	5,973	7,714	6,602
CypG27	11,560	16,782	12,584	13,612
CypG30	12,191	14,448	17,352	16,016
Lid1	7,357	7,322	8,764	8,993
Lid8	4,864	5,620	6,864	6,258
Rhca20	2,000	2,000	2,000	2,000
Rru3	3,985	4,503	6,543	4,986
Z21908	2,000	5,910	5,000	5,515

Гаb. 12:	Allelic richness der untersuchten Brassen-P	Populationen, unterschieden nach Loci (2	009)
----------	---	--	------

Tab. 13: Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Brassen-Populationen (oberhalb der Diagonalen) und Nei's Genetische Identität der untersuchten Brassen-Populationen (unterhalb der Diagonalen) (2009)

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	-	0,135	0,290
Hamburg	0,874	-	0,200
Jochenstein	0,748	0,819	-

0,137±0,081

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	-	0,028	0,058
Hamburg		-	0,036
Jochenstein			-

#### Tab. 14: *F*<sub>ST</sub>-Werte der untersuchten Brassen-Populationen (2009)

Die Ursache der hohen genetischen Vielfalt der Jochensteiner Population und der starken Differenzierung der Donau-Brassen gegenüber den beiden anderen Populationen liegt im Vorhandensein zahlreicher privater Allele. Bei privaten Allelen handelt es sich um Allele, die ausschließlich in einer Population nachgewiesen werden konnten. Sie charakterisieren somit die betreffende Population, tragen aber aufgrund des vollständigen Fehlens in anderen Populationen wesentlich zur Differenzierung bei. Während in Güdingen lediglich zwei private Allele detektiert wurden, zeichnet sich die Elbe-Population aus Hamburg durch 13 private Allele aus (Tab. 15). Angemerkt werden muss, dass acht dieser 13 Allele den beiden Loci *CypG27* und *Z21908* zuzuordnen sind. Im Gegensatz dazu kann die Donau-Population durch 16 private Allele charakterisiert werden. Dies bekräftigt die genetische Eigenständigkeit der Jochensteiner Population, auch wenn diese Allele überwiegend in geringer Frequenz auftreten.

Рор	Locus	Allel	Frequenz	Рор	Locus	Allel	Fre
Güdingen	CypG27	336	0,019	Jochenstein	Ca1	96	(
Güdingen	CypG30	181	0,017	Jochenstein	Ca1	98	(
				Jochenstein	Ca1	116	(
Hamburg	Ca1	122	0,033	Jochenstein	Ca1	118	(
Hamburg	CypG24	168	0,043	Jochenstein	CypG24	194	(
Hamburg	CypG27	278	0,018	Jochenstein	CypG24	196	(
Hamburg	CypG27	282	0,036	Jochenstein	CypG24	206	(
Hamburg	CypG27	304	0,018	Jochenstein	CypG30	171	(
Hamburg	CypG27	308	0,018	Jochenstein	CypG30	187	(
Hamburg	CypG27	320	0,018	Jochenstein	CypG30	255	(
Hamburg	CypG30	191	0,100	Jochenstein	Lid1	250	C
Hamburg	CypG30	239	0,050	Jochenstein	Lid8	131	C
Hamburg	Lid1	264	0,017	Jochenstein	Rru3	151	C
Hamburg	Z21908	178	0,077	Jochenstein	Rru3	169	C
Hamburg	Z21908	182	0,038	Jochenstein	Z21908	154	C
Hamburg	Z21908	186	0,058	Jochenstein	Z21908	158	0

Tab. 15: Private Allele in den untersuchten Brassen-Populationen (2009)

Mit Hilfe des Programmes GenAlEx (V6.1) können sogenannte Assignment-Tests durchgeführt werden, die belegen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit der korrekten Zuordnung eines einzelnen Individuums zu der entsprechenden Population ist. Demnach können 90% der Saar-Brassen korrekt der Population Güdingen zugeordnet werden (Tab. 16). Mit 73% und 88% liegt die Zuordnung bei den anderen beiden Populationen in einem mittleren bis guten Bereich. Hiermit kann bestätigt werden, dass die Anzahl und Auswahl der verwendeten Loci eine effiziente Analyse der genetischen Konstitution der untersuchten Populationen erlaubt.

Die Bayes'sche Analyse des Populationsassignment mit Hilfe des Programmes STRUCTURE (V2.3.3) zeigt, dass sich die Population von Güdingen als vergleichsweise homogen präsentiert (Abb. 1). Lediglich die drei in Tab. 16 falsch zugeordneten Individuen fallen auch hier durch eine hohe Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu den anderen Populationen auf. Eine Unterscheidung der Hamburger und der Jochensteiner Population anhand des Plots ist nahezu unmöglich.

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Güdingen	90% (27)	10% (3)
Hamburg	73% (22)	27% (8)
Jochenstein	88% (21)	12% (3)
	83% (70)	17% (14)

## Tab. 16:Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden<br/>Brassen-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test) (2009)



Abb. 1: STRUCTURE-Plot der drei untersuchten Brassen-Populationen über alle Loci (2009)

#### Fazit

Aus den präsentierten Ergebnissen wird ersichtlich, dass mit den genutzten Methoden eine gute Datenlage zur Charakterisierung des Ist-Zustandes der Allelzusammensetzung der ausgewählten Populationen geschaffen werden konnte. An den neun verwendeten Loci konnten 2-23 verschiedene Allele detektiert werden, die detaillierte Aussagen über die genetische Konstitution der Populationen erlauben. Bestätigt wird die gute Aussagekraft der Marker durch die überwiegend korrekte Zuordnung der Individuen zu den entsprechenden Populationen im Assignment-Test. Weiterhin ist den Daten zu entnehmen, dass die Donau-Brassen im Vergleich mit den beiden Populationen von Elbe und Saar als genetisch diverser charakterisiert werden können. Dies legt den Verdacht nahe, dass die Population der Donau-Brassen wesentlich größer ist, oder aber, dass Unterstrukturierungen bestehen. Die genetische Einheitlichkeit der Güdinger Population kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass in diesem wesentlich kleineren und von Stauhaltungen geprägten Gewässer eine kleinere Population anzutreffen ist. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die festgestellten Allelzahlen auf eine hohe genetische Diversität der Populationen bzw. der Art rückschließen lassen.

#### 3.1.1.2 Untersuchungen 2010

Die Probenahmen an Brassen erfolgten auch 2010 an allen drei Probenahmeflächen parallel zu den Routine-Probenahmen. Dabei wurden von den jeweils 20 in der Routine (KLEIN et al. 2010a) gefangenen Brassen ein Stück des rechten Filets entnommen und separat für diese Untersuchungen verpackt bzw. eingefroren. Um die notwendige Stichprobe von 30 Individuen zu erreichen, wurden jeweils zusätzlich zehn weitere Tiere gefangen und identisch behandelt.

Die DNA-Extraktion erfolgte entsprechend der Vorgehensweise von 2009; die populationsgenetischen Analysen auf Basis der neun im Vorjahr festgelegten Markersysteme (vgl. Tab. 5, S. 11). Aufgrund von nicht überwindbaren Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit Primer *Rru3* wurde dieser Marker für die statistische Auswertung nicht mehr berücksichtigt.

Wie aus Tab. 17 hervorgeht, konnten insbesondere an den Loci mit einer geringeren Anzahl von Allelen die im Vorjahr ermittelten Werte zu Allelzahl, Allelgröße und Größe des häufigsten Allels annähernd bestätigt werden. Bei den Markern der *CypG*-Reihe wurden zum Teil jedoch abweichende Ergebnisse erzielt. Während an dem in allen drei Populationen signifikant (p<0,001) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichenden Locus *CypG24* drei weitere Allele hinzukamen wurden am Marker *CypG27* im Vergleich zum Vorjahr insgesamt sieben Allele weniger nachgewiesen. Auch bei den Untersuchungen im Jahr 2010 weicht der Locus *CypG24* signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ab.

Die im Jahr 2010 erzielten Werte der wichtigsten populationsgenetischen Kenngrößen bestätigen im Wesentlichen die Teilergebnisse des Jahres 2009: Im Vergleich der drei Populationen weist die Donau-Population die größte genetische Diversität auf, während die Saar-Population aus Güdingen durch die geringsten Diversitätsmaße charakterisiert werden kann (Tab. 18 und Tab. 19). Der im Vergleich zum Vorjahr in allen drei Populationen geringere  $H_o$ -Wert führt zu höheren Inzuchtkoeffizienten (F) im Jahr 2010. Neben natürlichen Ursachen (Unterstrukturierung der Population oder erhöhte Inzucht) kann hier aber eine Auswirkung des Zusammenspiels von größerer Stichprobe und geringerer Markerzahl nicht ausgeschlossen werden

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
Ca1	NED	12	94-122	110
CypG24	HEX	12	172-200	190
CypG27	HEX	13	278-330	306
CypG30	NED	23	167-239	183
Lid1	NED	11	244-268	254
Lid8	HEX	7	113-133	113
RhCa20	FAM	2	102-104	102
Z21908	FAM	9	144-182	146

Tab. 17: Eckdaten der verwendeten Loci in der Brassen-Individualanalyse 2010

Tab. 18:Durchschnittliche Stichprobengröße (M), Anzahl der Allele (Na), Anzahl effektiver Allele (Ne),<br/>allelic richness (AR), beobachtete Heterozygotie (H<sub>o</sub>) erwartete Heterozygotie (H<sub>e</sub>) und<br/>Fixierungsindex (F) der untersuchten Brassen-Populationen über alle Loci (2010)

	N	Na	Ne	AR	Ho	H <sub>e</sub>	F
Güdingen	30,0±0,0	6,38±1,43	4,07±0,91	6,38±4,03	0,550±0,075	0,681±0,050	0,210±0,058
Hamburg	30,0±0,0	8,75±1,73	5,67±1,48	8,75±5,18	0,629±0,076	0,729±0,058	0,117±0,103
Jochenstein	30,0±0,0	9,25±1,672	4,69±0,82	9,25±4,71	0,563±0,098	0,712±0,076	0,192±0,106

Tab. 19:	Allelic richness der untersuchten Brassen-Populationen.	unterschieden nach Loci	2010)
			,

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein	Gesamt
Ca1	4,0	7,0	9,0	8,210
CypG24	6,0	8,0	11,0	10,747
CypG27	12,0	13,0	12,0	12,562
CypG30	13,0	19,0	18,0	18,427
Lid1	6,0	9,0	9,0	9,232
Lid8	5,0	6,0	6,0	6,546
Rhca20	2,0	2,0	2,0	2,000
Z21908	3,0	6,0	7,0	6,168

Die im Vergleich zum Vorjahr höheren Diversitätsmaße führen im Jahr 2010 auch zu wesentlich höheren genetischen Distanzen. Ungeachtet der höheren Werte werden die tendenziellen Ergebnisse (geringere genetische Ähnlichkeit zwischen Donau- und Elbe-/Saar-Brassen, größere Ähnlichkeit zwischen Elbe- und Saar-Brassen) in vollem Umfang bestätigt (Tab. 20). Dasselbe gilt für die Analyse der  $F_{ST}$ -Werte (Tab. 21).

Tab. 20:Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Brassen-Populationen<br/>(oberhalb der Diagonalen) und Nei's Genetische Identität der untersuchten Brassen-<br/>Populationen (unterhalb der Diagonalen) (2010)

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	-	0,198	0,447
Hamburg	0,820	-	0,332
Jochenstein	0,640	0,717	-

#### Tab. 21: *F<sub>ST</sub>*-Werte der untersuchten Brassen-Populationen (2010)

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	-	0,035	0,079
Hamburg		-	0,056
Jochenstein			-

Aufgrund der Tatsache, dass bei der Untersuchung 2010 alle 90 Individuen erfolgreich analysiert werden konnten, wird im Assignment-Test (GenAlEx, V6.1) trotz der durch die Herausnahme des Primers *Rru3* bedingten geringeren Markerzahl eine wesentlich bessere Zuordnung der Tiere zu der jeweiligen Population erreicht (Tab. 22). Dies äußert sich auch in der Bayes'sche Analyse des Populationsassignments mit Hilfe des Programmes STRUCTURE (V2.3.3). Auch wenn nach diesem Verfahren die Zuordnung nicht ganz so eindeutig ausfällt, wird deutlich, dass sich die drei Populationen vergleichsweise gut voneinander abtrennen lassen und dass insbesondere die Donau-Population durch eigene Merkmale charakterisiert ist (Abb. 2). Eine derartige Unterscheidung der Populationen von Hamburg und Jochenstein war durch dieses Verfahren im Vorjahr nicht möglich (vgl. Abb. 1, S. 22).

Wesentliche Ursache für die "Sonderstellung" der Donau-Population ist die im Vergleich zum Vorjahr noch höhere Anzahl privater Allele. Während im Jahr 2009 sieben Allele als für diesen Standort charakteristisch angesehen wurden, waren es im Jahr 2010 sogar 15 Allele. Im Vergleich dazu zeichnen sich die Populationen von Güdingen und Hamburg durch ein bzw. sieben private Allele aus.

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Güdingen	100% (30)	0% (0)
Hamburg	100% (30)	0% (0)
Jochenstein	100% (30)	0% (0)
	100% (30)	0% (0)

 
 Tab. 22:
 Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden Brassen-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test) (2010)



Abb. 2: STRUCTURE-Plot der drei untersuchten Brassen-Populationen über alle Loci (2010)

#### 3.1.1.3 Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010

Die Analyse eines zweiten Untersuchungsjahres ermöglicht aufgrund der Vergrößerung der Stichprobe und des Wiederholungscharakters eine tiefergehende Interpretation sowie eine Validierung der Ergebnisse. Bei tendenziell vergleichbaren Ergebnissen beider Jahre zeigt die Gesamtbetrachtung jedoch ein im Vergleich zur Einzelbetrachtung differenzierteres Bild.

Durch die im Jahr 2009 untersuchte Stichprobe von insgesamt 84 Tieren wurde die genetische Diversität der Brassen-Populationen nicht in vollem Umfang erfasst. Die Berücksichtigung von 90 weiteren Tieren ermöglichte den Nachweis von insgesamt 15 weiteren Allelen, wodurch letztlich auch die Sonderstellung der Population von Jochenstein unterstrichen wird. Gerade diese "seltenen Allele" sind für die Differenzierung von Populationen maßgebend.

Werden die beiden Datensätze der Jahre 2009 und 2010 zusammen ausgewertet, zeigt sich für die im paarweisen Vergleich errechneten genetischen Distanzen außerdem, dass sich die beiden Jahrgänge einer jeden Population wesentlich mehr ähneln als im Vergleich zu den anderen Populationen. Insbesondere die Saar-Population weist mit einem Distanzmaß von 0,059 eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen den beiden Untersuchungsjahren auf (Tab. 23). Die wesentlich diverseren Donau-Stichproben zeigen ein mit 0,168 deutlich größeres Distanzmaß, aber auch hier sind – unabhängig vom betrachteten Untersuchungsjahr – die genetischen Distanzen zu den anderen Populationen Wesentlich größer. Die insgesamt für Mikrosatellitenanalysen hohen Distanzwerte von über 0,3 bekräftigen die Sonderstellungder Donau-Brassen.

Tab. 23:	Gene	etische I	Distanzen (Nei	1972) zwis	chen	den unte	rsuchte	en Brassen-Populatio	onen (	2009
	und	2010).	Distanzmaße	zwischen	den	Proben	einer	Probenahmefläche	sind	fett
	hervo	orgehob	en.							

	Güdingen 2009	Güdingen 2010	Hamburg 2009	Hamburg 2010	Jochenstein 2009	Jochenstein 2010
Güdingen 2009	-	0,059	0,144	0,186	0,355	0,470
Güdingen 2010		-	0,166	0,198	0,310	0,447
Hamburg 2009			-	0,087	0,240	0,382
Hamburg 2010				-	0,255	0,332
Jochenstein 2009					-	0,168
Jochenstein 2010						-

Der STRUCTURE-Plot aller untersuchten Brassen-Individuen verdeutlicht die zuvor erzielten Ergebnisse. Die beiden Jahrgänge einer Population weisen hohe Ähnlichkeit auf und lassen sich im Vergleich zu den zuvor dargestellten Einzelbetrachtungen 2009 und 2010 nun deutlicher von den anderen Populationen differenzieren (Abb. 3). Außerdem besteht zwischen den Saar- und den Elbe-Brassen eine größere Ähnlichkeit als im Vergleich zu den Donau-Tieren, was die korrekte Zuordnung einzelner Individuen innerhalb der beiden erstgenannten Populationen erschwert.



Abb. 3: STRUCTURE-Plot der drei untersuchten Brassen-Populationen über alle Loci (Jahre 2009 und 2010)

#### 3.1.2 Miesmuschel (*Mytilus* spp.)

#### 3.1.2.1 Untersuchungen 2009<sup>7</sup>

Im Rahmen der populationsgenetischen Analyse der Miesmuschel-Einzelindividuen wurden parallel zur Routine-Probenahme (BACKHAUS et al. 1993) im Juni 2009 von den drei Probenahmeflächen Sylt-Königshafen, Jadebusen/Eckwarderhörne und Darßer Ort jeweils 30 gesammelt und vor Ort eingefroren. Von den gefrorenen Individuen wurde im Labor der Fußmuskel mittels Skalpell herauspräpariert und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Von den zehn ausgewählten Primern konnte lediglich in fünf Fällen ein zufriedenstellendes Assay erstellt werden, so dass sich die nachfolgende Auswertung auf fünf Primer beschränken. Mit den Primern *Mgµ1*, *Mgµ4* sowie *MT279*, *MT282* und *MT288* konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

Wie aus Tab. 24 hervorgeht, konnten an den fünf genannten Loci zwei bis 20 Allele nachgewiesen werden. Dies kann damit begründet werden, dass zurzeit keine speziell für *M. edulis* entwickelten Mikrosatellitenprimer vorliegen und eine Vielzahl der verwendeten Primer schlechte Cross-Amplifikationen erbrachten. So wird aus Tab. 24 deutlich, dass die erfolgreich verwendeten Loci deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Aussageschärfe aufweisen. Während am Locus *Me15/16* lediglich zwei Allele detektiert wurden, weisen *Mgµ6* und *MT203* mit 15 bzw. 20 Allelen einen deutlich höheren Informationsgehalt auf. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass es sich bei dem Locus *Me15/16* um einen von INOUE et al. (1995) spezifisch für die Differenzierung von drei *Mytilus*-Schwesterarten entwickelten Marker handelt, der sich durch das Vorhandensein bzw. Fehlen eines artspezifischen DNA-Fragments definierter Länge auszeichnet. Er wurde im Rahmen dieser Untersuchung berücksichtigt, da im Falle eines Nachweises von Allelen der wärmeliebenden und in Ausbreitung begriffenen Schwesterart *M. galloprovincialis* ein Klimabezug hergestellt werden kann. Die Ergebnisse dieses speziellen Falles sind am Ende des Kapitels detaillierter beschrieben.

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
Me15/16	NED	2	168-180	180
Мдµ3	HEX	9	135-146	142
Mgµ5	FAM	9	124-140	134
Mgµ6	FAM	15	194-226	206
MT203	FAM	20	173-204	175

Tab. 24: Eckdaten der verwendeten Loci in der Miesmuschel-Individualanalyse 2009

Die populationsgenetischen Kenngrößen der analysierten Miesmuschel-Populationen belegen, dass sich die drei Populationen hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution nur in geringem Umfang

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Die Analysen 2010 brachten hinsichtlich der Auswertung der Primer *Mgµ5* und *MT203* zusätzliche Erkenntnisse. In beiden Fällen wurden die Daten auf einen Mononucleotidabstand umgescort. Die Auswertung der 2009er Daten wurde daraufhin angepasst und entspricht nicht mehr den Zwischenergebnissen aus 2009.

unterscheiden (Tab. 25). Die Allelzahlen und die *allelic richness* der drei Populationen weichen nur wenig voneinander ab, wenngleich anhand dieser Ergebnisse die Population des Sylter Königshafens als die genetisch variabelste anzusehen ist. Die deutlichen Abweichungen von  $H_o$  und  $H_e$  können als Anzeichen von Inzucht oder als Anzeichen für eine Strukturierung innerhalb der beprobten Populationen (Wahlund-Effekt) interpretiert werden. Signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lassen allerdings eher vermuten, dass Nullallele Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Diese Hypothese wurde mit dem Programm Mikro-Checker Version 2.2.3 überprüft. Es zeigt sich, dass insbesondere die Daten der vermeintlich hochvariablen Loci *Mgµ6* und *MT203* durch Nullallele beeinträchtigt sind.

Tab. 25: Durchschnittliche Stichprobengröße (*N*), Anzahl der Allele (*Na*), Anzahl effektiver Allele (*Ne*), allelic richness (*AR*), beobachtete Heterozygotie (*H*<sub>o</sub>) erwartete Heterozygotie (*H*<sub>e</sub>) und Fixierungsindex (F) der untersuchten Miesmuschel-Populationen über alle Loci (2009)

	N	Na	Ne	AR	Ho	H <sub>e</sub>	F
Jadebusen	26,6±0,6	8,60±2,46	4,55±1,32	8,52±5,42	0,429±0,130	0,620±0,162	0,294±0,121
Sylt	28,8±0,8	7,20±2,01	3,82±0,93	6,90±4,18	0,440±0,159	0,596±0,158	0,279±0,149
Darßer Ort	29,6±0,4	7,80±1,93	3,81±1,12	7,45±4,00	0,370±0,075	0,600±0,129	0,300±0,124

Tab. 26:Allelic richness der untersuchten Miesmuschel-Populationen, unterschieden nach Loci<br/>(2009)

	Jadebusen	Sylt	Darßer Ort	Gesamt
Me15/16	1,000	1,000	2,000	1,870
Мдµ3	7,000	4,962	6,677	6,565
Mgµ5	7,873	6,883	5,996	7,692
Mgµ6	10,998	11,307	12,325	12,471
MT203	15,729	10,329	7,451	13,061

Wie aus Tab. 26 hervorgeht, konnte am Locus  $Mg\mu 6$  die größte Diversität ermittelt werden. Hierbei ist jedoch zu bemerken, dass bei zumindest zwei Individuen (Sylt Ind.-Nr. 2009-08 und Darßer Ort Ind.-Nr. 2009-27) Muster nachgewiesen wurden, die Hinweise darauf geben, dass es sich um triploide Individuen handelt (Abb. 4). Durch Untersuchungen von BEAUMONT & FAIRBROTHER (1991) sowie BRAKE et al. (2004) ist bekannt, dass Tri- und Tetraploidie bei Miesmuscheln auftritt. Allerdings handelt es sich hierbei lediglich um unter Laborbedingungen induzierte Polyploidie, in Freilandpopulationen ist dieses Phänomen bisher nicht beschrieben. Vor dem Hintergrund der nachgewiesenen Induktion von Polyploidie durch Hitzeschockbehandlung (25°C) (BEAUMONT & KELLY 1989) wäre eine weiterführende Analyse zur Untersuchung des Auftretens von Triploidie am Locus  $Mg\mu 6$  insbesondere vor dem Hintergrund klimawandelbedingt erhöhter Wassertemperaturen interessant. Für die Analyse solcher Phänomene werden jedoch andere Methoden, z.B. Durchfluss-Zytometrie, empfohlen.



Abb. 4: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogrammes mit Primer *Mgµ*6 (Darßer Ort, Ind.-Nr. 2009-27). Es wurden drei DNA-Fragmente detektiert. Das Programm erkennt erwartungsgemäß nur zwei davon (blaue Punkte) (rot: Standard).

Die im paarweisen Vergleich errechneten genetischen Distanzen zeigen, dass vergleichsweise geringe genetische Differenzierungen zwischen den drei Populationen festgestellt wurden (Tab. 27). Die genetische Distanz zwischen den beiden Nordsee-Populationen ist mit 0,038 nur etwas geringer als die Maße beider Nordsee-Populationen zu der Ostsee-Population Darßer Ort. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund, dass es sich bei der Population Darßer Ort um eine Hybrid-Population aus *M. edulis* und *M. trossulus* handelt (siehe unten, QUACK unveröff.), verwunderlich. Das generelle Bild der genetischen Differenzierung der drei Populationen wird durch die errechneten  $F_{ST^{-}}$  Werte bestätigt (Tab. 28).

Tab. 27:Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Miesmuschel-Populationen<br/>(oberhalb der Diagonalen) und Nei's Genetische Identität der untersuchten Miesmuschel-<br/>Populationen (unterhalb der Diagonalen) (2009)

	Jadebusen	Sylt	Darßer Ort
Jadebusen	-	0,038	0,057
Sylt	0,963	-	0,052
Darßer Ort	0,945	0,949	-

#### Tab. 28: *F<sub>sT</sub>*-Werte der untersuchten Miesmuschel-Populationen (2009)

	Jadebusen	Sylt	Darßer Ort
Jadebusen	-	0,011	0,024
Sylt		-	0,023
Darßer Ort			-

Die geringe genetische Differenzierung der drei Populationen kann durch das seltene Auftreten privater Allele erklärt werden. Von den 55 vorhandenen Allelen waren insgesamt 41 in mindestens zwei der drei Populationen nachweisbar. In 14 Fällen handelt es sich um populationsspezifisch charakteristische Allele. Wie aus Tab. 29 hervorgeht, sind sechs davon der Population Jadebusen zuzuordnen, während sieben Allele als "Ostsee"-typisch angesehen werden können. Die Individuen der Sylter Population weisen lediglich ein privates Allel auf. Das fast vollständige Fehlen privater Allele

in dieser Population könnte erklären, warum diese auf natürlichen Muschelbänken wachsende und sehr große Population in der vorliegenden Untersuchung keine höheren Diversitätsmaße erreicht. Abschließend sei auch darauf hingewiesen, dass die nachgewiesenen privaten Allele überwiegend in äußerst geringer Frequenz auftreten.

Die Tatsache, dass sich die Ergebnisse der populationsgenetischen Analyse auf lediglich fünf Loci stützen und die Differenzierung zwischen den Populationen gering war, kann als ursächlich dafür angesehen werden, dass im Assignment-Test vergleichsweise schlechte Ergebnisse erzielt wurden. Wie aus Tab. 30 hervorgeht, ist am Darßer Ort mit 77% die beste Zuordnung gegeben. Über alle Individuen betrachtet werden etwa 72% der Tiere korrekt zugeordnet.

Frequenz Pop Locus Allel Pop Locus Allel Frequenz Jadebusen Mgµ5 140 0,018 Darßer Ort Me15/16 168 0,100 Jadebusen Mgµ6 212 0,096 Darßer Ort Mgµ3 0,018 136 Jadebusen MT203 173 0,038 Darßer Ort Mgµ3 146 0,018 Jadebusen MT203 178 0,019 Darßer Ort Mgµ6 226 0,018 Jadebusen MT203 198 0,019 Darßer Ort MT203 184 0,033 MT203 204 0,019 Darßer Ort 0,017 Jadebusen MT203 188 MT203 185 0,017 Darßer Ort MT203 0,033 Sylt 194

Tab. 29: Private Allele in den untersuchten Miesmuschel-Populationen (2009)

## Tab. 30:Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden<br/>Miesmuschel-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test)<br/>(2009)

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Jadebusen	65% (18)	35% (10)
Sylt	73% (22)	27% (8)
Darßer Ort	77% (23)	23% (7)
	72% (63)	28% (25)

Locus *Me15/16* birgt, wie zuvor bereits angedeutet, die Besonderheit, dass mit diesem Genabschnitt die drei Miesmuschel-Schwesterarten *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* und *M. trossulus* unterschieden werden können (INOUE et al. 1995). Dabei werden für jede Art sowie für die möglichen Hybride diagnostische Fragmente amplifiziert (Abb. 5). Vor dem Hintergrund des Auftretens der wärmeliebenden Mittelmeerart *M. galloprovincialis* im Bereich des holländischen und deutschen Wattenmeeres (LUTTIKHUIZEN et al. 2002, QUACK & KOSUCH 2005) steht damit ein Marker zur Verfügung, der, wie bereits in Kap. 2.1 beschrieben, einen Bezug von Allelveränderungen zum Klimawandel erlaubt. Ebenso könnte mit Hilfe dieses Markers eine eventuelle Verschiebung der Verbreitungsgebiete von *M. trossulus* und *M. edulis* nachgewiesen werden.
Entgegen der Ergebnisse von QUACK & KOSUCH (2005), die das *M. galloprovincialis*-Allel im Jadebusen nachweisen konnten, konnte im Rahmen der Analyse von jeweils 30 Individuen von Sylt-Königshafen und Jadebusen/Eckwarderhörne im Jahr 2009 kein Nachweis des *M. galloprovincialis*-Allels (128 bp) erbracht werden. Dementsprechend wurde auch kein Hinweis auf das Vorhandensein von *M. edulis* x *M. galloprovincialis*-Hybriden erzielt. Bei allen untersuchten Individuen der beiden Nordsee-PNF handelt es sich um reine *M. edulis*.



Abb. 5: Schematische Darstellung der artspezifischen Allele von *M. edulis, M. galloprovincialis, M. trossulus* und ihrer Hybride mit Hilfe des Locus *Me15/16* (nach INOUE et al. 1995)

Neben dieser Tatsache ergab das Screening der 30 Ostsee-Individuen der PNF Darßer Ort erwartungsgemäß eine Durchmischung von *M. edulis* und *M. trossulus*. 80% der untersuchten Individuen (n=24) waren als reine *M. edulis* anzusprechen, während es sich bei 20% (n=6) um Hybride von *M. edulis* und *M. trossulus* handelte. Reine *M. trossulus*-Individuen waren nicht anzutreffen.



Abb. 6: Beispielhafte Darstellung von Elektropherogrammen von Miesmuschel-Individualproben am Locus *Me15/16*, Jadebusen/Eckwarderhörne, Ind.-Nr. 2009-19 (oben), Sylt-Königshafen, Ind.-Nr. 2009-09 (Mitte), Darßer Ort, Ind.-Nr. 2009-19 (unten); Standard: rot markiert.

#### Fazit

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass zwar eine Charakterisierung der Allelzusammensetzung der ausgewählten Populationen erreicht werden konnte, dass diese aber im Vergleich zum Brassen schlechter ausfällt. Als ursächlich müssen hier die überraschend schlechten Cross-Amplifikationen der für die beiden Schwesterarten *M. trossulus* (GARDESTRÖM et al. 2008) und *M. galloprovincialis* (PRESA et al. 2002) entwickelten Mikrosatellitenprimer angesehen werden, von denen letztendlich nur fünf Loci für die Auswertung zur Verfügung standen. Bei diesen ist außerdem zu berücksichtigen, dass mit *Mgµ6* ein Verdacht auf Polyploidie ermittelt wurde, was die Auswertung der erzielten Muster wesentlich erschwert. Die verwendeten populationsgenetischen Auswerteverfahren sind nicht in der Lage, polyploide Daten zu verarbeiten. Aus den genannten Gründen sind die erzielten Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren.

Insgesamt konnten mit den fünf verwendeten Loci zwei bis 15 Allele detektiert werden. Damit konnte die Grundlage für die Beschreibung des Ist-Zustandes der Allelzusammensetzung der untersuchten Populationen gelegt werden. Detaillierte Informationen sind Anhang 4 zu entnehmen. Die Populationen unterscheiden sich auf Basis dieser Untersuchungen nur in geringem Maße hinsichtlich ihrer genetischen Diversität (Alleldiversität) und auch hinsichtlich ihrer genetischen Differenzierung. Die genetische Distanz zwischen den beiden Nordsee-Populationen ist geringer als zwischen den Populationen von Nord- und Ostsee. Die vorliegenden Daten eignen sich als Grundlage für zukünftige

Untersuchungen von Allelverschiebungen, etwa durch das Einwandern von *M. galloprovincialis* oder die Verdrängung von *M. trossulus* in der Ostsee.

#### 3.1.2.2 Untersuchungen 2010

Die Probenahmen für die populationsgenetische Analyse der Miesmuschel-Einzelindividuen erfolgten im Juni 2010. Pro Probenahmefläche wurden jeweils 30 Individuen gesammelt und vor Ort eingefroren. Von den gefrorenen Individuen wurde im Labor der Fußmuskel mittels Skalpell herauspräpariert und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Die populationsgenetischen Analysen erfolgten auf Basis der fünf im Vorjahr festgelegten Markersysteme.

Wie aus Tab. 31 hervorgeht, wurden an den fünf genannten Loci insgesamt 57 Allele nachgewiesen – damit zwei mehr als im Vorjahr. Während an den Loci *Me15/16* und *Mgµ6* die Vorjahresergebnisse bezüglich der Allelzahl und der Allelgröße exakt bestätigt wurden, wiesen die Loci *Mgµ3* und *Mgµ5* durch die Erweiterung der Stichprobengröße im Jahr 2010 drei bzw. zwei weitere Allele auf. Im Gegensatz dazu wurden am Locus *MT203* im Jahr 2010 drei Allele weniger detektiert. In allen Fällen handelt es sich um den Verlust oder das Hinzukommen seltener Allele. Hinsichtlich der Frequenz häufiger Allele wurden nahezu identische Ergebnisse erzielt (vgl. Anhang 4 und Anhang 5).

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
Me15/16	NED	2	168-180	180
Mgµ3	HEX	12	135-152	142
Mgµ5	FAM	11	122-142	134
Mgµ6	FAM	15	194-226	206
MT203	FAM	17	164-197	175

Tab. 31: Eckdaten der verwendeten Loci in der Miesmuschel-Individualanalyse 2010

Die populationsgenetischen Kenngrößen der analysierten Miesmuschel-Populationen belegen auch im Untersuchungsjahr 2010, dass sich die drei Populationen hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution nur in geringem Umfang unterscheiden (Tab. 32). Die *allelic richness* aller drei Populationen liegt auf Vorjahresniveau, wenngleich sich in diesem Jahr die Sylter Population als die genetisch diversere präsentiert (Tab. 33). Die im Vergleich zum Vorjahr etwas geringeren Abweichungen von  $H_o$  und  $H_e$  deuten ebenso wie der Fixierungsindex auf Inzucht hin. Letztlich sind aber auch hier die Daten der Loci *Mgµ6* und *MT203* durch Nullallele beeinträchtigt (Mikro-Checker Version 2.2.3), weswegen diese Werte nicht überinterpretiert werden dürfen. Wie bereits im Jahr 2009 wurden auch bei der Untersuchung 2010 in mindestens zwei Fällen triploide Muster am Locus *Mgµ6* nachgewiesen.

	N	Na	Ne	AR	Ho	H <sub>e</sub>	F
Jadebusen	30,0±0,0	8,20±2,40	4,44±1,32	8,16±5,32	0,500±0,130	0,603±0,164	0,139±0,098
Sylt	30,0±0,0	9,00±2,24	5,17±1,61	8,91±4,95	0,427±0,124	0,622±0,170	0,302±0,081
Darßer Ort	29,6±0,2	8,80±1,83	4,25±1,10	8,75±4,06	0,432±0,073	0,645±0,124	0,235±0,146

Tab. 32:Durchschnittliche Stichprobengröße (N), Anzahl der Allele (Na), Anzahl effektiver Allele (Ne),<br/>allelic richness (AR), beobachtete Heterozygotie (H<sub>o</sub>) erwartete Heterozygotie (H<sub>e</sub>) und<br/>Fixierungsindex (F) der untersuchten Miesmuschel-Populationen über alle Loci (2010)

Tab. 33:Allelic richness der untersuchten Miesmuschel-Populationen, unterschieden nach Loci<br/>(2010)

	Jadebusen	Sylt	Darßer Ort	Gesamt
Me15/16	1,000	1,000	2,000	1,938
МдμЗ	5,966	7,866	8,832	7,506
Mgµ5	6,999	9,933	10,000	9,378
Mgµ6	12,964	11,966	12,898	13,007
MT203	13,864	13,798	10,000	12,966

Die im paarweisen Vergleich errechneten genetischen Distanzen bestätigen das im Vorjahr erhaltene Bild: Zwischen den drei Populationen bestehen lediglich geringe genetische Differenzierungen. Die genetische Distanz zwischen den beiden Nordsee-Populationen ist mit 0,041 etwas geringer als die Maße beider Nordsee-Populationen zu der Ostsee-Population Darßer Ort. Die größte genetische Distanz besteht zwischen Jadebusen und Darßer Ort (Tab. 34). Das generelle Bild der genetischen Differenzierung der drei Populationen wird durch die errechneten  $F_{ST}$ -Werte bestätigt (Tab. 35).

Tab. 34:Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Miesmuschel-Populationen<br/>(oberhalb der Diagonalen) und Nei's Genetische Identität der untersuchten Miesmuschel-<br/>Populationen (unterhalb der Diagonalen) (2010)

	Jadebusen	Sylt	Darßer Ort
Jadebusen	-	0,041	0,062
Sylt	0,960	-	0,046
Darßer Ort	0,940	0,955	-

Tab. 35: *F<sub>ST</sub>*-Werte der untersuchten Miesmuschel-Populationen (2010)

	Jadebusen	Sylt	Darßer Ort
Jadebusen	-	0,011	0,025
Sylt		-	0,021
Darßer Ort			-

Die geringe genetische Differenzierung der drei Populationen kann erneut durch die vergleichsweise geringe Häufigkeit privater Allele erklärt werden. Von den 57 nachgewiesenen Allelen waren insgesamt 42 in mindestens zwei der drei Populationen nachweisbar, 15 weitere können als populationsspezifisch angesehen werden. Wie aus Tab. 36 hervorgeht, sind drei davon der Population Jadebusen zuzuordnen, was im Vergleich zum Vorjahr einem Verlust von drei charakteristischen Allelen gleichkommt. Im Vergleich dazu sind bei der Sylter Population drei und am Darßer Ort ein charakteristisches Allel hinzugekommen. In allen Fällen handelt es sich bei den privaten Allelen um sehr seltene Phänomene, wie aus den Frequenzdaten in Tab. 36 hervorgeht.

Aufgrund dessen, dass sich die populationsgenetische Analyse auf lediglich fünf Loci stützt und damit die verwendete Markerzahl beschränkt ist, sind im Assignment-Test allzu hohe Werte bei der Zuordnung von einzelnen Individuen zu den betrachteten Populationen nicht zu erwarten. Vor diesem Hintergrund werden dennoch überraschend hohe Zuordnungen erreicht (Tab. 37). Insgesamt werden 78% der Tiere korrekt zugeordnet. Dabei wird in Sylt ein im Vergleich zum Vorjahr identischer Wert erzielt, während die Individuen vom Jadebusen und vom Darßer Ort mit jeweils 80% deutlich besser zugeordnet werden als im Vorjahr (65% und 77%).

Рор	Locus	Allel	Frequenz		Рор	Locus	Allel	Frequenz
Jadebusen	Mgµ6	194	0,033		Darßer Ort	Me15/16	168	0,117
Jadebusen	MT203	171	0,033		Darßer Ort	МдµЗ	135	0,017
Jadebusen	MT203	197	0,017	_	Darßer Ort	МдµЗ	138	0,017
					Darßer Ort	Mgµ3	146	0,017
Sylt	Mgµ3	133	0,017		Darßer Ort	Mgµ3	152	0,033
Sylt	Mgµ3	149	0,033		Darßer Ort	Mgµ6	212	0,017
Sylt	Mgµ5	122	0,017		Darßer Ort	Mgµ6	226	0,033
Sylt	MT203	164	0,017		Darßer Ort	MT203	190	0,017

Tab. 36: Private Allele in den untersuchten Miesmuschel-Populationen (2010)

Tab. 37:Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden<br/>Miesmuschel-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test)<br/>(2010)

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Jadebusen	80% (24)	20% (6)
Sylt	73% (22)	27% (8)
Darßer Ort	80% (24)	20% (6)
	78% (70)	22% (20)

Wie zuvor bereits beschrieben, können mit Hilfe des Locus *Me15/16* die drei Miesmuschel-Schwesterarten *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* und *M. trossulus* unterschieden werden (INOUE et al. 1995). Auch im Jahr 2010 konnte das *M. galloprovincialis*-Allel (128 bp) weder in der Population Sylt-Königshafen noch in Jadebusen/Eckwarderhörne nachgewiesen werden. Alle untersuchten Individuen waren diesbezüglich eindeutig als reinrassige *M. edulis* (180 bp) zu klassifizieren. Im Gegensatz dazu erwies sich die Ostsee-Population Darßer Ort im Jahr 2009 als Hybridpopulation von *M. edulis* und *M. trossulus* (80% *M. edulis*, 20% *M. edulis* x *M. trossulus* -Hybride). Dieses Bild konnte durch die Wiederholung der Analyse 2010 bestätigt werden: 77% der untersuchten Individuen (n=23) waren als reine *M. edulis* anzusprechen, während es sich bei 23% (n=7) um *M. edulis* x *M. trossulus*-Hybride handelte. Reine *M. trossulus*-Individuen waren auch in diesem Jahr nicht anzutreffen.

## 3.1.2.3 Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010

Im Ergebnis beider Untersuchungen sind lediglich sehr geringe Unterschiede zwischen den Miesmuschel-Populationen festzustellen. Da mit der Ostsee-Population vom Darßer Ort nachweislich eine Hybridpopulation in die Untersuchung einbezogen wurde, lässt dies den Rückschluss zu, dass die verwendete Markerzahl auch in der Betrachtung beider Jahre als nicht ausreichend für eine differenziertere populationsgenetische Betrachtung angesehen werden muss.

Werden die beiden Datensätze der Jahre 2009 und 2010 zusammen statistisch ausgewertet, zeigen sich für die im paarweisen Vergleich errechneten genetischen Distanzen zumindest bei den Nordsee-Populationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Jahrgängen einer Population bzw. zwischen den Populationen (Tab. 38). Etwas höhere Distanzmaße bestehen zwischen den Nord- und Ostsee-Populationen. Diese wären aufgrund des unterschiedlichen Artstatus der beiden Probenreihen aber eigentlich in wesentlich höherem Maße zu erwarten gewesen. Dass dies trotz der durch die Wiederholung erhöhten Stichprobenzahl nicht der Fall ist, muss letztlich auf die eingeschränkte Markerzahl zurückgeführt werden.

Die wahrscheinlich methodisch bedingte fehlende genetische Differenzierung wird sehr gut durch den STRUCTURE-Plot zum Ausdruck gebracht, der aufgrund der hohen Ähnlichkeit in der Allelverteilung unabhängig von der anzunehmenden Anzahl an Populationen keine Differenzierung der Populationen zulässt (Abb. 7).

Tab. 38:	Genetische Distanzen (Nei 1	972) zwischen der	n untersuchten	<b>Miesmuschel-Pop</b>	ulationen
	(2009 und 2010). Distanzma	ße zwischen den I	Proben einer P	robenahmefläche	sind fett
	hervorgehoben.				

	Jadebusen 2009	Jadebusen 2010	Sylt 2009	Sylt 2010	Darßer Ort 2009	Darßer Ort 2010
Jadebusen 2009	-	0,044	0,038	0,063	0,057	0,059
Jadebusen 2010		-	0,041	0,041	0,046	0,062
Sylt 2009			-	0,041	0,052	0,032
Sylt 2010				-	0,063	0,046
Darßer Ort 2009					-	0,045
Darßer Ort 2010						-



Abb. 7: STRUCTURE-Plot der drei untersuchten Miesmuschel-Populationen über alle Loci (Jahre 2009 und 2010) (oben K=2, Mitte K=3, unten K=4, wobei K die anzunehmende Zahl von Populationen darstellt)

## 3.1.3 Aalmutter (Zoarces viviparus)

### 3.1.3.1 Entwicklung von Mikrosatellitenprimern

Wie in Kap. 2.3.2 beschrieben, lagen zu Projektbeginn noch keine Mikrosatelliten-Primer für Aalmutter vor. Von den 35 synthetisierten Primerpaaren wurden nach Vortests zehn ausgewählt und für die populationsgenetische Analyse verwendet. Die Auswahl der Primer stützte sich auf die Bewertung der Auswertbarkeit der PCR-Produkte im 2%igen Elektrophoresegel. Wesentliche Kriterien waren hierbei die Detektion distinkter und polymorpher DNA-Fragmente. Dabei wurden nicht reproduzierbare oder schwach ausgeprägte Amplifikationsprodukte (vgl. Primer *F06\_Zvi1* in Abb. 8) ausgeschlossen und lediglich starke Muster für die weitere Untersuchung weiterverwendet (vgl. Primer *H03\_Zvi1* in Abb. 8). Insgesamt wurden zehn Primer ausgewählt (Tab. 7, S. 13).



Abb. 8: Beispielhafte Darstellung eines Elektrophoresegels mit Primer *F06\_Zvi1* (links, lanes 1-3) und *H03\_Zvi1* (rechts, lanes 4-6).

#### 3.1.3.2 Untersuchungen 2009

Die Probenahmen von Aalmuttern konnten im Transekt Varel-Mellum und in der Meldorfer Bucht parallel zur Routine-Probenahme durchgeführt werden. Am Darßer Ort wurden wegen des Ausfalls der UPB-Routine-Probenahme 30 Aalmuttern im Juli (nach Abschluss des vorgegebenen Probenahmezeitraumes It. SOP, KLEIN et al. 2010b) gefangen. Die gewonnenen Tiere wurden unmittelbar nach dem Fang bzw. nach dem Eintreffen im Labor abgetötet und eingefroren. Als Probe wurde ein Stück Muskulatur verwendet.

Mit acht der zehn Markersysteme konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Die Marker *B12\_Zvi1* und *D10\_Zvi1* wurden aufgrund fehlender Polymorphie aus der weiteren Untersuchung herausgenommen.

An den acht untersuchten Loci konnten drei bis 18 Allele nachgewiesen werden (Tab. 39). Damit wurde eine sehr gute Grundlage für die populationsgenetische Charakterisierung der Aalmutter-Populationen gelegt. Mit Ausnahme des Locus *B10\_Zvi1*, an dem in zwei der drei Populationen signifikante Abweichungen (p<0.01 und p<0.05) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nachzuweisen waren, bestehen keine nennenswerten Abweichungen. Eine Beeinflussung der Datenlage durch Nullallele ist somit, abgesehen von diesem Locus, auszuschließen.

Die klassischen populationsgenetischen Kenngrößen zeigen, dass sich die drei Populationen durch eine hohe genetische Diversität auszeichnen (Tab. 40). Sowohl *Na*, *Ne* als auch der Wert der *allelic richness (AR)* weisen überdurchschnittlich hohe Werte auf. Die drei Populationen unterscheiden sich hinsichtlich dieser Werte nicht voneinander, wenngleich die Population der Meldorfer Bucht anhand dieser Daten als die genetisch variabelste charakterisiert werden kann. Wie aus Tab. 41 hervorgeht werden die Diversitätsmaße aller Populationen maßgeblich von den hoch informativen Loci *A01\_Zvi1*, *B08\_Zvi2*, *B10\_Zvi1* und *C01\_Zvi1* geprägt.

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
A01_Zvi1	HEX	17	210-270	240
B08_Zvi2	HEX	18	259-299	269
B10_Zvi1	FAM	18	394-432	400
C01_Zvi1	FAM	18	233-275	269
D01_Zvi1	HEX	5	342-356	342
E10_Zvi1	FAM	4	261-269	261
F03_Zvi2	FAM	11	333-357	351
H03_Zvi1	TAMRA	3	181-184	182

Tab. 39: Eckdaten der verwendeten Loci in der Aalmutter-Individualanalyse 2009

Der durchschnittliche und über alle drei Populationen annähernd identische  $H_e$ -Wert deutet an, dass die Allelverteilung und damit auch die relative Häufigkeit der Allele innerhalb der Populationen vergleichsweise einheitlich ist. Die geringen Abweichungen von  $H_o$  von  $H_e$ , lassen vermuten, dass zufällige Paarungen angenommen werden können und Unterstrukturierungen innerhalb der Populationen oder Inzucht auszuschließen sind. Dementsprechend werden minimale *F*-Werte errechnet. Das Maß der genetischen Fixierung ist lediglich in der Nordsee-Population von Varel-Mellum etwas höher.

Tab. 40:Durchschnittliche Stichprobengröße (N), Anzahl der Allele (Na), Anzahl effektiver Allele (Ne),<br/>allelic richness (AR), beobachtete Heterozygotie (H<sub>o</sub>) erwartete Heterozygotie (H<sub>e</sub>) und<br/>Fixierungsindex (F) der untersuchten Aalmutter-Populationen über alle Loci (2009)

	N	Na	Ne	AR	Ho	He	F
Varel-Mellum	30,0±0,0	9,25±1,93	4,85±1,00	9,17±5,40	0,617±0,093	0,658±0,100	0,050±0,031
Meldorfer Bucht	30,0±0,0	9,63±2,09	4,99±1,17	9,52±5,82	0,675±0,103	0,668±0,096	-0,007±0,029
Darßer Ort	29,9±0,1	8,38±1,80	4,68±0,96	8,33±5,07	0,657±0,095	0,671±0,095	0,007±0,044

Tab. 41:	Allelic richness der untersuchten Aalmutter-Populationen.	. unterschieden nach Loci	(2009)
	/ mono nonicolo don antono dententi natination i opalationoni		1-000

	Varel-Mellum	Meldorfer Bucht	Darßer Ort	Gesamt
A01_Zvi1	11,899	13,831	12,931	13,664
B08_Zvi2	15,832	17,799	11,866	15,692
B10_Zvi1	13,831	13,798	15,000	14,202
C01_Zvi1	12,833	12,865	8,866	12,971
D01_Zvi1	2,000	3,933	2,000	3,274
E10_Zvi1	3,999	4,000	4,000	3,995
F03_Zvi2	9,966	7,966	9,933	9,694
H03_Zvi1	2,967	2,000	2,000	2,322

Die im paarweisen Vergleich errechneten genetischen Distanzen zeigen, dass innerhalb der beiden Nordsee-Populationen von Varel-Mellum und Meldorfer Bucht eine größere genetische Ähnlichkeit besteht als zwischen beiden Nordsee-Populationen und der Ostsee-Population (Tab. 42). Die geringsten Übereinstimmungen bestehen zwischen Varel-Mellum und Darßer Ort. Damit wird angedeutet, dass zwischen den beiden Küstenbereichen eine genetische Unterstrukturierung besteht. Bestätigt wird dieses Muster durch die Analyse des  $F_{ST}$ -Wertes (Tab. 43). Die nachgewiesenen Differenzierungen liegen mit einem Maximalwert von 0,022 allerdings nur auf einem sehr niedrigen Niveau.

Tab. 42:Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Aalmutter-Populationen<br/>(oberhalb der Diagonalen) und Nei's Genetische Identität der untersuchten Aalmutter-<br/>Populationen (unterhalb der Diagonalen) (2009)

	Varel-Mellum	Meldorfer Bucht	Darßer Ort
Varel-Mellum	-	0,035	0,094
Meldorfer Bucht	0,966	-	0,073
Darßer Ort	0,910	0,930	-

#### Tab. 43: *F*<sub>ST</sub>-Werte der untersuchten Aalmutter-Populationen (2009)

	Varel-Mellum	Meldorfer Bucht	Darßer Ort
Varel-Mellum	-	0,009	0,022
Meldorfer Bucht		-	0,016
Darßer Ort			-

Tab. 44 zeigt, dass die untersuchten Populationen durch sieben, acht bzw. fünf private Allele charakterisiert werden können. Private Allele sind aufgrund ihres Auftretens in nur einer der untersuchten Population Indikatoren für die Eigenständigkeit einer Population und ein Maß für die Abgrenzung gegenüber anderen Populationen. Die insgesamt 20 privaten Allele deuten eine hohe genetische Diversität der Populationen an, wie sie bereits durch die populationsgenetischen Kenngrößen (Tab. 40) belegt werden konnte. Dass dennoch zwischen den Populationen lediglich geringe genetische Distanzen bestehen, ist auf die Gleichverteilung der Zahl privater Allele in den Populationen zurückzuführen. Auffällig ist, dass am Locus *C01\_Zvi1* insgesamt sieben private Allele nachzuweisen waren und diese ausschließlich in den beiden Nordsee-Populationen auftreten.

Der Assignment-Test (GenAlEx, V6.1) erlaubt für die Populationen Varel-Mellum und Darßer Ort eine relativ gute Zuordnung (Tab. 45). Im Vergleich dazu führt die Allelverteilung der schleswigholsteinischen Population von der Meldorfer Bucht zu einer intermediären Stellung, weswegen lediglich 80% der Tiere der korrekten Population zugeordnet werden können.

Рор	Locus	Allel	Frequenz	Рор	Locus	Allel	Frequenz
Varel-Mellum	A01	261	0,033	Meldorfer Bucht	C01	257	0,017
Varel-Mellum	A01	270	0,017	Meldorfer Bucht	C01	273	0,017
Varel-Mellum	C01	253	0,017	Meldorfer Bucht	C01	275	0,033
Varel-Mellum	C01	255	0,017	Meldorfer Bucht	D01	352	0,017
Varel-Mellum	C01	261	0,017	Meldorfer Bucht	D01	356	0,017
Varel-Mellum	C01	271	0,067	Darßer Ort	A01	225	0,017
Varel-Mellum	H03	184	0,017	Darßer Ort	B10	406	0,017
Meldorfer Bucht	A01	264	0,033	Darßer Ort	B10	426	0,017
Meldorfer Bucht	B08	259	0,017	Darßer Ort	D01	354	0,050
Meldorfer Bucht	B10	396	0,033	Darßer Ort	F03	333	0,050

 Tab. 44:
 Private Allele in den untersuchten Aalmutter-Populationen (2009)

 
 Tab. 45:
 Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden Aalmutter-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test) (2009)

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Varel-Mellum	90% (27)	10% (3)
Meldorfer Bucht	80% (24)	20% (6)
Darßer Ort	93% (28)	7% (2)
	88% (79)	12% (11)

#### Fazit

Im Rahmen dieser erstmalig durchgeführten populationsgenetischen Analyse von Aalmuttern konnten acht Markersysteme erfolgreich etabliert und der genetische *status quo* der untersuchten Populationen beschrieben werden. An diesen acht Loci konnten drei bis 18 Allele detektiert werden, was eine detaillierte Beschreibung der genetischen Konstitution der Populationen erlaubte. Detaillierte Informationen sind Anhang 6 zu entnehmen.

Die Analysedaten belegen eine hohe genetische Diversität in den drei Populationen. Die ermittelte genetische Distanz zwischen den beiden Nordsee-Populationen ist geringer als zwischen den Populationen von Nord- und Ostsee. Dies lässt trotz geringen Differenzierungsgrades vermuten, dass eine genetische Substrukturierung vorliegt. Das hohe Maß korrekter Zuordnung der Ostsee-Individuen zur Population Darßer Ort deutet ebenfalls auf eine genetische Differenzierung zwischen Nord- und Ostsee-Aalmuttern hin.

#### 3.1.3.3 Untersuchungen 2010

Im Jahr 2010 erfolgte die Gewinnung der Aalmuttern für die populationsgenetische Analyse parallel zu den Routine-Probenahmen im Mai/Juni. Pro Probenahmefläche wurden jeweils 30 Individuen gesammelt und vor Ort eingefroren. Die populationsgenetische Analyse erfolgte auf Basis der im Vorjahr festgelegten acht Markersysteme. Alle Loci konnten auch mit den 2010er Proben erfolgreich bearbeitet werden, es musste kein Locus aus der Analyse herausgenommen werden.

Wie aus Tab. 46 hervorgeht, konnten bei allen Markersystemen die im Vorjahr ermittelten Werte zu Allelzahl, Allelgröße und Größe des häufigsten Allels annähernd vollständig bestätigt werden. Die Vergrößerung der Stichprobe führte lediglich innerhalb der bestätigten *ranges* zu einem Plus weiterer Allele. Insgesamt wurden 17 Allele neu detektiert, während sieben Allele der 2009er Proben nicht mehr nachweisbar waren.

Hinsichtlich der Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zeigt sich der Locus *B08\_Zvi1* erneut als derjenige der in zwei der drei Populationen durch Nullallele beeinflusst ist (p<0,05). Bemerkenswert ist allerdings, dass im Jahr 2010 an der Probenahmefläche Meldorfer Bucht für die beiden Loci *C01\_Zvi1* und *E10\_Zvi1* sogar hochsignifikante (p<0,001) Abweichungen vom HWG nachgewiesen wurden, während dies im Vorjahr nicht der Fall war.

Hinsichtlich der wichtigsten populationsgenetischen Kenngrößen wurden im Vergleich zum Vorjahr weitestgehend identische Werte ermittelt, lediglich die Population der Meldorfer Bucht ist im Jahr 2010 durch eine etwas größere Allelvielfalt geprägt (Tab. 47).

Auf Basis der im paarweisen Vergleich errechneten genetischen Distanzen kann die im Vorjahr postulierte Annahme der genetischen Differenzierung von Nord- und Ostseepopulationen nicht mehr aufrecht erhalten werden (Tab. 49). Mit Werten von 0,045 bis 0,049 werden zwischen allen Populationen mittlere Distanzmaße errechnet, eine Unterstrukturierung ist im Jahr 2010 nicht mehr nachweisbar. Dies gilt auch für die  $F_{ST}$ -Werte, für die mit Werten von 0,010 bis 0,012 absolut einheitliche Werte nachgewiesen wurden (Tab. 50).

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
A01_Zvi1	HEX	17	210-264	240/252
B08_Zvi2	HEX	20	255-301	289
B10_Zvi1	FAM	19	394-432	400
C01_Zvi1	FAM	20	229-277	237
D01_Zvi1	HEX	4	342-356	342
E10_Zvi1	FAM	5	261-271	261
F03_Zvi2	FAM	14	327-359	343
H03_Zvi1	TAMRA	3	181-184	182

#### Tab. 46: Eckdaten der verwendeten Loci in der Aalmutter-Individualanalyse 2010

# Tab. 47:Durchschnittliche Stichprobengröße (N), Anzahl der Allele (Na), Anzahl effektiver Allele (Ne),<br/>allelic richness (AR), beobachtete Heterozygotie (H<sub>o</sub>) erwartete Heterozygotie (H<sub>e</sub>) und<br/>Fixierungsindex (F) der untersuchten Aalmutter-Populationen über alle Loci (2010)

	N	Na	Ne	AR	Ho	H <sub>e</sub>	F
Varel-Mellum	30,0±0,0	9, 50±1,95	4,89±1,04	9,50±5,50	0,646±0,102	0,665±0,096	0,064±0,046
Meldorfer Bucht	30,0±0,0	10,25±2,04	4,89±0,93	10,25±5,78	0,608±0,100	0,677±0,100	0,089±0,041
Darßer Ort	30,0±0,0	9,25±2,09	5,10±1,00	9,25±5,92	0,675±0,099	0,680±0,102	-0,014±0,056

Varel-Mellum **Meldorfer Bucht** Darßer Ort Gesamt A01\_Zvi1 12,0 14,0 14,0 14,302 B08 Zvi2 14.0 17,0 15.0 16,204 B10\_Zvi1 15,0 16,0 15,0 14,623 C01\_Zvi1 14,0 13,0 14,0 14,202 D01\_Zvi1 2,0 3,0 2,912 3,0 E10\_Zvi1 4,0 5,0 4,0 4,557 F03\_Zvi2 12,0 11,0 8,0 10,493 2,0 H03\_Zvi1 2,0 3,0 2,333

# Tab. 48: Allelic richness der untersuchten Aalmutter-Populationen, unterschieden nach Loci (2010)

# Tab. 49: Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Aalmutter-Populationen (oberhalb der Diagonalen) und Nei's Genetische Identität der untersuchten Aalmutter-Populationen (unterhalb der Diagonalen) (2010)

	Varel-Mellum	Meldorfer Bucht	Darßer Ort
Varel-Mellum	-	0,049	0,046
Meldorfer Bucht	0,952	-	0,045
Darßer Ort	0,955	0,956	-

Aus Tab. 51 geht hervor, dass im Jahr 2010 insgesamt 23 private Allele nachgewiesen wurden und damit drei mehr als im Vorjahr. Auffällig ist hierbei allerdings, dass lediglich drei private Allele des Jahres 2009 auch im Folgejahr bestätigt werden konnten (*A01\_Zvi1*-261 bp im Transekt Varel-Mellum, *B10\_Zvi1*-396 bp und *D01\_Zvi1*-356 bp in der Meldorfer Bucht), während es sich bei den übrigen 20 um neu hinzugekommene Allele handelt. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten Populationen eine hohe Alleldiversität aufweisen und in Folgeuntersuchungen eine Vielzahl seltener und unter Umständen privater Allele zu erwarten ist. Auch im Jahr 2010 ist die Population der Meldorfer Bucht durch die größte Anzahl an privaten Allelen charakterisiert.

	Varel-Mellum	Meldorfer Bucht	Darßer Ort
Varel-Mellum	-	0,012	0,011
Meldorfer Bucht		-	0,010
Darßer Ort			-

 Tab. 50:
 *F*<sub>ST</sub>-Werte der untersuchten Aalmutter-Populationen (2010)

#### Tab. 51: Private Allele in den untersuchten Aalmutter-Populationen (2010)

Рор	Locus	Allel	Frequenz	Рор	Locus	Allel	Frequenz
Varel-Mellum	A01	261	0,067	Meldorfer Bucht	C01	229	0,033
Varel-Mellum	B08	267	0,017	Meldorfer Bucht	C01	253	0,033
Varel-Mellum	B08	295	0,033	Meldorfer Bucht	D01	356	0,017
Varel-Mellum	B10	398	0,017	Meldorfer Bucht	E10	271	0,033
Varel-Mellum	C01	251	0,017	Meldorfer Bucht	F03	341	0,017
Varel-Mellum	F03	333	0,017	Meldorfer Bucht	F03	359	0,017
Varel-Mellum	F03	335	0,017	Meldorfer Bucht	H03	184	0,017
Meldorfer Bucht	B08	255	0,017	Darßer Ort	A01	213	0,017
Meldorfer Bucht	B08	281	0,033	Darßer Ort	C01	247	0,033
Meldorfer Bucht	B08	301	0,017	Darßer Ort	C01	249	0,017
Meldorfer Bucht	B10	396	0,017	Darßer Ort	C01	275	0,017
Meldorfer Bucht	B10	422	0,017				

Im Assignment-Test werden auch im Jahr 2010 die Ostsee-Individuen mit 93% vergleichsweise gut der korrekten Population zugeordnet (Tab. 52). Jeweils fünf falsche Zuordnungen führen für die beiden anderen Populationen zu mittleren Werten. Auf eine Darstellung des STRUCTURE-Plots wurde verzichtet.

Tab. 52:	Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden
	Aalmutter-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test) (2010)

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Varel-Mellum	83% (25)	17% (5)
Meldorfer Bucht	83% (25)	17% (5)
Darßer Ort	93% (28)	7% (2)
	87% (78)	13% (12)

### 3.1.3.4 Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010

Wie im Kap. 3.1.3.2 herausgestellt, zeichneten sich die Aalmutter-Populationen im Jahr 2009 durch eine hohe genetische Diversität und eine geringe genetische Differenzierung aus. Auf Basis der Ergebnisse im Jahr 2010 war hingegen keine Differenzierung zwischen Nord- und Ostseepopulationen möglich.

Bei gemeinsamer Auswertung der beiden Datensätze 2009 und 2010 wird im paarweisen Vergleich der genetischen Distanzen deutlich, dass in beiden Nordsee-Populationen die Distanzmaße zwischen den Jahrgängen kleiner sind als zwischen den Populationen (Tab. 53). Das heißt, die beiden Jahrgänge einer Population sind sich genetisch ähnlicher als die Populationen verschiedener Probenahmeflächen. Dies gilt allerdings nicht für die Ostsee-Probenahmefläche Darßer Ort, da hier mit einem Distanzwert von 0,043 ein Maß errechnet wird, dass sich nicht signifikant von den übrigen Werten unterscheidet.

Das generelle Fehlen genetischer Differenzierung der Populationen im Jahr 2010 kann durch die höhere genetische Diversität der Populationen erklärt werden. Dies ist letztlich auch die Ursache für das Fehlen einer populationsspezifischen Merkmalsausprägung im STRUCTURE-Plot (Abb. 9).

	Varel-Mellum 2009	Varel-Mellum 2010	Meldorfer Bucht 2009	Meldorfer Bucht 2010	Darßer Ort 2009	Darßer Ort 2010
Varel-Mellum 2009	-	0,034	0,035	0,049	0,094	0,070
Varel-Mellum 2010		-	0,043	0,049	0,081	0,046
Meldorfer Bucht 2009			-	0,036	0,073	0,047
Meldorfer Bucht 2010				-	0,086	0,045
Darßer Ort 2009					-	0,043
Darßer Ort 2010						-

Tab. 53:Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Aalmutter-Populationen (2009<br/>und 2010). Distanzmaße zwischen den Proben einer Probenahmefläche sind fett<br/>hervorgehoben.



Abb. 9: STRUCTURE-Plot der drei untersuchten Aalmutter-Populationen über alle Loci (Jahre 2009 und 2010) (oben K=2, Mitte K=3, unten K=4, wobei K die anzunehmende Zahl von Populationen darstellt)

#### 3.1.4 Regenwurm (*Lumbricus terrestris*)

#### 3.1.4.1 Untersuchungen 2009

Für die populationsgenetische Analyse der Regenwurm-Einzelindividuen wurden im Oktober 2009 von den drei Probenahmeflächen Halle/Würfelwiese, Leipzig-Gesamtgebiet und Saartal jeweils 30 Individuen gesammelt. Während alle 30 Tiere in Halle von der PNF Würfelwiese stammen, setzt sich die Probe aus Leipzig aus jeweils zehn Tieren der drei Probenahmeflächen Agrapark, Rosental und Schkeuditz zusammen. Ähnliches gilt für die Individuen aus dem Saartal. Da das jährliche UPB-Homogenat aus Tieren von fünf Probenahmeflächen besteht, wurden jeweils sieben Individuen pro Probenahmefläche verwendet, was letztlich zu einer Stichprobe von 35 Individuen führt. Die Regenwürmer wurden gemäß der Richtlinie zur UPB-Probenahme und -bearbeitung 120h zur Kotabgabe gehältert und anschließend durch Einfrieren abgetötet (QUACK et al 2003). Als Probe wurde jeweils ein ca. 5 mm großes Stück vom Kopfende des Wurmes verwendet.

Von den zehn ausgewählten Primern konnte lediglich in vier Fällen ein zufrieden stellendes und in drei weiteren ein sehr lückenhaftes Assay erstellt werden, obwohl alle vorliegenden Proben mehrfach mit den Primern, für die eine Annealing-Temperatur ermittelbar war, analysiert wurden. Diese schlechte Performance ist umso überraschender, da die von VELAVAN et al. (2007) entwickelten Primer spezifisch für *L. terrestris* entwickelt wurden. Außerdem stammen die für die Primer-Entwicklung

genutzten Individuen aus einer einheimischen Population, was die Problemfindung zusätzlich erschwert. Die ermittelten DNA-Gehalte lagen durchschnittlich bei 3,33±1,39 ng/ml und sind somit als Ursache schlechter Amplifikationsergebnisse auszuschließen. Da keine weiteren Mikrosatelliten-Primer zu *L. terrestris* vorliegen und die für *L. rubellus* entwickelten Mikrosatelliten-Primer nachweislich keine Cross-Amplifikation zeigten (HARPER et al. 2006), erfolgt die Auswertung der populationsgenetischen Analyse der Regenwurm-Populationen auf Basis von vier Loci.

Wie aus Tab. 54 hervorgeht, erwiesen sich alle verwendeten Loci als polymorph. Für die vier Loci wurden zwischen 13 und 28 Allele nachgewiesen, was trotz der geringen Loci-Zahl eine gute Grundlage für die populationsgenetische Charakterisierung darstellt. Allerdings muss auch hier darauf hingewiesen werden, dass die verwendeten Loci teilweise signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen, was eventuell durch Nullallele begründet werden kann.

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
LTM128	NED	17	150-258	172
LTM163	FAM	28	137-209	145
LTM165	HEX	13	160-228	228
LTM193	FAM	14	259-307	271

Tab. 54: Eckdaten der verwendeten Loci in der Regenwurm-Individualanalyse 2009

Betrachtet man die über alle Primer ermittelten populationsgenetischen Kenngrößen, so wird deutlich, dass sich die drei Populationen hinsichtlich ihrer genetischen Konstitution zum Teil deutlich unterscheiden (Tab. 55). Sowohl die Allelzahl als auch die allelic richness zeichnet die Population des saarländischen Verdichtungsraumes im Vergleich zu den beiden ostdeutschen Populationen als genetisch variabler aus. Dieses Ergebnis ist über alle betrachteten Loci identisch (Tab. 56). Die Abweichungen von beobachteter und erwarteter Heterozygotie  $(H_o/H_e)$  belegen ebenso wie der Fixierungsindex, dass es in allen drei Populationen deutliche Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht gibt. Hierfür können verschiedene Erklärungen herangezogen werden. Neben Inzuchteffekten ist auch eine Substrukturierung der Populationen in Erwägung zu ziehen. Dies ist angesichts der Probenahme auf unterschiedlichen Flächen durchaus zu erwarten. Zudem können auch hier Nullallele eine Rolle spielen. Vor dem Hintergrund der Kleinräumlichkeit der jeweiligen Entnahmestellen wären Inzuchteffekte in Leipzig und im Saartal sicherlich zu vermuten. Basierend auf dem Probenahme-Design ist ein Wahlund-Effekt für die Tiere aus diesen beiden Populationen ebenfalls plausibel. Dass der F-Wert der Halle-Population signifikant niedriger ist, ist jedoch nicht mit einem Wahlund-Effekt zu erklären, da die Tiere alle von einer großen Entnahmestelle (Würfelwiese) stammen.

Tab. 55:	Durchschnittliche Stichprobengröße (N), Anzahl der Allele (Na), Anzahl effektiver Allele (Ne),
	allelic richness (AR), beobachtete Heterozygotie ( $H_o$ ) erwartete Heterozygotie ( $He$ ) und
	Fixierungsindex (F) der untersuchten Regenwurm-Populationen über alle Loci (2009)

	N	Na	Ne	AR	Ho	H <sub>e</sub>	F
Halle	23,5±3,9	7,50±0,65	4,21±0,68	6,50±0,92	0,490±0,0922	0,743±0,040	0,327±0,139
Leipzig	24,8±3,3	7,25±0,63	4,16±0,45	6,27±0,69	0,348±0,112	0,749±0,034	0,527±0,152
Saartal	27,0±2,4	13,75±2,18	6,58±1,17	9,63±1,42	0,472±0,125	0,827±0,041	0,432±0,136

	Halle	Leipzig	Saartal	Gesamt
LTM128	5,703	5,496	9,697	10,018
LTM163	7,796	6,986	11,593	11,901
LTM165	6,503	5,907	8,837	8,726
LTM193	6,000	6,697	8,394	8,958

 Tab. 56:
 Allelic richness der untersuchten Regenwurm-Populationen, unterschieden nach Loci (2009)

Die auf Basis der ermittelten Allelfrequenzen ermittelten Distanzmaße zeigen eine vergleichsweise geringe genetische Distanz zwischen den Populationen von Halle und Leipzig, während sich beide Populationen in deutlichem Maß von den saarländischen Regenwürmern differenzieren lassen (Tab. 57). Die für Mikrosatellitenanalysen sehr hohen Distanzmaße sind insbesondere auch auf die Anzahl privater Allele der Regenwürmer des saarländischen Verdichtungsraumes zurückzuführen. Während die Populationen von Halle und Leipzig durch das Vorhandensein von vier bzw. zwei privaten Allelen charakterisiert werden können, zeichnet sich die saarländische Population durch 36 private Allele aus. 17 davon wurden alleine am Locus *LTM163* nachgewiesen. Die insbesondere an diesem Locus ermittelten Muster zeigen, dass große Unterschiede in der genetischen Ausstattung der untersuchten Populationen bestehen (siehe auch Anhang 3). Diese Unterschiede in den Allelfrequenzen der drei Populationen führen letztlich dazu, dass bei einer Untersuchung der prozentualen Anteile der molekularen Varianz (AMOVA) die bestehenden Differenzierungen zu 25% mit Unterschieden zwischen den Populationen erklärt werden (Abb. 10). Dieser Wert ist für Mikrosatelliten-Analysen ungewöhnlich hoch, da üblicherweise eine große Variabilität innerhalb der Individuen und innerhalb der Populationen gefunden werden kann.

Tab. 57:	Genetische Distanzen (Nei 1972) zwischen den untersuchten Regenwurm-Populationen
	(oberhalb der Diagonalen) und Nei's Genetische Identität der untersuchten Regenwurm-
	Populationen (unterhalb der Diagonalen) (2009)

	Halle	Leipzig	Saartal
Halle	-	0,212	1,945
Leipzig	0,809	-	1,743
Saartal	0,143	0,175	-



#### Tab. 58: F<sub>ST</sub>-Werte der untersuchten Regenwurm-Populationen (2009)

Abb. 10: Verteilung der erklärten Gesamtvarianz in der Regenwurm-Analyse über alle Loci (2009)

Der Assignment-Test (GenAlEx, V6.1) belegt in diesem Zusammenhang die genetische Eigenständigkeit der saarländischen Population im Vergleich zu den beiden ostdeutschen Populationen. Demnach können 90% der Saartal-Regenwürmer korrekt dieser Population zugeordnet werden (Tab. 59). Mit 66% und 75% liegt die Zuordnung bei den anderen beiden Populationen in einem ebenfalls guten Bereich, wenn man berücksichtigt, dass die Auswertung der Ergebnisse auf nur vier Loci basiert. Eine Berücksichtigung von ein oder zwei weiteren Loci könnte allerdings sicherlich die Effizienz der Analyse der genetischen Konstitution der untersuchten Populationen erhöhen.

Der auf Basis dieser Datenlage mit Hilfe des Programmes STRUCTURE (V2.3.3) durchgeführte Assignment-Test zeigt, dass sich die beiden ostdeutschen Population vergleichsweise einheitlich präsentieren und deutlich von der saarländischen Population unterscheiden lassen (Abb. 11). Die saarländische Population zeigt im Vergleich dazu eine deutliche Zweiteilung, wobei die kennzeichnenden Merkmale der beiden anderen Populationen fast vollständig zurückgedrängt sind. Die überwiegende Mehrheit der saarländischen Regenwürmer zeigt eine komplett andere genetische Struktur. Bemerkenswert ist hierbei, dass die genetische Unterstrukturierung der saarländischen Population auf die jeweiligen Entnahmestellen zurückgeführt werden kann (vgl. Kap. 4.1).

#### Tab. 59: Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden Regenwurm-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test) (2009)

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Halle	75% (21)	25% (7)
Leipzig	66% (19)	34% (10)
Saartal	90% (28)	10% (3)
	77% (68)	23% (20)



Abb. 11: STRUCTURE-Plot der drei untersuchten Regenwurm-Populationen über alle Loci (2009)

#### Fazit

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass trotz einer vergleichsweise geringen Markerzahl eine gute Datenlage zur Charakterisierung des Ist-Zustandes der Allelzusammensetzung der ausgewählten Populationen geschaffen werden konnte. An den vier verwendeten Loci konnten insgesamt 13-28 Allele detektiert werden, die detaillierte Aussagen über die genetische Konstitution der Populationen erlauben. Wie auch bereits beim Brassen wird die gute Aussagekraft der Marker durch die überwiegend korrekte Zuordnung der Individuen zu den entsprechenden Populationen im Assignment-Test bestätigt.

Die Daten belegen, dass die auf fünf Entnahmestellen gesammelte "Population" saarländischer Regenwürmer im Vergleich zu den beiden anderen Populationen als genetisch deutlich variabler charakterisiert werden kann. Zurückgeführt wird dies auf das Vorhandensein zahlreicher privater Allele, was auch als Ursache für die deutliche Differenzierung der Saartal-Population anzusehen ist. Bemerkenswert ist, dass zwischen den einzelnen Entnahmestellen des saarländischen Verdichtungsraumes eine deutliche genetische Strukturierung besteht, während zwischen den Populationen von Halle und Leipzig keine nennenswerte genetische Differenzierung festgestellt werden konnte.

#### 3.1.4.2 Untersuchungen 2010

Wie in Kap. 3.1.4.1 erläutert, ist auf Basis der vier verwendeten Markersysteme lediglich eine beschränkte Aussage möglich. Dies gilt insbesondere für die wesentlich komplexeren Muster, die bei der Analyse von Homogenatproben erzielt werden. Dieser Problematik kann nur mit einer größeren Markerzahl entgegengewirkt werden. Da mit den Mikrosatellitenprimern von der Schwesterart *L.* 

*rubellus* nachweislich keine Cross-Amplifikationen erzielt werden konnten (HARPER et al. 2006) und für andere, nah verwandte Arten keine Mikrosatellitenprimer vorliegen, wurden in Optimierungsversuchen die kürzlich für *Aporrectodea longa* entwickelte Primer in die Untersuchung einbezogen. Die Analysen zu *L. terrestris* sollten jedoch nur dann fortgesetzt werden, wenn die Versuche zu einer wesentlichen Verbesserung der Datenlage führen.

Die Entwicklung von Mikrosatellitenprimern für *Aporrectodes longa* erfolgte durch die Universität Trier, Fächer Biogeographie und Bodenkunde in Kooperation mit der Firma GENterprise GmbH, Mainz.

Als Ergebnis der Entwicklungsarbeit wurden 42 Primerpaare entworfen und synthetisiert. Aufgrund von Replikationsproblemen wurden hiervon nur 34 PCR-Produkte sequenziert, wobei fünf weitere Primerpaare aufgrund unsauberer PCR-Produkte aussortiert wurden. Von den verbliebenen 29 Paaren waren 13 heterozygot und/oder variabel im Vergleich zur Plasmidsequenz. Nach den Vortests von STRUNK (mündl. Mitt.) standen schließlich 14 Primerpaare zur Verfügung, dievon der Arbeitsgruppe Biogeographie auf ihre Eignung für die populationsgenetische Analyse von L. terrestris getestet wurden. Die Auswahl der Primer stütze sich auch hier auf die Bewertung der Auswertbarkeit der PCR-Produkte im 2%igen Elektrophoresegel. Wesentliche Kriterien waren die Detektion distinkter und polymorpher DNA-Fragmente. Bei insgesamt acht Primern war entweder keine Amplifikation oder keine Polymorphie nachweisbar bzw. keine Reproduzierbarkeit der erhaltenen Muster möglich, weswegen diese von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen wurden. Abb. 12 zeigt beispielsweise eine Vielzahl von PCR-Produkten, die sich störend auf die Auswertung der tatsächlichen Mikrosatelliten auswirken kann. Aus diesem Grund wurde die Verwendung des Primers B0109 als nicht zielführend erachtet. Die auf dem MEGABACE 1000-Sequenzierer durchgeführten Fragmentlängenanalysen beschränkten sich demnach letztlich auf sechs Primer, die auf Basis der Elektrophoresegele als geeignet eingeschätzt wurden. Von diesen konnten allerdings mit den Primer B0109, C0642, F0212, H0906 und H0716 keine reproduzierbaren Elektropherogramme erzielt werden. Letztlich zeigte sich der Primer A1028 als der einzig verwendbare von den für die Tests ausgewählten Primern (Abb. 13). Die Verbesserung der Datenlage hätte dadurch lediglich in der Erhöhung der Markerzahl von vier auf fünf sowie durch das Hinzukommen von zwei weiteren Allelen bestanden. Aufgrund dieses geringen Erfolgs wurden die Arbeiten zu Regenwurm nicht fortgeführt.



Abb. 12: Beispielhafte Darstellung eines Gradienten-PCR-Elektrophoresegels mit Primer B0109 (Ind. Leipzig 2009-01)



Abb. 13: Beispielhafte Darstellung von Elektropherogrammen ausgewählter Individuen der PNF Leipzig (2009) mit dem Primer A1028

#### 3.1.4.3 Gemeinsames Fazit der Untersuchungen 2009 und 2010

Da eine Cross-Amplifikation von *Aporrectodea*-Primern mit *L. terrestris*-Proben nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden die Untersuchungen zu dieser Probenart nicht weitergeführt. Aufgrund der Erfahrungen aus der Entwicklungsarbeit und denen von HARPER et al. (2006) muss geschlussfolgert werden, dass das Genom von *L. terrestris* im Gegensatz zu vielen anderen Tierarten offensichtlich weniger empfänglich für Cross-Amplifikationen ist. Vor dem Hintergrund, dass auch die von VELAVAN et al. (2007) spezifisch für *L. terrestris* entwickelten Primer in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls vergleichsweise schlecht amplifizierten, sollten weitere Studien an dieser Probenart ohne die Entwicklung eines art- und regionalspezifischen Primersets zukünftig nicht durchgeführt werden.

Dennoch kann aus den im Jahr 2009 erzielten Ergebnissen eine erste genetische Charakterisierung der untersuchten Populationen abgeleitet werden: Es besteht zum einen eine klare Ost-West-Differenzierung, zum anderen eine Unterstrukturierung der Saartal-Populationen. Um diese Strukturen (vergleichsweise einheitliche "Ost"-Population gegenüber einer stark strukturierten und genetisch variableren Saartal-Populationen) erklären zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen, die sich sowohl auf eine größere Anzahl von Individuen und Populationen als auch auf eine größere Anzahl von Markern stützen, notwendig.

# 3.2 Retrospektiver Ansatz

Die Untersuchungen zum retrospektiven genetischen Monitoring wurden an Probenarten und Probenahmeflächen entsprechend der Übersicht in Tab. 2 durchgeführt. Von allen 185 Homogenatproben wurde unter Cryo- und Reinluftbedingungen jeweils eine Teilprobe von ca. 0,5 g entnommen. Der Rest des Homogenates wurden unmittelbar nach der Entnahme der Teilprobe entsprechend gekennzeichnet und über LIN im Zwischenlager an der Universität Trier eingelagert. Damit stehen diese Proben für weitere genetische Untersuchungen zur Verfügung, sollten jedoch aufgrund des oberflächlichen Antauens der Probe nicht für retrospektive Stoffanalytik verwendet werden.

## 3.2.1 Brassen (Abramis brama)

Für die Analyse der Brassenhomogenate wurden jeweils 16 Jahreshomogenate der beiden Probenahmeflächen Hamburg-Blankenese/Elbe und Güdingen/Saar sowie die bisherigen sieben Homogenate der Probenahmefläche Jochenstein/Donau (2002 bis 2008) molekulargenetisch analysiert. Dabei wurden dieselben neun Mikrosatellitenloci gescreent, die auch in der Individualanalyse verwendet wurden. Mit acht der verwendeten neun Primer konnten auch bei den Homogenaten erfolgreich Amplifikationsmuster erzeugt werden. Der Marker *CypG27* musste wegen fehlender Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus der Auswertung genommen werden. Dies gilt auch für das Homogenat "Jochenstein 2008", dessen Muster bei insgesamt vier Loci Teilausfälle aufwiesen. Da auch bei einer Wiederholung der DNA-Isolation der Mangel an Reproduzierbarkeit nicht beseitigt werden konnte, wurde diese Probe von der Auswertung ausgeschlossen. Auf Basis der 38 zur Verfügung stehenden Homogenatproben wurden an den acht in Tab. 60 dargestellten Loci insgesamt 2-31 Allele nachgewiesen (vgl. auch Anhang 4). Wie aus Anhang 4 hervorgeht, waren 11 der insgesamt 99 Allele in allen Homogenatproben nachweisbar, während rund ein Fünftel der Allele (20 Allele) in nur äußerst geringer Frequenz auftraten (<10%).

Hinsichtlich der Unterschiede der Allelzusammensetzung der einzelnen Populationen über die Zeitachse kann aus Anhang 9 abgelesen werden, dass im betrachteten Zeitraum an keinem Locus eine gerichtete Entwicklung hinsichtlich des Ausfallens bzw. Hinzukommens eines bestimmten Allels beobachtet werden konnte. Die hochfrequent auftretenden Allele zeichneten sich durch eine große Konstanz über alle Jahre aus, während andere, insbesondere die seltenen Allele lediglich sporadisch auftraten. Aufgrund des Fehlens einheitlicher, Locus-übergreifender Muster werden die betrachteten Loci nicht getrennt voneinander, sondern gemeinsam statistisch ausgewertet. Auf Basis des

Vorhandenseins oder Fehlens eines Allels wurde eine 0/1-Matrix erstellt, die die Grundlage des nachfolgend beschriebenen Ähnlichkeitsindexes ist.

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
Ca1	NED	11	98-122	102
CypG24	HEX	13	166-196	184/188
CypG30	NED	31	155-243	211/219
Lid1	NED	14	242-268	252/254
Lid8	HEX	7	113-133	127
RhCa20	FAM	2	104-106	104
Rru3	HEX	5	157-167	165
Z21908	FAM	16	136-188	146

Tab. 60: Eckdaten der verwendeten Loci in der Brassen-Homogenatanalyse

Aus Tab. 61 geht hervor, dass die Homogenatproben der Probenahmefläche Güdingen über alle betrachteten Jahre die größte genetische Ähnlichkeit aufweisen. Die Homogenate aus Hamburg und Jochenstein sind im Vergleich dazu genetisch etwas variabler, was unter anderem auch durch die höheren Standardabweichungen zum Ausdruck gebracht wird. Im paarweisen Vergleich der Homogenate verschiedener Probenahmeflächen zeigt sich, dass die Homogenate unterschiedlicher Probenahmeflächen geringere Ähnlichkeiten zueinander haben als innerhalb derselben Fläche. Größte Übereinstimmungen bestehen zwischen den Homogenatproben von Güdingen und Hamburg, während die geringsten Ähnlichkeitsmaße zwischen Hamburg und Jochenstein ermittelt wurden. Im Wesentlichen wird hiermit das Ergebnis der populationsgenetischen Analyse der Individualproben bestätigt, worin deutlich wurde, dass sich die genetisch variablere Population Jochenstein von den beiden anderen Populationen stärker differenzieren lässt als diese beiden untereinander. An dieser Stelle muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die höhere Standardabweichung bei den Jochensteiner Homogenaten auch auf die geringere Stichprobe (n=6) zurückzuführen ist.

Tab. 61:	Ähnlichkeitsindex	(SM) der	Brassen-Jahreshor	nogenate a	uf Basis	der	0/1-Matrix	zur
	Allelverteilung ir	n Brassen	-Homogenatproben	innerhalb	(fett) ι	Ind	zwischen	den
	Probenahmefläche	en						

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	0,829±0,057	0,744±0,035	0,660±0,043
Hamburg		0,785±0,068	0,642±0,046
Jochenstein			0,792±0,102

Nutzt man die im paarweisen Vergleich aller Homogenate ermittelten Ähnlichkeitsmaße als Grundlage für eine Clusteranalyse, werden im Dendrogramm die Homogenate der PNF Jochenstein separat

geclustert und der übrigen Gruppe der Homogenate entgegengestellt (Abb. 14). Die Güdinger Homogenatproben werden ebenfalls zusammengruppiert. Dabei werden jedoch zwei Proben aus Hamburg (Jahrgänge 1998 und 2008) einsortiert, während die restlichen Hamburger Homogenate eine dritte Untergruppe bilden. Eine statistisch absicherbare weitere Differenzierung der Proben liegt nicht vor. Vor dem Hintergrund der Analyse von Veränderungen in der Allelzusammensetzung über die Zeit bleibt festzuhalten, dass – mit Ausnahme von Jochenstein – nahe beieinander liegende oder aufeinander folgende Jahrgänge nicht zusammengruppiert werden und somit keine höhere Ähnlichkeit zwischen diesen und anderen Jahrgängen besteht. Eine gerichtete Entwicklung der Allelzusammensetzung ist auch unter gemeinsamer Berücksichtigung aller Loci nicht nachweisbar. Dies ist zumindest für die beiden Probenahmeflächen Güdingen und Hamburg zu konstatieren, da in Jochenstein nur sechs Homogenatproben untersucht werden konnten.

Ergänzend zu dieser auf der Ähnlichkeit der 0/1-Matrizes basierenden Auswertung wurden die zur Verfügung stehende Datengrundlage in das populationsgenetische Auswerteprogramm ARLEQUIN (Version 3.5.1.2) (Excoffier et al. 2009) eingelesen und als RFLP-Datensatz analysiert. Auf dieser Basis ist die Analyse zusätzlicher populationsgenetischer Parameter wie Theta-Pi und den bereits in der Individualanalyse errechneten  $F_{ST}$ -Wert sowie die Darstellung von *minimum spanning trees* möglich. Mit Theta-Pi-Wert liegt ein weiteres genetisches Diversitätsmaß vor, das auch auf Basis der Homogenate belegt, dass es sich bei den Jochensteiner Brassen um die genetisch variabelste Population zu handeln scheint (Tab. 62). Die Diversität der Güdinger Homogenate ist im Vergleich zu den beiden anderen Zeitreihen geringer, womit die Analyse der Homogenate die Ergebnisse der Individualanalyse widerspiegelt.

Tab. 62:	Theta-Pi-Werte der Brassen-Jahreshomogenate nach ARLEQUIN (V3.5.1.2), unterschieden
	nach Probenahmeflächen

Güdingen	Hamburg	Jochenstein	Gesamt
19,1±10,0	24,1±12,5	26,2±15,5	23,2±12,7

Mit dem bereits vorgestellten und in diesem Fall mittels ARLEQUIN (V3.5.1.2) berechneten  $F_{ST}$ -Wert besteht auch für die Homogenatproben eine Möglichkeit, zwischen den Probenahmeflächen ein genetisches Distanzmaß zu errechnen. Auch hier spiegeln die Ergebnisse der Homogenatanalyse im Wesentlichen die der Individualanalyse wieder: Zwischen den Homogenaten der PNF Güdingen und Hamburg sind die geringsten Differenzierungen nachzuweisen, während beide Populationen deutlich von der Donau-Population aus Jochenstein separiert sind (Tab. 63).

Tab. 63:	F <sub>ST</sub> -Werte der Brassen-Jahreshomogenate nach ARLEQUIN (V3.5.1.2), unterschieden nach
	Probenahmeflächen

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	-	0,195	0,390
Hamburg		-	0,337
Jochenstein			-



Abb. 14: Dendrogramm (Linkage zwischen den Gruppen, Quadrierte Euklidische Distanz) von Brassen-Homogenatproben, basierend auf der Ähnlichkeit (SM) im paarweisen Vergleich (AHH = Hamburg, AGH = Güdingen, AJH = Jochenstein; die angehängte Zahl ergibt das Jahr, die separate Zahl ist die Fallzahl und ist zu vernachlässigen)

Der *minimum spanning tree* (Abb. 15) zeigt eine noch etwas bessere Auflösung als das Dendrogramm (Abb. 14). Hierbei ist darauf zu achten, dass der Baum nicht gewurzelt ist. Alle Hamburger Proben liegen somit auf einem Ast. Lediglich die Probe Güdingen 2007 (Güd2007) wird einem anderen Cluster (Jochenstein) zugeordnet.



Abb. 15: Unrooted "minimum spanning tree" von Brassen-Homogenatproben, basierend auf den Rohdaten, nach ARLEQUIN (V3.5.1.2),

## 3.2.2 Miesmuschel (*Mytilus spp.*)

Für die Homogenatanalyse wurden 21 Jahreshomogenate der PNF Jadebusen/Eckwarderhörne, 20 Homogenate von Sylt/Königshafen und 16 Homogenate der Ostsee-PNF Darßer Ort molekulargenetisch analysiert. Dabei wurden dieselben fünf Mikrosatellitenloci gescreent, die auch in der Individualanalyse verwendet wurden. Mit vier der verwendeten fünf Primer konnten auch bei den Homogenaten erfolgreich Amplifikationsmuster erzeugt werden. Der Marker MT203 musste aus der Auswertung genommen werden, da mit ihm bei fünf Proben vom Jadebusen kein reproduzierbares Elektropherogramm erzielt werden konnte. Bei Nutzung dieses Markers hätten die entsprechenden Homogenatproben aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen. Da es sich jedoch um die vier ältesten Homogenate von dieser PNF handelt, hätte dies die zur Verfügung stehende Zeitreihe wesentlich verkürzt. Aus diesem Grund wurde auf die Berücksichtigung des Markers MT203 verzichtet. Auch das Homogenat "Darßer Ort 1994" wurde von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, da an dem bereits in Kap. 3.1.2 erwähnten Locus Mgµ6 Teilausfälle bemerkt wurden, die nicht behoben werden konnten. Auf Basis der 56 zur Verfügung stehenden Homogenatproben wurden an den vier in Tab. 64 dargestellten Loci 2-18 Allele nachgewiesen (vgl. auch Anhang 5). Wie aus Anhang 5 hervorgeht, waren sieben der insgesamt 30 Allele (23%) in allen Homogenatproben nachweisbar, während acht Allele (27%) in nur äußerst geringer Frequenz auftraten (<10%).

Hinsichtlich der Unterschiede der Allelzusammensetzung der einzelnen Populationen über die Zeitachse kann – ebenso wie bei den Brassen – aus Anhang 10 abgelesen werden, dass im betrachteten Zeitraum an keinem Locus eine gerichtete Entwicklung hinsichtlich des Ausfallens bzw. Hinzukommens eines bestimmten Allels beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurden auch hier die betrachteten Loci gemeinsam statistisch ausgewertet.

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
Me15/16	NED	2	168-180	180
МдµЗ	HEX	2	141-143	141
Mgµ5	FAM	8	126-140	126, 132-136
Mgµ6	FAM	18	192-228	198

Tab. 64: Eckdaten der verwendeten Loci in der Miesmuschel-Homogenatanalyse

Trotz der vergleichsweise schlechten Datenlage zeigt sich, dass die Ergebnisse der Homogenatanalyse zum Großteil die Ergebnisse zur genetischen Distanz der Individualanalyse bestätigen (vgl. Kap. 3.2.2): Die Ähnlichkeit der Homogenate unterschiedlicher Probenahmeflächen ist vergleichsweise hoch; die größten Unterschiede bestehen zwischen Sylter Homogenaten und den Homogenatproben der Ostsee-PNF Darßer Ort (Tab. 65). Zudem ist die Ähnlichkeit der Homogenate verschiedener Probenahmeflächen geringer als zwischen den Homogenaten derselben Fläche. Während sich die Homogenate der Jadebusen-Zeitreihe auf hohem Niveau ähneln wie die vom Darßer Ort, zeigen die Sylter Homogenate aufgrund des geringeren durchschnittlichen Ähnlichkeitsmaßes eine etwas größere Differenzierung.

# Tab. 65:Ähnlichkeitsindex (SM) der Miesmuschel-Jahreshomogenate auf Basis der 0/1-Matrix zur<br/>Allelverteilung in Miesmuschel-Homogenatproben innerhalb (fett) und zwischen den<br/>Probenahmeflächen

	Jadebusen	Sylt	Darßer Ort
Jadebusen	0,886±0,070	0,813±0,085	0,821±0,067
Sylt		0,826±0,086	0,754±0,084
Darßer Ort			0,887±0,074

Die Clusteranalyse der im paarweisen Vergleich aller Homogenate ermittelten Ähnlichkeitsmaße ergibt ein Dendrogramm, das sich in zwei Gruppen unterteilt (Abb. 16). Die überwiegende Mehrheit der Sylter Homogenate wird dabei einer nicht weiter differenzierbaren Gruppe gegenübergestellt, die sich aus Homogenatproben aller drei Probenahmeflächen zusammensetzt. Eine gerichtete Entwicklung der Allelzusammensetzung der Homogenate der ausgewählten Probenahmeflächen ist unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse werden ausführlicher in Kap. 4.2 diskutiert.

Aufgrund der vergleichsweise schlechten Datenlage der auf nur vier Primern basierenden Auswertung und der bereits erwähnten Problematik der möglichen Triploidie einiger Individuen wurde auf eine tiefergehende populationsgenetische Analyse der Miesmuschel-Homogenatproben mit ARLEQUIN (V3.5.1.2) verzichtet.



Abb. 16: Dendrogramm (Linkage zwischen den Gruppen, Quadrierte Euklidische Distanz) von Miesmuschel-Homogenatproben, basierend auf der Ähnlichkeit (SM) im paarweisen Vergleich (MJH = Jadebusen, MSH = Sylt, MDH = Darßer Ort; die angehängte Zahl ergibt das Jahr, die separate Zahl ist die Fallzahl und ist zu vernachlässigen)

Abschließend soll allerdings nochmals auf die Besonderheit des Locus *Me15/16* hingewiesen werden. Mit Hilfe dieses zur Artunterscheidung der drei Schwesterarten entwickelten Primers konnte in keinem Jahr das für *M. galloprovincialis* typische 128 bp-Allel nachgewiesen werden. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass in keiner der bisherigen Nordsee-Homogenate *M. galloprovincialis*-Allele oder -Individuen enthalten sind. Im Gegensatz dazu wurden in allen Jahreshomogenaten der Ostsee-PNF Darßer Ort die Allele mit einer Fragmentlänge von 168 bp und 180 bp nachgewiesen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass in allen bisherigen Homogenatproben sowohl *M. edulis* als auch *M. trossulus* bzw. deren Hybride enthalten sind. Die Anfertigung des Homogenates verhindert in diesem Zusammenhang leider eine differenziertere Betrachtung hinsichtlich der Häufigkeit der beiden Arten bzw. der Hybride (vgl. Kap. 3.1.2).



Abb. 17: Beispielhafte Darstellung von Elektropherogrammen von Miesmuschel-Homogenatproben am Locus *Me15/16* 

# 3.2.3 Aalmutter (Zoarces viviparus)

Für die Homogenatanalyse wurden 14 Jahreshomogenate der PNF Varel-Mellum, 16 Homogenate der PNF Meldorfer Bucht und 14 Homogenate der Ostsee-PNF Darßer Ort molekulargenetisch analysiert. Dabei wurden dieselben acht Mikrosatellitenloci verwendet wie bei der Individualanalyse.

Auf Basis dieser 44 Homogenatproben wurden an den acht in Tab. 66 dargestellten Loci 2-21 Allele nachgewiesen (vgl. auch Anhang 11). Wie aus Anhang 11 hervorgeht, waren 37 der insgesamt 106 Allele (32%) in allen Homogenatproben nachweisbar, während fünf Allele (4,7%) in nur äußerst geringer Frequenz auftraten (<10%).

Hinsichtlich der Unterschiede der Allelzusammensetzung der einzelnen Populationen über die Zeitachse kann – ebenso wie bereits bei den anderen Probenarten – aus Anhang 11 abgelesen werden, dass im betrachteten Zeitraum an keinem Locus eine gerichtete Entwicklung hinsichtlich des Ausfallens bzw. Hinzukommens eines bestimmten Allels beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurden auch hier die betrachteten Loci gemeinsam statistisch ausgewertet.

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
A01_Zvi1	HEX	21	210-270	s. Text
B08_Zvi2	HEX	25	253-301	s. Text
B10_Zvi1	FAM	21	392-432	s. Text
C01_Zvi1	FAM	19	227-271	s. Text
D01_Zvi1	HEX	3	342-354	342
E10_Zvi1	FAM	4	261-269	261
F03_Zvi2	FAM	11	339-359	s. Text
H03_Zvi1	TAMRA	2	181-182	s. Text

Tab. 66: Eckdaten der verwendeten Loci in der Aalmutter-Homogenatanalyse

Vielzahl monomorpher Marker resultiert simple matching-Vergleich in Die im hohen Ähnlichkeitsindizes (Tab. 67). Mit Werten von 0,881 bis 0,900 werden für den Vergleich der Homogenatproben an allen drei Probenahmeflächen äußerst hohe Ähnlichkeiten beschrieben. Im Vergleich dazu sind die zwischen den Populationen ermittelten Ähnlichkeitswerte mit durchschnittlich etwa 0,855 etwas geringer. Die hohe Einheitlichkeit des Datensatzes wird durch die geringe Standardabweichung in allen Populationen deutlich. Der Vergleich der Ähnlichkeitsindizes zwischen Homogenatproben verschiedener Probenahmeflächen zeigt außerdem, dass den keine populationsspezifische Unterstrukturierung in den Homogenatproben besteht. Wenn die genetische Einheitlichkeit der Homogenatproben auch die im Individualvergleich ermittelten Ähnlichkeitsmaße methodenbedingt übertrifft, so bestätigen die vorliegenden Ergebnisse zum Großteil die Ergebnisse der Individualanalyse (vgl. Kap. 3.1.3).

Tab. 67:	Ähnlichkeitsinde	ex (	SM) der Aalmutter-Jahreshom	nogenate	auf	Basis	der	0/1-Matrix	zur
	Allelverteilung	in	Aalmutter-Homogenatproben	innerhall	о (f	ett) u	nd	zwischen	den
	Probenahmefläc	hen							

	Varel-Mellum	Meldorfer Bucht	Darßer Ort
Varel-Mellum	0,883±0,025	0,858±0,028	0,852±0,033
Meldorfer Bucht		0,881±0,032	0,854±0,035
Darßer Ort			0,900±0,028

Die Clusteranalyse der im paarweisen Vergleich aller Homogenate ermittelten Ähnlichkeitsmaße erlaubt ebenfalls keine Differenzierung (Abb. 18). Lediglich das Homogenat "Meldorfer Bucht 2002"

wird im Dendrogramm als Ausreißer separiert dargestellt. Als Ursache hierfür sind leicht unterschiedliche Muster in der Allelverteilung an den allelreichen Loci *C01\_Zvi1*, *B08\_Zvi2* und *B10\_Zvi1* festzumachen. Die kurzen Astlängen im Dendrogramm lassen keine weitere Unterstrukturierung erkennen, selbst eine Differenzierung von Nord- und Ostsee-Proben ist auf der Grundlage dieser Daten nicht möglich. Auch durch diese Darstellung wird belegt, dass an keiner der untersuchten Populationen eine gerichtete Entwicklung in der Allelzusammensetzung der Homogenate nachweisbar ist.



Abb. 18: Dendrogramm (Linkage zwischen den Gruppen, Quadrierte Euklidische Distanz) von Aalmutter-Homogenatproben, basierend auf der Ähnlichkeit (SM) im paarweisen Vergleich (ZJH = Jadebusen, ZBH = Meldorfer Bucht, ZDH = Darßer Ort; die angehängte Zahl ergibt das Jahr, die separate Zahl ist die Fallzahl und ist zu vernachlässigen)

Wie in Kap. 3.1.4 bereits beschrieben, erbrachten bei der Individualanalyse 2009 überraschenderweise nur vier der zehn getesteten Primer auswertbare Ergebnisse. Im Rahmen der Homogenatanalyse gelang es aber selbst mit diesen vier Primer nicht, eine ausreichende Anzahl reproduzierbarer Amplifikationsmuster zu erzeugen. Es wurden alle 44 Homogenatproben (14 aus Halle, jeweils 15 aus Leipzig und dem Saartal) mit diesen vier Mikrosatellitenprimern analysiert. Von den 176 PCR-Durchläufen konnten lediglich 32 als zufriedenstellend bewertet werden. Diese entstammen überwiegend den Analysen der Loci LTM128 und LTM163. Am Locus LTM128 konnten allerdings lediglich zwei Allele nachgewiesen werden, während bei der Individualanalyse 17 Allele detektiert wurden. Am Locus LTM163 verblieben von den 28 Allelen der Individualanalyse lediglich zehn Allele. Auf Basis dieser Datenlage erscheint die Durchführung einer statistischen Auswertung wenig sinnvoll (Tab. 68).

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
LTM128	NED	2	230-232	232
LTM163	FAM	10	137-175	145, 163

 Tab. 68:
 Eckdaten der verwendeten Loci in der Regenwurm-Homogenatanalyse

Durch Einbindung weiterer Primer sollte die Situation verbessert werden. Dazu wurden, wie in Kap. 3.1.4.2 beschrieben, kürzlich entwickelte Primer für *Aporrectodea longa* auf Cross-Amplifikation getestet. Da diese Optimierungsversuche nicht den gewünschten Erfolg brachten, wurden die Untersuchungen zur Probenart Regenwurm abgebrochen; eine weiterführende Analyse der Regenwurm-Homogenatproben mit den *Aporrectodea*-Primern erfolgte nicht.

# 3.3 Retrospektive Betrachtung der Blutplasma-Einzelproben

Die retrospektiven Untersuchungen erfolgten an insgesamt 420 gelagerten Brassen-Blutplasmen der o.g. Probenahmeflächen (Jahre 2002 bis 2008). Die Assays aller neun in der Individualanalyse erfolgreich verwendeten Primer wurden dazu auf die veränderte Probenmatrix angepasst und die DNA aller 420 Plasmaproben isoliert. Bei der DNA-Quantifizierung zeigte sich, dass die Blutplasmaproben aufgrund des methodisch bedingten Ausschlusses von Blutkörperchen vergleichsweise geringe DNA-Gehalte aufweisen. Die Quantifizierung der DNA ergab eine Maximalkonzentration von 0,315 µg DNA/ml, während die Gewebeproben durchschnittlich 13,1 µg DNA/ml aufwiesen.

Dabei einigen Proben der DNA-Gehalt zu gering war, konnten nicht alle Amplifikationsergebnisse zufriedenstellend reproduziert werden. Aus diesem Grund wurden fünf der 420 Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Güdingen 2003-7 und 2003-10, Güdingen 2007-20, Hamburg

2007-17 und 2007-19). Am Locus *CypG27* konnten auch nach mehrfacher Wiederholung keine zufriedenstellenden Ergebnisse produziert werden, weswegen dieser aus der weiteren Betrachtung herausgenommen wurde. Die Analyse wurde deshalb mit sieben Markern (*Ca1*, *CypG24*, *CypG30*, *Lid1*, *Lid8*, *RhCa20*, *Z21908*) durchgeführt.

Wie aus Tab. 69 hervorgeht, wurden durch die Betrachtung der Blutplasmaproben 2002 bis 2008 bei sechs der sieben Loci 1-5 Allele mehr nachgewiesen als bei den jeweils 30 Individuen in den Untersuchungen 2009 und 2010. Lediglich am Locus *Z21908* zeigt sich ein anderes Bild: Hier wurden im Vergleich zu 2009 bzw. 2010 16 bzw. 15 Allele mehr nachgewiesen. Bei 13 von diesen handelt es sich allerdings um sehr seltene Allele (Häufigkeit innerhalb aller untersuchten Populationen jeweils unter 5%), die auch ausschließlich in den durch die Plasmaproben abgedeckten Jahren auftraten. Die durchschnittliche Allelzahl liegt in allen Populationen zwischen 6,0 und 9,6 (Tab. 70).

	Modifikation	Allelzahl	Allelgröße	häufigstes Allel
Ca1	NED	14	96-124	100
CypG24	HEX	14	172-206	188
CypG30	NED	24	165-239	183
Lid1	NED	13	244-268	254
Lid8	HEX	9	113-137	113
RhCa20	FAM	2	102-104	102
Z21908	FAM	24	136-188	146

Tab. 69:Eckdaten der verwendeten Loci in der retrospektiven Brassen-Individualanalyse auf Basis<br/>der Blutplasmaproben 2002 bis 2008

Tab. 70: Anzahl der Allele am Locus Z21908 in den Blutplasmaproben 2002 bis 2008

	Güdingen		Hamb	urg	Jochenstein		
	Stichprobe	Allelzahl	Stichprobe	Allelzahl	Stichprobe	Allelzahl	
2002	17	4	20	11	15	6	
2003	16	5	20	8	20	9	
2004	20	9	20	14	18	8	
2005	18	5	20	8	18	9	
2006	19	7	20	7	20	9	
2007	19	6	16	9	19	10	
2008	19	6	20	10	20	8	

Die wichtigsten populationsgenetischen Kenngrößen (*Na*, *Ne*,  $H_o$ ,  $H_e$  und *F*-Wert) bestätigen im Wesentlichen die Teilergebnisse der Jahre 2009 und 2010, weswegen sie hier nicht gesondert für alle 21 Probensets aufgelistet sind. Der Fokus der folgenden Betrachtung liegt deshalb auf der
Differenzierung der drei Populationen und auf der zeitlichen Entwicklung der Allelzusammensetzung. Die Auswertung erfolgt auf Basis aller vorliegenden Daten (2002 bis 2010).

Bei Betrachtung der genetischen Distanzen innerhalb und zwischen der Brassen-Populationen wird deutlich, dass auch über den Gesamtzeitraum von 2002 bis 2010 zwischen den Jahrgängen einer Population deutlich geringere Distanzmaße errechnet werden als zwischen den Populationen und, dass die größten Differenzierungen im paarweisen Vergleich mit den Donau-Brassen bestehen (Tab. 71).

Eine ähnliche Tendenz kann aus den  $F_{ST}$ -Werten abgeleitet werden (Tab. 72). Dieser Wert betont außerdem, dass die genetische Differenzierung zwischen den Jahrgängen von Güdingen und Hamburg nur sehr gering ausgeprägt ist, da sich die Werte nicht signifikant von den Werten innerhalb der Güdinger Population unterscheiden.

# Tab. 71:Genetische Distanzen (Nei 1972) innerhalb (fett) und zwischen den untersuchten Brassen-<br/>Populationen (Daten von 2002 bis 2010 berücksichtigt)

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	0,164±0,078	0,198±0,061	0,336±0,117
Hamburg		0,141±0,043	0,243±0,087
Jochenstein			0,115±0,052

Tab. 72:*F*<sub>ST</sub>-Werte innerhalb (fett) und zwischen den untersuchten Brassen-Populationen (Daten von<br/>2002 bis 2010 berücksichtigt)

	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Güdingen	0,038±0,017	0,042±0,012	0,074±0,023
Hamburg		0,028±0,009	0,052±0,017
Jochenstein			0,023±0,009

Werden die der Tab. 71 zugrunde liegenden Distanzmaße als Eingangsvariablen für eine Clusteranalyse verwendet, so zeigt das Dendrogramm (Abb. 19) zwei wesentliche Aspekte:

- Zum einen clustern die Jochensteiner Jahrgänge zusammen und werden der nicht näher differenzierbaren Gruppe von Güdingen und Hamburg gegenüber gestellt. Als "Ausreißer" werden die Populationen Güdingen 2003 und Hamburg 2007 der Jochenstein-Gruppe zugeordnet. Es muss jedoch darauf verwiesen werden, dass es sich gerade bei diesen beiden Populationen um Populationen mit einer etwas kleineren Stichprobengröße handelt (n=18 und n=17). Die dadurch bedingte geringere Markerzahl kann als ausschlaggebend für eine weniger vertrauenswürdige Zuordnung angesehen werden.
- Zum anderen wird aus der Verteilung innerhalb der Cluster deutlich, dass unabhängig von der betrachteten Population zeitlich n\u00e4her zusammenliegende Jahrg\u00e4nge nicht zusammen clustern.
   Daraus kann abgeleitet werden, dass zwischen direkt aufeinander folgenden Jahrg\u00e4ngen keine



höhere genetische Ähnlichkeit besteht als zwischen willkürlich ausgewählten Jahrgängen. Eine gerichtete Entwicklung der Distanzmaße über die Zeitachse ist somit nicht nachweisbar.

Abb. 19: Dendrogramm (Linkage zwischen den Gruppen, Quadrierte Euklidische Distanz) von Brassen-Individualproben (Plasmaproben 2002 bis 2008 sowie Individualproben 2009 und 2010), basierend auf Nei-Distanzen im paarweisen Vergleich (Güd = Güdingen, HH = Hamburg, Joch = Jochenstein; die angehängte Zahl ergibt das Jahr, die separate Zahl ist die Fallzahl und ist zu vernachlässigen)

Die auf Basis der Allelfrequenzen aller Individuen durchgeführte Untersuchung der prozentualen Anteile der molekularen Varianz (AMOVA) zeigt außerdem, dass die bestehenden Differenzierungen zu lediglich 4% mit Unterschieden zwischen den Populationen (p<0,01) und zu 3% mit Unterschieden zwischen den Jahren (p<0,01) erklärt werden (Abb. 20). Wie für Mikrosatelliten-Analysen üblich, wird

der überwiegende Anteil der Variabilität durch Unterschiede innerhalb der Individuen und innerhalb der Populationen erklärt.



Abb. 20: Verteilung der erklärten Gesamtvarianz in der Analyse aller berücksichtigten Brassen-Individualproben (2002-2010, 7 Loci)

Im Assignment-Tests (GenAlEx, V6.1) werden über alle Individuen demnach nur mittlere Wahrscheinlichkeiten für die korrekte Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden Population errechnet (Tab. 73). Etwa 80% der Saar- und Donau-Brassen können korrekt ihren Populationen zugeordnet werden, dagegen ist nur für zwei Drittel der Elbe-Brassen eine korrekte Zuordnung möglich.

Unterzieht man alle untersuchten Individuen einer Bayes'sche Analyse des Populationsassignments (STRUCTURE, V2.3.3), werden die in den Unterkapiteln 3.1.1.1 und 3.1.1.2 gezogenen Schlüsse auch auf dieser Ebene bestätigt: Eine Unterscheidung der drei Populationen ist prinzipiell möglich, Donau-Brassen lassen sich aber deutlich besser von den anderen Populationen differenzieren (Abb. 21). Bei einer Reihe von Saar- und Elbe-Brassen ist eine korrekte Zuordnung zu der jeweiligen Population nicht möglich. Hinsichtlich der zeitlichen Komponente kann aus Abb. 21 außerdem geschlossen werden, dass zwar Unterschiede in der Allelzusammensetzung der Jahrgänge bestehen, diese treten aber stochastisch auf. Eine gerichtete Entwicklung in der Merkmalsausprägung ist an keiner der drei Zeitreihen nachweisbar.

Bestärkt wird dies durch die zeitliche Entwicklung der beispielhaft ausgewählten klassischen populationsgenetischen Kenngrößen  $H_e$  und *F*-Wert (Abb. 22). In allen drei Populationen sind für beide Parameter über die Zeitachse Veränderungen zu verzeichnen, diese sind jedoch nicht gerichtet.

 
 Tab. 73:
 Prozentuale Anteile der korrekten Zuordnung eines Individuums zu der entsprechenden Brassen-Population anhand der Allelfrequenzen über alle Loci (Assignment-Test) (2009)

	richtige Population (%, n)	falsche Population (%, n)
Güdingen	79% (156)	21% (42)
Hamburg	67% (132)	33% (65)
Jochenstein	80% (155)	20% (39)
	75% (443)	25% (146)



Abb. 21: STRUCTURE-Plot der drei untersuchten Brassen-Populationen über alle Loci (Jahre 2002 bis 2010)



Abb. 22: Entwicklung der *H*<sub>e</sub>-Werte (links) und der *F*-Werte (rechts) über die betrachteten Zeiträume (oben: Güdingen, mitte: Hamburg, unten: Jochenstein)

# 4 Diskussion

Da die Untersuchungen auf einem "Individuenbasierten Ansatz" und "Retrospektiven Ansatz" basieren, werden die jeweils erzielten Ergebnisse getrennt voneinander diskutiert. Die unter Umständen notwendige methodische Diskussion ist inhaltlich den jeweiligen Kapiteln zugeordnet.

# 4.1 Individuenbasierter Ansatz

Ziel des individuenbasierten Ansatzes war die Durchführung einer genetischen Charakterisierung von UPB-Populationen als Grundlage einer Beschreibung der Allelkomposition ("Beschreibung des *status quo*"). Dazu wurden von vier Probenarten jeweils 30 Tiere von drei verschiedenen UPB-Probenahmeflächen mittels Mikrosatellitenanalyse 2009 gescreent und durch eine Wiederholungsuntersuchung 2010 validiert.

## Brassen

Hinsichtlich der Anzahl an Loci, der Anzahl an detektierten Allelen und der Auswertbarkeit der jeweils erhaltenen Muster konnte für den Brassen eine sehr gute methodische Grundlage für die Charakterisierung der UPB-Brassenpopulationen entwickelt werden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass an den beiden Loci *Z21908* und insbesondere *CypG24* signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bestehen. Dieses Muster ist insbesondere im zweiten Fall wahrscheinlich durch Null-Allele zu erklären. Für Folgeuntersuchungen sollte deshalb auf den Locus *CypG24* verzichtet werden. Dennoch zeigt sich, dass mit dieser Datenlage eine hochinformative populationsgenetische Analyse möglich ist.

Berücksichtigt man die ermittelten populationsgenetischen Kenngrößen, so zeigt sich, dass die Donau-Population die genetisch am meisten diverse Population darstellt und genetisch von den beiden anderen Populationen deutlich differenziert ist. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist sicherlich die Tatsache, dass die Donau eine Verbindung zu dem gesamten osteuropäischen Gewässernetz darstellt und sich dadurch auch faunistisch von den anderen großen Gewässersystemen Deutschlands unterscheidet. Eine sich unter Umständen wiederholende Auffrischung des Genpools führt zu einer höheren genetischen Diversität und damit im bundesdeutschen Vergleich zu einer Häufung privater Allele für die Jochensteiner Population. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die vergleichsweise hohe Alleldiversität besteht in der anzunehmenden Größe der Jochensteiner Population. Diese ist zwar auch in Hamburg als groß einzuschätzen, der Einfluss der Tide, die die Tiere in ihrer Bewegungsfreiheit einschränkt, stellt hier aber einen nicht zu unterschätzenden Faktor dar.

Die relative genetische Einheitlichkeit der Güdinger Population, die sich sowohl aus der Allelzahl, der *allelic richness* als auch aus dem STRUCTURE-Plot herauslesen lässt, ist mit ihrer stärkeren genetischen Isolation aufgrund der zahlreichen Stauhaltungen von Saar und Mosel zu erklären.

### Miesmuschel

Nach Optimierung der PCR-Assays für die Probenart Miesmuschel standen fünf Loci zur Verfügung. Auf Basis dieser Ergebnisse war eine populationsgenetische Charakterisierung der drei untersuchten Populationen nur sehr beschränkt möglich. Eine Erklärung für den fehlenden Erfolg der Amplifikationen der übrigen getesteten, aber nicht optimierbaren Mikrosatelliten-Assays könnte darin zu finden sein, dass keine originär für *M. edulis* entwickelten Mikrosatellitenprimer zur Verfügung standen, sondern auf die Primer zurückgegriffen werden musste, die für *M. trossulus* (GARDESTRÖM et al. 2008) und *M. galloprovincialis* (PRESA et al. 2002) entwickelt wurden. In beiden Veröffentlichungen sind zwar Cross-Amplifikationen der verwendeten Primer mit *M. edulis* beschrieben; dennoch erbrachten die Assays nicht den gewünschten Erfolg.

Die geringe Zahl an verwendeten Loci führt zwangsläufig zu einem geringeren Informationsgehalt der Analyse. Hierdurch wird auch die darstellbare Differenzierung zwischen den ausgewählten Populationen beeinflusst. Dies erschwert die populationsgenetische Charakterisierung, was beispielsweise im Vergleich der Nord- und Ostseemuscheln deutlich wird. Die Differenzierung zwischen den Nord- und Ostseepopulationen wäre wesentlich deutlicher zu erwarten gewesen, da es sich nachweislich um zwei verschiedene Arten bzw. deren Hybride handelt (QUACK unveröff.). Die beschränkte Aussagekraft der Analyse wird auch durch die schlechte Zuordnungsquote im Assignment-Test deutlich.

Die Auswertung wurde außerdem durch die in Abb. 4 (S. 30) dargestellten Muster erschwert, die in einigen Fällen auf Triploidie hinweisen. Wenn aus Laborversuchen auch bekannt ist, dass Polyploidie in Miesmuscheln induziert werden kann (BEAUMONT & FAIRBROTHER 1991, BRAKE et al. 2004), so ist dieses Phänomen bisher in Freilandpopulationen noch nicht beschrieben worden. Vor dem Hintergrund der Induktion durch Hitzeschockbehandlung (25°C) (BEAUMONT & KELLY 1989) handelt es sich um ein äußerst interessantes Phänomen, da hier ein Zusammenhang zum Klimawandel bestehen könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung weisen darauf hin, dass die Induktion von Triploidie auch in Freilandpopulationen von statten gehen kann. Leider kann in diesem Zusammenhang die Ursache der Triploidie nicht identifiziert werden. Da von BEAUMONT & KELLY (1989) nachgewiesen wurde, dass bereits ab Wassertemperaturen von 25°C Triploidie induziert werden konnte, kann aber davon ausgegangen werden, dass bei entsprechenden Temperaturspitzen in Zeiten der besonderen Empfindlichkeit (evtl. zur meiotischen Teilung) solche Effekte auch im Freiland entstehen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung war es leider nicht möglich, diesen Aspekt weiter zu verfolgen. Ein direkter Zusammenhang von erhöhten Wassertemperaturen ("Klimawandel") und Effekt auf genetischer Ebene scheint jedoch zu bestehen.

Wenn auch die ausgewählten Individuen und Populationen aus Mangel an verwendbaren Loci genetisch in wesentlich geringerem Umfang charakterisiert werden konnten als geplant, so konnte mit dem Locus *Me15/16* auf den UPB-Probenahmeflächen zwei der drei *Mytilus*-Arten bzw. deren Hybride nachgewiesen werden. Auf Basis der jeweils 60 ausgewählten Individuen konnte eine zusätzliche Introgression von *M. galloprovincialis*-Allelen in eine der beiden Nordssee-Populationen allerdings nicht nachgewiesen werden. Für die nordwärts gerichtete Arealausweitung der ursprünglichen Mittelmeerart *M. galloprovincialis* werden verschiedene Ursachen diskutiert: Eine davon könnte der Klimawandel sein (LUTTIKHUIZEN et al. 2002, GOSLING et al. 2008). Vor dem Hintergrund, dass nach QUACK (unveröff.) im Jahr 2004 in der Population Jadebusen/Eckwarderhörne bereits das

charakteristische *M. galloprovincialis*-Allel (128 bp) nachgewiesen werden konnte, wird vermutet, dass die Größe der jetzt untersuchten Stichprobe (insgesamt 60 Tiere) als Nachweis derzeitig noch selten auftretender Effekte unzureichend war. Entweder ist *M. galloprovincialis* noch in sehr geringer Frequenz vorhanden und daher schwer nachweisbar oder es handelte sich bei dem Auftreten 2004 nur um ein kurzzeitiges Phänomen.

## Aalmutter

Für die Untersuchungen wurden in einem ersten Schritt Mikrosatellitenprimer für *Zoarces viviparus* entwickelt. Dies führte im Vergleich zu den auf Cross-Amplifikationen beruhenden Markern zu distinkteren Mustern in den Elektropherogrammen, was insbesondere auch bei der Analyse der Homogenatproben die Auswertbarkeit wesentlich verbesserte. Im Rahmen der populationsgenetischen Charakterisierung der UPB-Individuenen wurden acht Loci erfolgreich verwendet, fünf davon wiesen eine zweistellige Anzahl an Allelen auf. Auf dieser Basis konnte eine sehr gute Datenlage zur Charakterisierung der Populationen erarbeitet werden.

Die ermittelte hohe Alleldiversität innerhalb der Populationen überlagert allerdings die Darstellbarkeit möglicher genetischer Differenzierungen zwischen den Populationen. Durch Wiederholung der Untersuchungen im Jahr 2010 wurde die Stichprobe erhöht, was sich durch das Hinzukommen weiterer privater Allele in einer zusätzlichen Erhöhung der Diversitätswerte äußerte. Die hohe genetische Variabilität innerhalb der Populationen führt letztlich dazu, dass Differenzierungen zwischen den Populationen nicht mehr erkannt werden. Eine Ursache dieser hohen Alleldiversität kann u.a. die Vorgehensweise beim Fang der Tiere sein. Die Aalmutter ist als Raubfisch solitär lebend und wird deshalb – zumindest auf den Nordsee-Probenahmeflächen – für die UPB mit Dredgen (Schleppnetzen) gefangen. Dabei werden je nach Fangerfolg Strecken befahren, die weit über den Aktivitätsraum eines Tieres hinausgehen, so dass sich eine Probe von 30 Tieren aus mehreren "effektiven" Populationen zusammensetzen kann, wenngleich sich dies deutlicher auf die Werte des Fixierungsindex ausprägen müsste.

Vor diesem Hintergrund erscheint für eine populationsgenetische Studie an Aalmuttern die Verwendung einer Außengruppe sinnvoll, da dadurch die Diversitäts- und Distanzmaße innerhalb der untersuchten Populationen besser bewertet werden können. Analysen, die zusätzlich auch Aalmutter-Populationen aus Schweden, Dänemark und Finnland berücksichtigen, werden zurzeit im Rahmen einer Diplomarbeit am Fach Biogeographie der Universität Trier (KINITZ, in Vorbereitung) und in Kooperation mit dem Institute of Coastal Research, Swedish Board of Fisheries, durchgeführt (BERGEK et al., in Vorbereitung). Derartige Außengruppentests konnten für die vorliegende Untersuchung nicht durchgeführt werden. Dasselbe gilt für die in diesem Zusammenhang hoch interessante Populationsgrößenabschätzung mittels ONeSAMP V1.2 (TALLMON et al. 2008,). Zum Zwecke der Abschätzung der Populationsgröße der Aalmutterpopulation der Meldorfer Bucht wurden exemplarisch die Fragmentlängendaten der 2009er Stichprobe auf der Homepage des *open source*-Programmes hochgeladen (http://genomics.jun.alaska.edu/asp/Default.aspx). Ergebnisse liegen bisher leider noch nicht vor.

Zusammenfassend ist für die untersuchten Aalmuttern festzuhalten, dass – unabhängig von der abschließenden Bewertung der genetischen Differenzierung der Populationen – die nachgewiesene Allelausstattung dieser Art offensichtlich eine gute genetische Konstitution verleiht um klimabedingten Effekten, wie sie beispielsweise von PÖRTNER & KNUST (2007) beschrieben wurden, zu widerstehen.

## Regenwurm

Die in Kap. 3.1.4 dargestellten Ergebnisse zur populationsgenetischen Charakterisierung der UPB-Regenwürmer basieren auf vier Loci. Aus statistischer Sicht ist dies problematisch, obwohl diese Loci überraschend variabel waren. Dass für die Auswertung lediglich vier Loci zur Verfügung standen war nicht zu erwarten, da mit den Primern von VELAVAN et al. (2008) speziell für *L. terrestris* entwickelte Marker zur Verfügung standen. Bei der Optimierung der Assays wurde jedoch festgestellt, dass die von den Autoren angegeben Annealing-Temperaturen in sechs von zehn Fällen nicht zum gewünschten Ergebnis führten. Auch die anschließenden Gradienten-Tests erbrachten keinen Erfolg. Da das Annealing bei Temperaturen unter 40°C zunehmend unspezifisch wird, wurde auf eine weitere Absenkung der Annealing-Temperatur verzichtet und stattdessen die Analyse auf vier Loci beschränkt.

Nichtsdestotrotz konnte mit den eingesetzten Methoden eine Charakterisierung der drei Regenwurm-Populationen erreicht und eine klare Strukturierung zwischen den Populationen belegt werden. Die Qualität der Analyse wird auch dadurch belegt, dass im Assignment-Test 77% der Individuen korrekt ihrer entsprechenden Population zugeordnet werden konnten. Es zeigte sich, dass trotz der durchschnittlichen Entfernung der Populationen von Halle und Leipzig (ca. 45 km) eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen diesen beiden ostdeutschen Populationen besteht, während sich die saarländische Population deutlich von beiden differenzieren lässt. Die hier als "saarländische Population" bezeichnete Gruppe setzt sich aus insgesamt fünf Teilpopulationen entlang des Saartales zusammen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass auch zwischen diesen Teilpopulationen offensichtlich zum Teil große Unterschiede in der Allelzusammensetzung und somit in der genetischen Konstitution bestehen. Wie unter anderem aus dem STRUCTURE-Plot der Regenwurm-Populationen hervorgeht, lassen sich insbesondere die Tiere der Saartal-PNFs Völklingen und Dillingen von den übrigen saarländischen Populationen differenzieren. Die Ursache für diese Differenzierung kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt werden. Zum einen ist nicht auszuschließen, dass es sich um kryptische genetische Linien handelt. Zum anderen ist auch eine Verbringung der Würmer denkbar, da es sich bei allen Teilflächen um städtisch genutzte Wiesen und Parkanlagen handelt, die mit Bauaushub aufgefüllt sind.

## Fazit

Für drei der vier ausgewählten Arten wurden die Grundlagen für eine populationsgenetische Charakterisierung gelegt. Es hat sich gezeigt, dass zwischen den betrachteten Modellspezies wesentliche Unterschiede in der Optimierbarkeit der Methoden bestehen. Die Auswertung der Ergebnisse zeigt aber auch, dass eine Wiederholung der Einzelprobenanalyse mit Individualproben des neuen Jahrganges für eine vertiefte Interpretation notwendig war. Aus statistischer Sicht ist insbesondere bei hoch variablen Populationen eine einmalige Probenahme nicht ausreichend.

# 4.2 Retrospektiver Ansatz

Ziel des retrospektiven Ansatzes war die Überprüfung von Allelveränderungen in Probenreihen (Archivproben) der UPB. Um die Ergebnisse der genetischen Analysen der Homogenate mit denen der Einzelindividuen vergleichen und gemeinsam interpretieren zu können, wurde eine identische Methode für beide Ansätze verwendet. Vor dem Hintergrund der heute gängigen populationsgenetischen Methoden stellt die Mikrosatellitenanalyse die am besten geeignete Möglichkeit dar.

Die Auswertung von Allelen in Poolproben ist allerdings nicht unproblematisch: Mikrosatelliten-Elektropherogramme weisen mitunter methodisch bedingt sogenannte Stotter- oder Schattenbanden auf, die auch bei der Analyse von Individuen störend sein können. Solche Muster entstehen durch *slippage* oder den Einbau von *non-template*-Nukleotiden durch die Polymerase während der PCR. Aufgrund charakteristischer Muster homo- und heterozygoter Individuen sind dieser Stotterbanden bei der Auswertung jedoch eliminierbar (Abb. 23). Die Charakteristik von Homogenatproben ist jedoch, dass theoretisch alle bei Individuen nachweisbaren Allele auch in einem Homogenat nachweisbar sind. Dabei ist die Höhe des jeweiligen *peaks* abhängig von der Anzahl der amplifizierten Fragmente identischer Länge und somit auch von der Anzahl der in einem Homogenat enthaltenen Allele. Im Falle von Stotterbanden kann dies dazu führen, dass ein Allel durch die Schattenbande eines anderen Allels überlagert wird. Aus diesem Grund müssen bei der Auswertung von Homogenatproben alle vorhandenen *peaks* berücksichtigt werden, auch wenn dabei ein je nach Locus unterschiedlicher Anteil von Stotterbanden bewusst als potenzielles Allel akzeptiert werden muss (Abb. 24).



Abb. 23: Beispielhafte Darstellung von Elektropherogrammen mit Vorpeak (oben) und Stotterbande (unten); Miesmuschel-Individualproben Darßer Ort Nr. 10, Nr. 11 am Locus *MT203;* Standard: rot.



Abb. 24: Beispielhafte Darstellung von Elektropherogrammen von Miesmuschel-Homogenatproben am Locus *MT203;* Jadebusen/Eckwarderhörne, Homogenat 2000 (oben), Sylt-Königshafen, Homogenat 1993 (Mitte), Darßer Ort, Homogenat 2008 (unten), Standard: rot.

Dass hierbei oft nur geringe Abstände zwischen den verschiedenen *peaks* bestehen, erschwert zudem die Auswertung. Bei einem Dinukleotid-*repeat* sind theoretisch 2 bp-Abstände zwischen den jeweiligen *peaks* zu erwarten. Tatsächlich kann es aber auch bei Individualanalysen zu kürzeren Abständen zwischen den *peaks* kommen (RODERUS 2010), wenn einzelne Insertionen oder Deletionen (*Indels*) auftreten. Bei Homogenatproben tritt dies jedoch in noch stärkerem Maße in den Vordergrund. Es stellt sich die Frage, ob dieses Phänomen durch minimale Abweichungen bei der Kapillarelektrophorese bedingt ist oder aufgrund von *Indels* innerhalb der flankierenden Region bzw. der Kernregion des Mikrosatelliten auftritt. Solche Probleme können insbesondere bei der Anwendung von Mikrosatelliten-Primern auftreten, die für andere Arten entwickelt wurden (vgl. auch RODERUS 2010). Klarheit könnte nur durch eine Sequenzierung der jeweiligen Mikrosatellitenregionen erreicht werden, was nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war.



Abb. 25: Beispielhafte Darstellung von Elektropherogrammen von zwei Individuen mit identischem Primer (Dinucleotid-Wiederholung), aber einem 1 bp Abstand (verändert nach RODERUS 2010)

Neben diesen technischen Schwierigkeiten bei der Auswertung hochpolymorpher Muster muss auf den Informationsverlust eingegangen werden, der durch die Herstellung von Poolproben entsteht: Eine wesentliche Information populationsgenetischer Analysen, die Unterscheidbarkeit von homo- und heterozygoten Individuen, geht verloren.

Die Auswertung einer solchen Datenlage muss sich deshalb zwangsläufig auf ein binäres Ähnlichkeitsmaß beschränken. Dies bedeutet, dass in der Auswertung eines Amplifikationsmusters, das aus einem Homogenat gewonnen wurde, eine Position in der 0/1-Matrix nur in dem speziellen und logischerweise auch seltenen Fall mit 0 (DNA-Fragment abwesend) bezeichnet wird, wenn es in keinem der im Homogenat zusammengefassten Individuen vorhanden war. Die Unterschiede zwischen zwei Homogenaten A und B ergeben sich deshalb lediglich dadurch, dass ein DNA-Fragment in der einen Population zumindest einmal auftritt, während es in der anderen Population in keinem Individuum vorhanden ist (Abb. 26). Das heißt, neben dem oben erwähnten Informationsverlust kommt es durch die Homogenatbildung zusätzlich zu einer Unterschätzung der genetischen Differenzierung der Populationen im Vergleich zu den aus Einzelindividuen zusammengesetzten Populationen. Ausgeglichen wird dies dadurch, dass in der Regel das aus Homogenaten gebildete Ähnlichkeitsmaß die tatsächlichen Verhältnisse in der Population überschätzt (siehe Abb. 26).

Die hier formulierten statistischen Probleme bei der Auswertung von Homogenatproben sollen jedoch nicht darüber hinweg täuschen, dass es sich bei diesem Verfahren um die derzeit einzige Möglichkeit handelt, Individual- und Poolproben gemeinsam zu analysieren und auszuwerten. Die Ergebnisse wurden deshalb unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Problemfelder ausgewertet und diskutiert.

	Po	opulat A	tion		Homoge A	nat		Ро	pulat B	ion		Homoge B	nat
1	0	1	1	1	1		1	0	1	0	0	1	
1	0	1	0	0	1		0	0	1	0	1	1	
0	0	1	1	1	1		0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0		0	0	0	1	1	1	
0	1	0	0	0	1		0	0	0	0	0	0	
0	1	1	0	1	1		0	0	1	1	0	1	
1	1	1	1	0	1		0	1	0	0	0	1	
BSR(A) = 0,650±0,141 BSR(B) = 0,491±0,121													
Ähnlichkeit der Populationen BSR(A/B) = 0,520±0,168													
Einfache Ähnlichkeit der Homogenate SM(A/B) = 0,625													

Abb. 26: Schematische Darstellung der Unterschiede in der statistischen Auswertung von Populationen aus Einzelindividuen und Homogenaten

#### Brassen

Die Analyse der Brassen-Homogenate erfolgte mit acht Loci. Mit insgesamt 99 Allelen wurden damit in den zur Verfügung stehenden Homogenaten mehr Allele nachgewiesen als bei der Individualanalyse (77). Dies zeigt, dass trotz der methodischen Schwierigkeiten eine vergleichsweise gute Datenlage zugrunde lag, die eine detaillierte Auswertung der Ergebnisse erlaubte. Hinsichtlich der zusätzlich durchgeführten populationsgenetischen Charakterisierung der Homogenatproben zeigte sich, dass die Homogenate zum Großteil die Ergebnisse der Individualanalyse bestätigen. Die Güdinger Homogenate erwiesen sich als genetisch ähnlicher als die beiden anderen. Die Jochensteiner Homogenate zeigten die größte Differenzierung von den übrigen Standorten. Hinsichtlich der eingangs gestellten Fragen nach einer gerichteten Allelveränderung über die Zeitachse (Hinzukommen oder Wegfallen bestimmter Allele), wurde dies beim Brassen weder auf Basis der Auswertung einzelner Loci noch bei der Gesamtbetrachtung der Loci festgestellt (vgl. auch Anhang 9). Bei den Schwankungen der Allelverteilung über die betrachteten Jahre handelt es sich in allen Fällen um einen vorübergehenden Wegfall oder ein Hinzukommen einzelner Allele. Meist wurde dies im Folgejahr wieder ausgeglichen. Die festgestellten Veränderungen waren somit nicht gerichtet, sondern müssen eher auf die genetische Diversität der Populationen und die dadurch bedingte Variabilität der Stichprobe zurückgeführt werden. Dies wird dadurch deutlich, dass in den meisten Fällen gerade seltene Allele über die Jahre eine höhere Variabilität in ihrem Auftreten zeigten. Aus statistischer Sicht ist dies plausibel: Bei der Individualanalyse wurden jeweils 30 Tiere pro Population genetisch gescreent. Es zeigte sich, dass eine Vielzahl an Allelen mit vergleichsweise geringer Frequenz auftraten. Die zur Verfügung stehenden Homogenatproben setzen sich aber aus nur jeweils 20 Tieren zusammen. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn gerade seltene Allele in den Homogenaten nicht immer nachweisbar waren. Letztlich führt der Verlust an seltenen Allelen im Homogenat zu einer "Vereinheitlichung" aller untersuchten Homogenatproben. Dies gilt sowohl für die Homogenate einer Probenahmefläche über die Zeit als auch für die Homogenate verschiedener Probenahmeflächen (Abb. 27).



Abb. 27: Beispielhafte Darstellung von Elektropherogrammen von Hamburger Brassen-Homogenatproben am Locus *RhCa20* als Beleg der relativen Einheitlichkeit über die Zeit.

### Miesmuschel

Die Analyse der Miesmuschel-Homogenate erfolgte auf Basis von vier Loci. An diesen konnten 30 Allele nachgewiesen werden. Dies entspricht in etwa dem Ergebnis der Individualanalyse, bei der bei Nicht-Berücksichtigung des Locus *MT203* insgesamt 32 Allele detektiert wurden. Wie aus der Zusammenstellung der Ergebnisse der Homogenatanalyse hervorgeht (vgl. Kap. 3.2.2), muss eine solche Markerzahl als zu gering betrachtet werden, um eine gute genetische Auflösung zu erreichen. Darüber hinaus erschwert die anzunehmende Triploidie der Muscheln (Kap. 3.2.2) eine tiefergehende Interpretation der Daten.

Hinsichtlich der zentralen Frage der gerichteten Allelveränderung über die Zeit muss aber auch hier konstatiert werden, dass das sporadische Hinzukommen oder Wegfallen bestimmter Allele dominiert. Eine gerichtete Veränderung der Allelfrequenzen konnte auf Basis dieser Datenlage in keinem Fall nachgewiesen werden (vgl. auch Anhang 10). Auch hier werden die festgestellten Veränderungen auf die genetische Diversität der Populationen und die dadurch bedingte Variabilität der Stichprobe zurückgeführt. Die Ergebnisse des artspezifischen Markers *Me15/16* belegen auch für die Homogenatproben, dass bisher keine Introgression der wärmeliebenden *M. galloprovincialis* in die Nordsee-Populationen festzustellen ist. Aus dieser Sicht ist bisher kein Einfluss höherer Wassertemperaturen im Küstenbereich der deutschen Bucht (WILTSHIRE & MANLY 2004) auf die Einwanderung von *M. galloprovincialis* nachweisbar.

### Aalmutter

Die Entwicklung von Aalmutter-Mikrosatellitenprimern (Kap. 4.1) führte zu einer besseren Auswertbarkeit der Elektropherogramme. Dies war insbesondere bei der Analyse der Homogenatproben von Bedeutung, da auch kleine *peaks*, die bei der Analyse von Homogenatproben zu berücksichtigen sind (siehe Anfang Kap. 4.2), besser erkannt wurden (Abb. 28, vgl. auch Abb. 24).



Abb. 28: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms des Aalmutter-Homogenates "Meldorfer Bucht 2005" am Locus *B10\_Zvi1;* Standard: rot.

Die Analyse der Aalmutter-Homogenate erfolgte auf Basis von acht Loci. Mit insgesamt 106 Allelen wurde eine gute Datenlage erarbeitet und mehr Allele nachgewiesen als in den Individual-

untersuchungen von 2009 und 2010. Dies ist allerdings nicht weiter verwunderlich, da – im Gegensatz zum Brassen – in einer Homogenatprobe durchschnittlich etwa 200 Tiere (Nordsee) bzw. meist zwischen 60 und 100 Tiere (Ostsee) enthalten sind. Ein Effekt der unterschiedlichen Stichprobengrößen auf die Allelzahl der jeweiligen Homogenatproben war nicht nachweisbar. Somit ist davon auszugehen, dass aus populationsgenetischer Sicht auch eine kleinere Stichprobe (zwischen 30 und 60 Tiere) eine Vergleichbarkeit der Homogenatproben garantiert.

Wie in Kap. 3.2.3 bereits beschrieben, zeichneten sich die untersuchten Populationen durch eine hohe Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Allelverteilung auf. Etwa ein Drittel der Allele war in allen Proben anzutreffen. Lediglich zwei Marker (*A01\_Zvi1*-219 bp und *D01\_Zvi1*-354 bp) können als "populationsspezifisch" angesehen werden, da sie in höherer Häufigkeit in den Ostsee-Homogenaten nachgewiesen wurden, während sie weder im Transekt Varel-Mellum noch in der Meldorfer Bucht detektiert wurden. Das weitere Fehlen populationsspezifischer Marker macht, wie auch bei der Individualanalyse (Kap. 3.1.3), eine genetische Differenzierung der Homogenatproben unterschiedlicher Probenahmeflächen unmöglich.

Hinsichtlich der zentralen Frage einer gerichteten Allelveränderung über die Zeitachse, bleibt deshalb festzuhalten, dass dies auch bei der Aalmutter weder auf Basis der Auswertung einzelner Loci noch bei der Gesamtbetrachtung der Loci festgestellt werden konnte. Während bei der Untersuchung der Brassenhomogenate mitunter Variationen in der Allelverteilung über die Jahre zu beobachten waren, sind diese bei der Aalmutter deutlich schwächer ausgeprägt (vgl. Anhang 11). Die Ursache dieser Variationen ist wahrscheinlich die gemäß SOP von Jahr zu Jahr variierende Zahl der in die Homogenatprobe eingehenden Individuen.

## Regenwurm

Auf Basis der zur Verfügung stehenden Marker war keine Auswertung der Regenwurm-Homogenatproben möglich (Kap. 3.2.4). Insbesondere wegen des Fehlens zahlreicher, bei den Individuen nachgewiesenen Allele muss die Assay-Optimierung hinterfragt werden. Um unspezifisches Annealing zu unterbinden, wurde ähnlich wie bei der Individualanalyse auf eine Herabsetzung der Annealingtemperaturen auf unter 37°C verzichtet. In diesem Zusammenhang sei nochmals erwähnt, dass Mikrosatellitenanalysen bei *L. terrestris* offensichtlich als problematisch eingestuft werden müssen, da außer den Arbeiten von VELAVAN et al. (2008) keine anderen Mikrosatellitenuntersuchungen zu *L. terrestris* vorliegen und Cross-Amplifkationen von *L. rubellus*-Primern (HARPER et al. 2006) und von *Aporrectodea longa*-Primern (eigene Untersuchungen) nicht funktionierten.

# 4.3 Retrospektiver Ansatz mit Einzelproben (Blutplasmen)

Als Bindeglied zwischen dem individuenbasierten und retrospektivenAnsatz wurden zusätzlich in Form von Blutplasma vorliegende Einzelproben von Brassen aus den Jahren 2002 bis 2008 "retrospektiv" untersucht.

Von einem methodisch-theoretischen Standpunkt aus stellt hier die Stichprobengröße aus zwei Gründen ein grundsätzliches Problem dar. Zum einen sind die die Populationen charakterisierenden Stichproben mit jeweils n=20 wesentlich kleiner als die üblicherweise in populationsgenetischen Analysen verwendete Mindeststichprobenzahl von n=30. Dies bedeutet, dass seltene Allele (i.S. von Allelen mit einer Auftrittswahrscheinlichkeit von unter 10%) naturgemäß bei einer um ein Drittel verringerten Stichprobe unterschätzt werden bzw. auch nicht nachgewiesen werden können. Zum anderen ist durch die im Vergleich zu den Individualuntersuchungen 2009 und 2010 verkleinerte Stichprobengröße eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse ebenfalls nur eingeschränkt möglich. Dennoch konnten, wie in Kap. 3.3 dargestellt, die drei untersuchten Populationen anhand der Plasmaproben genetisch relativ gut charakterisiert werden. Die Werte der populationsgenetischen Kenngrößen entsprechen weitestgehend denen, die auf Basis der jeweils 30 Individualproben 2009 und 2010 ermittelt wurden. Zumindest für die drei untersuchten Brassen-Populationen kann damit geschlussfolgert werden, dass für die populationsgenetische Charakterisierung auf Basis von Mikrosatellitenanalysen eine Mindeststichprobe von 20 Individuen tatsächlich ausreichend ist. Eine Mindestmarkerzahl von sieben Loci sollte hierbei jedoch eingehalten werden.

Die Clusteranalyse der Plasmaproben zeigte jedoch, dass gerade die Jahrgänge mit einer Stichprobe n<20 den zu erwartenden Clustern nicht zugeordnet werden konnten. Dies deutet an, dass es sich im vorliegenden Fall bei einer Stichprobengröße von etwa n=20 um das absolute Minimum handelt. Bei genetisch variablen Probenarten sollte aus diesem Grund für populationsgenetische Studien ein "Sicherheitspuffer" angestrebt werden und von einer Stichprobe von idealerweise etwa 30 Individuen ausgegangen werden.

Aus methodischer Sicht birgt die Matrix folgende Schwierigkeit: Aufgrund der Vorgehensweise bei der Probengewinnung (Zentrifugation des Vollblutes zur Abscheidung von Zellbestandteilen und Abheben des flüssigen Überstandes) ist der DNA-Gehalt der Matrix Blutplasma gegenüber einer Vollblut- oder Gewebeprobe zwangsläufig herabgesetzt. Allerdings widerstehen Verfahren, die auf Amplifikation von DNA-Fragmenten basieren, diesem Aspekt prinzipiell. Das heißt, auch bei geringerem DNA-Gehalt einer Probe sind solche populationsgenetischen Studien durchführbar, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigt wurde. Ein geringerer DNA-Gehalt einer Probe erfordert allerdings eine zusätzlich optimierte Herangehensweise bei der DNA-Isolation und beim PCR-Assay. Im vorliegenden Fall konnte dies ohne erhöhten Aufwand für fünf der 420 Proben nicht erreicht werden. Ebenso musste der Locus *CypG27* aus der Auswertung genommen werden, was den Informationsgehalt der Analyse durch Verminderung der Markerzahl theoretisch zusätzlich schmälerte. Ob im vorliegenden Fall mit dem Verzicht auf einen Locus tatsächlich ein Informationsverlust einhergeht, kann nicht beantwortet werden.

Vergleicht man die Ergebnisse des retrospektiven Ansatzes der Blutplasmaproben mit denen der Homogenatanalyse (jeweils eine Stichprobe von n=20 und damit ggf. Unterschätzung seltener Allele, Kap. 4.2) hinsichtlich der statistischen Datengrundlage, ist der Ansatz mit Einzelproben als der Aussagekräftigere anzusehen. Es empfiehlt sich, an dieser Stelle die Ergebnisse der Homogenatanalyse von Miesmuschel und/oder Aalmutter als Vergleich heranzuziehen (vgl. Kap. 3.2.2 und Kap. 3.2.3). Insbesondere im letzten Fall führten hohe bis sehr hohe SM-Koeffizienten zwischen den untersuchten Homogenatproben dazu, dass eine Differenzierung der Populationen und eine Zuordnung der Homogenatprobe zu einem populationsspezifischen Cluster nicht möglich war.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass Blutplasma aus methodischen Gründen sicherlich nicht die ideale Matrix für populationsgenetische Studien darstellt, aufgrund des Einzelproben-Charakters aber für einen solchen Ansatz gegenüber Homogenatproben einen unschätzbaren Vorteil bietet.

# 5 Zusammenfassung und Fazit

Bisherige Prognosen zum Einfluss des Klimawandels auf die Biodiversität lassen drastische Veränderungen in der Zusammensetzung der natürlichen Lebensgemeinschaften erwarten. Während hierbei meist die Ebenen der Arten und Lebensgemeinschaften im Fokus der öffentlichen Diskussionen stehen, spielt der intraspezifische Verlust von Alleldiversität, d.h. der Verlust genetischer Vielfalt und damit einher gehend der Verlust an Anpassungsfähigkeit, in der öffentlichen Wahrnehmung bestenfalls eine untergeordnete Rolle.

Zur Analyse dieser genetischen Veränderungen wurden auf der Grundlage eines individuenbasierten sowie retrospektiven Monitorings verschiedene UPB-Populationen mit folgenden Zielen untersucht:

- Durch das individuenbasierte Monitoring wurde die genetische Ausstattung ("Alleldiversität") ausgewählter UPB-Populationen beschrieben. Dies diente zum einen der Schaffung eines status quo bezüglich der Allelzusammensetzung der ausgewählten Populationen und zum anderen der Überprüfung der Vergleichbarkeit der Allelzusammensetzung verschiedener UPB-Populationen als Grundlage für eine prinzipiell zu fordernde genetische Vergleichbarkeit von Umweltproben (Qualitätssicherungsaspekt).
- Durch das retrospektive Monitoring wurde überprüft, inwieweit die UPB-Homogenatproben für eine rückschauende Beschreibung der Allelveränderungen innerhalb dieser Populationen geeignet sind.

Die Untersuchungen wurden an den Probenarten Brassen (*Abramis brama*), Miesmuschel (*Mytilus edulis*), Aalmutter (*Zoarces viviparus*) und Regenwurm (*Lumbricus terrestris*) durchgeführt. Die Auswahl des Artensets erfolgte so, dass alle trophischen Ebenen berücksichtigt wurden und darüber hinaus für die Zeitreihenanalyse eine ausreichende Anzahl an Generationen vertreten waren.

Für jeweils 30 Individuen aus den Untersuchungsjahren 2009 und 2010 wurden grundlegende populationsgenetische Parameter erhoben, die eine detaillierte genetische Charakterisierung der ausgewählten Populationen (n=3) erlauben. Die Wiederholung von Probenahme und Analyse einer identischen Zahl an Individuen im Folgejahr ermöglichte eine Validierung der bei der Erstuntersuchung erzielten Ergebnisse. Damit wurde ein Grundstein ("genetischer *status quo*") für die Beschreibung der Allelkomposition ausgewählter UPB-Populationen gelegt ("Individuenbasierter Ansatz").

Darüber hinaus wurde anhand ausgewählter Archivproben eine Zeitreihenanalyse auf Veränderungen der genetischen Variabilität bzw. unter Umständen klimabedingt gerichteter Allelveränderungen durchgeführt. Schwerpunkt dieses Ansatzes war, retrospektiv zu überprüfen, ob in den exemplarisch ausgewählten Probenarten und deren Zeitreihen Veränderungen in der Allelzusammensetzung zu diagnostizieren sind ("Retrospektiver Ansatz"). Die Kenntnis vergangener Veränderungen ist wichtig für die Bewertung der heute gefundenen Allelvielfalt und lässt Rückschlüsse auf die genetische Vergleichbarkeit der Proben über den Untersuchungszeitraum zu. Dazu wurden die ausgewählten Homogenatproben mit identischen Methoden populationsgenetisch analysiert und die Nutzbarkeit von Homogenatproben für eine solche Fragestellung abschließend bewertet.

Es wurde gezeigt, dass mit Mikrosatellitenanalysen die wesentlichen Grundlagen für die populationsgenetische Charakterisierung verschiedenartiger Populationen gelegt werden konnten. Für drei der vier Probenarten wurden Assays entwickelt, die im Falle der Wiederholung von Probenahme und Analyse einen Vergleich mit dem in den Jahren 2009 und 2010 beschriebenen *status quo* ermöglichen.

Für **Brassen** wurde mit den genutzten Methoden eine gute Datenlage zur Charakterisierung des Ist-Zustandes der Allelzusammensetzung der ausgewählten Populationen geschaffen. Die Donau-Brassen erwiesen sich im Vergleich mit den beiden Populationen von Elbe und Saar als genetisch diverser, die wesentlich kleinere Population von Güdingen/Saar zeichnete sich durch eine hohe genetische Einheitlichkeit aus. Die festgestellten Allelzahlen lassen auf eine hohe genetische Diversität der Populationen bzw. der Art schließen. Die gute Eignung der Marker wird durch die Ergebnisse des Assignment-Tests bestätigt.

Für **Miesmuscheln** war zwar eine Charakterisierung des Ist-Zustandes der Allelzusammensetzung der ausgewählten Populationen möglich, diese ist aber im Vergleich zum Brassen deutlich schlechter ausgefallen. Als ursächlich wird die überraschend schlechte Cross-Amplifikation der verwendeten Mikrosatellitenprimer angesehen, weswegen nur insgesamt fünf Loci für die Auswertung zur Verfügung standen. Am Locus *Mgµ6* wurde ein polyploides Muster ermittelt, was die Auswertung zudem erschwerte. Die Populationen unterscheiden sich nur in geringem Maße hinsichtlich ihrer Alleldiversität und auch hinsichtlich ihrer genetischen Differenzierung. Die genetische Distanz zwischen den beiden Nordsee-Populationen ist geringer als zwischen den Populationen von Nord-und Ostsee. Die Ostsee-Population ist darüber hinaus aus der einheimischen *M. edulis* und aus Hybriden von *M. edulis* und *M. trossulus* zusammengesetzt.

Die Neuentwicklung von Mikrosatellitenprimern für **Aalmutter** resultierte in der erfolgreichen Nutzung von acht Loci. Auf Basis dieser Untersuchungen konnte eine sehr gute Datenlage zur Charakterisierung der Populationen erarbeitet werden. Bei allen Populationen konnten hohe Diversitätsmaße errechnet werden, was sich bei den Untersuchungen 2010 darin äußerte, dass die im Vorjahr beschriebene Differenzierung zwischen den Nordsee-Populationen und der Ostsee-Population nicht mehr belegt werden konnte. Für keine der untersuchten Populationen konnten Inzucht-Effekte beschrieben werden.

Für die Probenart **Regenwurm** (*Lumbricus terrestris*) konnte trotz einer vergleichsweise geringen Markerzahl eine gute Datenlage zur Charakterisierung der Allelzusammensetzung geschaffen werden. Die Daten belegen, dass die auf fünf Entnahmestellen gesammelten Saartal-Regenwürmer aufgrund privater Allele im Vergleich zu den beiden anderen Populationen als genetisch deutlich diverser charakterisiert werden muss. Bemerkenswert ist, dass zwischen den einzelnen Entnahmestellen des saarländischen Verdichtungsraumes eine genetische Strukturierung besteht, während zwischen den Populationen von Halle und Leipzig keine nennenswerte genetische Differenzierung festgestellt werden konnte. In allen Populationen ist von Inzuchteffekten auszugehen, die aber gegebenenfalls auch durch eine Substrukturierung oder Nullallele zustande kommen können. Aufgrund des Scheiterns der Untersuchungen zur Allelverteilung der Homogenatproben wurden die Arbeiten zum Regenwurm nach Abschluss der Arbeiten 2009 eingestellt. Eine Validierung der Ergebnisse erfolgte daher nicht.

Zur Beantwortung der Frage, ob in den letzten beiden Jahrzehnten bereits Veränderungen in der Allelzusammensetzung der UPB-Populationen aufgetreten sind, wurden die UPB-Homogenate mit identischen Methoden retrospektiv untersucht. Die populationsgenetische Analyse der Brassen-Homogenate bestätigte hinsichtlich Diversität und Distanzmaße im Wesentlichen die Ergebnisse der Individualanalyse. Bezüglich der Hypothese einer gerichteten Allelveränderung über die Zeitachse von 17 Jahren (ca. 5 Generationen) konnte dies weder auf Basis der Auswertung einzelner Loci noch bei der Gesamtbetrachtung der Loci festgestellt werden. Bei den Veränderungen in der Allelverteilung über die betrachteten Jahre handelt es sich in allen Fällen um einen Wegfall oder ein Hinzukommen einzelner Allele, die im Folgejahr meist wieder ausgeglichen wurde. Die festgestellten Veränderungen waren somit nicht gerichtet, sondern sind auf die genetische Diversität der Populationen und die dadurch bedingte Variabilität der Stichprobe zurückzuführen. Da sich die Homogenatproben aus 20 Tieren zusammensetzen, bei der Individualanalyse aber jeweils 30 Tiere pro Population untersucht wurden, ist das Fehlen seltener Allele im Homogenat aus rein statistischer Sicht erklärbar. Letztlich führt der Verlust an seltenen Allelen im Homogenat zu einer "Vereinheitlichung" aller untersuchten Homogenatproben und resultiert in einer relativ hohen Ähnlichkeit in der Allelverteilung. Dies gilt sowohl für die Homogenate einer Probenahmefläche über die Zeit als auch für die Homogenate verschiedener Probenahmeflächen.

Die Analyse der **Miesmuschel-Homogenate** (ca. 6-7 Generationen) erfolgte auf Basis von vier Loci. Diese Markerzahl ist als nicht ausreichend zu bewerten, um eine statistisch abgesicherte Charakterisierung der Homogenate treffen zu können. Die anzunehmende Triploidie der Muscheln erschwerte zudem eine weitergehende Interpretation der Daten. Aus den ermittelten Daten war keine gerichtete Veränderung in den Allelzusammensetzungen der Populationen ableitbar. Die Ergebnisse des als "Klima-Marker" interpretierbaren Locus *Me15/16* belegen auch für die Homogenatproben, dass bisher keine klimatisch bedingte Introgression der Mittelmeer-Schwesterart in die Nordsee-Populationen nachweisbar ist.

Bei der Analyse der **Aalmutter-Homogenate** wurde mit Hilfe der neu entwickelten Aalmutter-Mikrosatellitenprimern eine wesentlich bessere Auswertbarkeit der Elektropherogramme erzielt als bei den übrigen Homogenatuntersuchungen. Die Gleichverteilung der nachgewiesenen Allele führte jedoch zu sehr hohen Ähnlichkeitsmaßen zwischen den untersuchten Homogenatproben. Unterstrukturierungen, wie beispielsweise eine Differenzierung von Nord- und Ostsee-Proben, war auf der Grundlage dieser Daten nicht möglich. Gerichtete Entwicklungen in der Allelzusammensetzung der Homogenate über 17 Jahre (ca. 7 Generationen) konnten ebenfalls für keine Population nachgewiesen werden.

Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Assay-Optimierung beim Regenwurm und Problemen in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war auf Basis der zur Verfügung stehenden Marker keine Auswertung der **Regenwurm-Homogenatproben** möglich. Aus diesem Grund wurden in einem zusätzlichen Schritt Mikrosatellitenprimer von *Aporrectodea longa* auf Cross-Amplifikation getestet. Da diese nicht den gewünschten Erfolg brachten, wurden die Arbeiten zum Regenwurm nicht fortgeführt.

Neben der Charakterisierung der Populationen durch die Individualanalyse und die retrospektive Erfassung der Allelzusammensetzung auf Basis der Homogenatuntersuchungen ermöglichen die in Form von **Brassen-Blutplasmen** vorliegenden Einzelproben eine rückschauende Betrachtung von Veränderungen in der Allelzusammensetzung auf Individuenebene. Da Brassen-Blutplasma als

einzige UPB-Matrix als Individual-Archivprobe zur Verfügung steht, besitzen diese Proben bedeutenden "Bindegliedcharakter". Sie ermöglichen einen längerfristigen und somit detaillierten Vergleich von Homogenat- und Individualproben, was eine tiefergehende Interpretation der gewonnenen Daten erlaubt. Die an insgesamt 420 gelagerten Brassen-Blutplasmaproben der Jahre 2002 bis 2008 durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sich die untersuchten Jahrgänge der Donau-Probenahmefläche Jochenstein von denen der Elbe- und Saar-Populationen differenzieren lassen, während dies für die beiden Letzteren nur teilweise möglich war. Im Falle von Stichproben von weniger als 20 Plasmaproben pro Probenahmetermin konnten falsche Zuordnungen nicht ausgeschlossen werden. Da unabhängig von der jeweiligen Population zwischen direkt aufeinander folgenden Jahrgängen keine höhere genetische Ähnlichkeit als zwischen willkürlich ausgewählten Jahrgängen nachgewiesen werden konnte, musste die Hypothese einer gerichteten Entwicklung der Allelzusammensetzung über die Zeitachse verworfen werden. Für die betrachteten Zeiträume konnte kein Nachweis einer unter Umständen klimabedingten Allelverschiebung erbracht werden.

Im direkten Vergleich der Ergebnisse des retrospektiven Ansatzes mit Blutplasmaproben mit denen der Homogenatanalyse wird deutlich, dass bezüglich der statistischen Datengrundlage der Ansatz mit Einzelproben aussagekräftiger ist.

Dass in beiden Fällen kein Nachweis von Veränderungen in der Allelzusammensetzung erbracht werden konnte, kann an der fehlenden Sensitivität der Probenarten gegenüber Veränderungen der Umgebungsbedingungen liegen oder aber daran, dass die bisher eingetretenen klimatischen Veränderungen nicht ausreichen, um Effekte auf die genetische Konstitution bzw. die Allelzusammensetzung der einzelnen Populationen zu haben. Letztlich ist aber festzuhalten, dass das Fehlen einer gerichteten Entwicklung in der Allelzusammensetzung gleichzeitig auch bedeutet, dass keine Einschränkung in der Vergleichbarkeit der Probenreihen über die Zeitachse gegeben ist.

Abschließend werden deshalb folgende Ansätze empfohlen:

- Wiederholung der Individualanalyse von den beiden Probenarten Brassen und Aalmuttern in einem konstanten Rhythmus (z.B. 1-fache bis 2-fache Generationsdauer) zur Überprüfung zukünftiger Veränderungen in der Allelzusammensetzung. Für die Probenarten Miesmuschel und Regenwurm werden keine Empfehlungen ausgesprochen, da hier zunächst eine Optimierung der Assays mit unter Umständen artspezifischen Mikrosatellitenprimer erfolgen muss. Sollte dies erfolgt sein, wäre eine tiefer gehende populationsgenetische Betrachtung der Regenwurm-Populationen mit dem Ziel der Überprüfung der Vergleichbarkeit der Probenreihen von größtem Interesse für die UPB.
- Erweiterung des Spektrums: Wie bei der Aalmutter gezeigt werden konnte, ist die Bewertung populationsgenetischer Kenngrößen auf Basis von drei Populationen nur eingeschränkt möglich.
   Für weiterführende Untersuchungen empfiehlt sich die Verwendung von Außengruppen oder, wie beispielsweise beim Brassen, die zusätzliche Berücksichtigung weiterer Probenahmeflächen.
- Für Studien, die neben populationsgenetischen auch Fragen zu Immunreaktionen oder hormonellen Wirkungen beantworten sollen, ist die Verwendung geeigneter Einzelproben essenziell. Aus diesem Grund wird empfohlen, von ausgewählten Probenarten, Probenahmeflächen und Zeitreihen zukünftig neben den Routine-Homogenaten standardmäßig Einzelproben in Form von Teilproben (Gewebeproben und/oder DNA-Stammlösungen) für rückwirkende Untersuchungen einzulagern.

# 6 Literatur

- BACKHAUS, F. & SCHLADOT, J.D. (1993): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Miesmuschel (*Mytilus edulis*). In: Umweltbundesamt (1996.): Umweltprobenbank des Bundes – Verfahrensrichtlinien für Probenahme, Transport, Lagerung und chemische Charakterisierung von Umwelt- und Human-Organproben. Erich Schmidt Verlag, Berlin.
- BEAUMONT, A.R. & KELLY, K.S. (1989): Production and growth of triploid *Mytilus edulis* larvae. J Shellfish Res 10: 1-18.
- BEAUMONT, A.R. & FAIRBROTHER, J.E. (1991): Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. *J Exp Mar Biol Ecol* 132: 69-84.
- BEAUMONT, A.R.; HAWKINS. M.P.; DOIG, F.L.; DAVIES, I.M. & SNOW, M. (2008): Three species of Mytilus and their hybrids identified in a Scottish Loch: natives, relicts and invaders? J Exp Mar Biol Ecol 367: 100-110.
- BIERNE, N.; DAVID, P.; LANGLADE, A. & BONHOMME, F. (2002): Can habitat specialisation maintain a mosaic hybrid zone in marine bivalves? *Marine Ecology Progress Series* 245: 157-170.
- BIERNE, N.; BORSA, P.; DAGUIN, C.; JOLLIVET, D.; VIARD, F.; BONHOMME, F. & DAVID, P. (2003): Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology* 12: 447-461.
- BRAKE J.; DAVIDSON, J. & DAVIS, J. (2004): Field observations on growth, gametogenesis, and sex ratio of triploid and diploid *Mytilus edulis*. *Aquaculture* 236: 179-191.
- DAGUIN, C. & BORSA, P. (1999): Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 235: 55-65.
- DIMSOSKI, P.; TOTH, G.P. & BAGLEY, M.J. (2000): Microsatellite characterization in central stoneroller *Campostoma anomalum* (Pisces: Cyprinidae). *Molecular Ecology* 9: 2187-2189.
- DUPONT, L. (2009): Perspectives on the application of molecular genetics to earthworm ecology. *Pedobiologia* 52(3):191-205.
- GARDESTRÖM, J; PEREYRA, R.T. & ANDRE, C. (2008): Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis. Conservation Genetics* 9(4): 1003-1005.
- GHASEMI, A.; KEYVANSHOKOOH, S.; SHAHRIARI-MOGHADAM, M.; KHARA, H. & SOURINEJAD, I. (2007): Genetic comparison of Iranian and Azeri populations of the oriental bream *Abramis brama orientalis* (Berg) using microsatellites. *Aquaculture Research* 38(16): 1742-1746.
- GOSLING, E.; DOHERTY, S. & HOWLEY, N. (2008): Genetic characterization of hybrid mussel (*Mytilus*) populations on Irish coasts. *J Mar Biol Assoc UK* 88: 341-346
- GOUDET, J. (1995) FSTAT Version 1.2: A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- HAMILTON, P.B. & TYLER, C.R. (2008): Identification of microsatellite loci for parentage analysis in roach *Rutilus rutilus* and eight other cyprinid fish by cross-species amplification, and a novel test for detecting hybrids between roach and other cyprinids. *Molecular Ecology Resources* 8: 462-465.

- HARPER, G.L.; CESARINI, S. & CASEY, S.P. (2006). Microsatellite markers for the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Molecular Ecology Notes* 6(2): 325-327.
- HOLMEN, J.; VOLLESTAD, L.A.; JAKOBSEN, K.S. & PRIMMER, C.R. (2005): Cross-species amplification of zebrafish and central stoneroller microsatellite loci in six other cyprinids. *Journal of Fish Biology* 66: 851-859.
- HUBISZ, M.J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M. & PRITCHARD, J.K. (2009): Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Res* 9(5). 1322-1332.
- INOUE, K.; WAITE, J.H.; MATSUOKA, M.; ODO, S. & HARAYAMA, S. (1995): Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*. *Biol Bull* 189: 370-375.
- KLEIN, R.,; BARTEL, M.; PAULUS, M.; QUACK, M.;TARRICONE, K.; TEUBNER, D. & WAGNER, G. (2010): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Brassen (*Abramis brama*). http://www.umweltprobenbank.de/upb\_static/fck/download/SOP\_Brassen.pdf
- KLEIN, R.,; BARTEL, M.; PAULUS, M.; QUACK, M.; TARRICONE, K.; TEUBNER, D. & WAGNER, G. (2010 Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Aalmutter (*Zoarces viviparus*).http://www.umweltprobenbank.de/upb\_static/fck/download/SOP\_Aalmutter.pdf
- KINITZ, T.; QUACK, M.; HOCHKIRCH, A. & VEITH, M. (2011): Isolation and characterization of microsatellite loci for eelpout (*Zoarces viviparus*). (In Vorbereitung für *Mol Ecol Resources*).
- LUTTIKHUIZEN, P.C.; KOHLHAAS, A.; BOL, A. & PIERSMA, T. (2002): *Mytilus galloprovincialis*-type footprotein-1 alleles occur at low frequency among mussels in the Dutch wadden sea. *J Sea Res* 48:241-245
- OLSEN, R.B.; RICHARDSON, K. & SIMONSEN, V. (2002): Population differentiation of eelpout *Zoarces viviparus* in a Danish fjord. *Marine Ecology Progress Series* 227: 97-107.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. (2006): GenAlEx 6 Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- PÖRTNER, H.O.; BERDAL, B.; BLUST, R.; BRIX, O.; COLOSIMO, A.; DE WACHTER, B.; GIULIANI, A.; JOHANSEN, T.; FISCHER, T.; KNUST, R.; LANNIG, G.; NAEVDAL, G.; NEDENES, A.; NYHAMMER, G.; SARTORIS, F.J.; SERENDERO, I.; SIRABELLA, P.; THORKILDSEN, S. & ZAKHARTSEV, M. (2001): Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*). *Continental Shelf Research* 21: 1975-1997.
- PÖRTNER, H.O. & KNUST, R. (2007): Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315(5808): 95-97.
- PRESA, P.; PEREZ, M. & DIZ, A.P. (2002): Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.). *Conservation Genetics* 3: 441-443.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M. & DONNELLY, P.J (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- QUACK, M.; BARTEL, M.; KLEIN, R.; NEITZKE, M.; NENTWICH, K.; PAULUS, M. & WAGNER, G. (2003): Richtlinie zur Probenahme und Probenbearbeitung Regenwurm (*Lumbricus terrestris, Aporrectodea longa*) - Entwurf. http://www.umweltprobenbank.de/upb\_static/fck/ download/Regenwurm.pdf
- QUACK, M. & KOSUCH, J. (2005): Morphologische und genetische Untersuchungen an den Probenarten Miesmuschel (*Mytilus edulis*) und Blasentang (*Fucus vesiculosus*) unter besonderer

Berücksichtigung von Hybridisierungseffekten. Abschlussbericht. Im Auftrag des Umweltbundesamtes. 171 Seiten. (*unveröffentlicht*)

- RADCHENKO, O.A.; CHERESHNEV, I.A.; PETROVSKAYA, A.V.; NAZARKIN, M.V. & CHEGODAEVA, E.A. (2008): Nucleotide sequence variation of the mitochondrial COI gene in several eelpout species of the genus Zoarces (Zoarcidae, Pisces). *Russian Journal of Genetics* 44(7): 799-807.
- RAWSON, P.D.; JOYNER, K.L.; MEETZE, K. & HILBISH, T.J. (1996): Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex. *Heredity* 77: 599-607.
- RODERUS D. (2010): Genetische Folgen rezenter Arealexpansion: Strukturierung der Orpheusspötter-Population (*Hippolais polyglotta*) am nordöstlichen Arealrand. Diplomarbeit, Universität Trier. 69 Seiten.
- SHIMODA, N.; KNAPIK, E.W.; ZINITI, J.; SIM, C.; YAMADA, E.; KAPLAN, S.; JACKSON, D.; DE SAVAGE, F.; JACOB, H. & FISHMAN, M.C. (1999): Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* 58: 219-232.
- SUCHANEK, T.H.; GELLER, J.B.; KREISER, B.R. & MITTON, J.B. (1997): Zoogeographic distributions of the sibling species *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) and their hybrids in the North Pacific. *Biol Bull* 193: 187-194.
- TALLMON, D.A.; KOYUK, A.; LUIKART, G. & BEAUMONT, M.A. (2008): ONeSAMP A program to estimate effective population size using approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology Resources* 8: 299-301.
- Umweltbundesamt (2008): Umweltprobenbank des Bundes Konzeption. Berlin, 2008. URL: http://www.umweltprobenbank.de/upb\_static/fck/download/Konzeption\_Okt\_2008\_de.pdf
- VELAVAN, T.P.; SCHULENBURG, H. & MICHIELS, N.K. (2007): Development and characterization of novel microsatellite markers for the common earthworm (*Lumbricus terrestris* L.). *Molecular Ecology Notes* 7(6): 1060-1062.
- WILTSHIRE, K.H. & MANLY, B.F.J. (2004): The warming trend at Helgoland Roads, North Sea: Phytoplankton response. *Helgol Mar Res* 58: 269-273.
- ZAKHARTSEV, M.V.; DE WACHTER, B.; SARTORIS, F.J.; PÖRTNER, H.O. & BLUST, R. (2003): Thermal physiology of the common eelpout (*Zoarces viviparus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 173(5): 365-378.

# Anhang

Anhang 1: Allelfrequenzen Brassen (*Abramis brama*) 2009 über alle Loci Anhang 2: Allelfrequenzen Brassen (*Abramis brama*) 2010 über alle Loci Anhang 3: Allelfrequenzen Brassen-Blutplasma (*Abramis brama*) 2002-2008 über alle Loci Anhang 4: Allelfrequenzen Miesmuschel (*Mytilus* spec.) 2009 über alle Loci Anhang 5: Allelfrequenzen Miesmuschel (*Mytilus* spec.) 2010 über alle Loci Anhang 6: Allelfrequenzen Almutter (*Zoarces viviparus*) 2009 über alle Loci Anhang 7: Allelfrequenzen Aalmutter (*Zoarces viviparus*) 2010 über alle Loci Anhang 8: Allelfrequenzen Regenwurm (*Lumbricus terrestris*) 2009 über alle Loci Anhang 9: 0/1-Matrix der Homogenatproben Brassen (*Abramis brama*) über alle Loci Anhang 10: 0/1-Matrix der Homogenatproben Miesmuschel (*Mytilus* spec.) über alle Loci

Locus	Allele	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Rhca20	N	30	30	24
	104	0,433	0,583	0,833
	106	0,567	0,417	0,167
Rru3	N	30	30	24
	151	0,000	0,000	0,021
	157	0,267	0,033	0,104
	161	0,000	0,017	0,042
	163	0,183	0,267	0,167
	165	0,483	0,533	0,500
	167	0,067	0,150	0,146
	169	0,000	0,000	0,021
Lid1	Ν	30	30	23
	244	0,033	0,183	0,000
	248	0,017	0,083	0,043
	250	0.000	0.000	0.130
	252	0.000	0.033	0.022
	254	0.267	0.417	0.283
	258	0.117	0.000	0.043
	260	0.300	0.183	0.065
	262	0.067	0.033	0.087
	264	0.000	0.017	0.000
	266	0.033	0.000	0.065
	268	0,167	0.050	0.261
Ca1	N	29	30	24
	96	0.000	0.000	0.021
	98	0.000	0.000	0.042
	100	0.293	0.367	0.396
	102	0.017	0.067	0.229
	104	0.017	0.017	0.083
	110	0.638	0.467	0.083
	116	0.000	0.000	0.104
	118	0.000	0.000	0.042
	120	0.034	0.050	0.000
	122	0.000	0.033	0.000
CvpG24	N	27	23	21
	168	0.000	0.043	0.000
	172	0,074	0,217	0,024
	184	0.204	0.130	0.119
	188	0.426	0.261	0.405
	190	0,278	0,152	0,095
	192	0,019	0,196	0,238
	194	0,000	0,000	0,024
	196	0,000	0,000	0,024
	206	0,000	0,000	0,071
Z21908	N	25	26	19
	146	0,620	0,596	0,605
	148	0.000	0.096	0,132
	150	0.380	0,135	0,184
	154	0,000	0,000	0,053
	158	0.000	0.000	0.026

Anhang 1: Allelfrequenzen Brassen (Abramis brama) 2009 über alle Loci

	178	0,000	0,077	0,000
	182	0,000	0,038	0,000
	186	0,000	0,058	0,000
CypG27	N	27	28	23
••	278	0,000	0,018	0,000
	282	0,000	0,036	0,000
	286	0,056	0,000	0,348
	290	0,019	0,054	0,174
	294	0,037	0,036	0,043
	298	0,056	0,143	0,043
	302	0,000	0,054	0,022
	304	0,000	0,018	0,000
	306	0,130	0,125	0,087
	308	0,000	0,018	0,000
	310	0,074	0,071	0,065
	314	0,222	0,071	0,022
	318	0,241	0,107	0,043
	320	0,000	0,018	0,000
	322	0.019	0.071	0.043
	326	0.093	0.054	0.065
	330	0.019	0.054	0.022
	334	0.019	0.036	0.000
	336	0.019	0.000	0.000
	338	0.000	0.018	0.022
CvpG30	N	30	30	24
-77	165	0.017	0.000	0.021
	167	0.067	0.033	0.083
	171	0,000	0,000	0.021
	175	0.067	0.033	0.042
	179	0.000	0.017	0.063
	181	0.017	0.000	0.000
	183	0.117	0.083	0.063
	187	0.000	0,000	0.021
	191	0,000	0,100	0.000
	195	0,000	0.017	0,104
	199	0.017	0.017	0 167
	203	0.033	0,000	0.021
	207	0,000	0.017	0.042
	211	0,200	0.183	0.063
	215	0.017	0.017	0.042
	219	0 117	0 117	0.063
	213	0.083	0.083	0.021
	223	0.050	0.083	0.021
	221	0,000	0.067	0,021
	235	0,000	0.067	0,000
	200	0,000	0.007	0,000
	203	0,000	0,000	0,000
	240	0,000	0,017	0,042
Lida	200 N	20	0,000 <b>27</b>	0,0∠1 <b>22</b>
100	112	0.292	0.149	0.227
	113	0,000	0.027	0,227
	117	0,000	0.010	0,023
	123	0.202	0,019	0,159
	127	0,303	0,210	0,109

129	0,117	0,352	0,114
131	0,000	0,000	0,114
133	0,083	0,167	0,205

Locus	Allele	Güdingen	Hamburg	Jochenstein
Ca1	N	30	30	30
	94	0,000	0,000	0,017
	96	0,000	0,000	0,150
	98	0,067	0,017	0,017
	100	0,317	0,283	0,433
	102	0,000	0,083	0,217
	104	0,017	0,000	0,100
	108	0,000	0,000	0,017
	110	0.600	0.567	0.000
	116	0.000	0.017	0.033
	118	0.000	0.000	0.017
	120	0.000	0.017	0.000
	122	0,000	0.017	0,000
CvpG24	N	30	30	30
-,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	172	0.067	0.033	0.017
	172	0.033	0,000	0,000
	182	0,000	0,100	0,050
	184	0,000	0,035	0.017
	186	0,000	0,017	0.067
	188	0,000	0,100	0,007
	100	0,000	0,130	0,030
	190	0,117	0,200	0,067
	192	0,030	0,217	0,007
	194	0,000	0,150	0,050
	190	0,000	0,000	0,083
	196	0,000	0,000	0,083
0	200	0,000	0,000	0,017
CypG27	N 070	30	30	30
	278	0,017	0,033	0,000
	286	0,050	0,033	0,100
	290	0,033	0,033	0,200
	294	0,033	0,017	0,050
	298	0,000	0,117	0,083
	302	0,017	0,100	0,100
	306	0,217	0,117	0,150
	310	0,083	0,150	0,017
	314	0,083	0,117	0,067
	318	0,167	0,067	0,133
	322	0,050	0,083	0,017
	326	0,183	0,083	0,017
	330	0,067	0,050	0,067
CypG30	N	30	30	30
	167	0,050	0,017	0,033
	169	0,000	0,033	0,017
	171	0,000	0,017	0,000
	173	0,000	0,017	0,000
	175	0,017	0,000	0,017
	179	0,000	0,050	0,033
	183	0,167	0,083	0,100
	185	0,000	0,000	0,017
	187	0.017	0.000	0.033

Anhang 2: Allelfrequenzen Brassen (Abramis brama) 2010 über alle Loci

	191	0,000	0,067	0,017
	195	0,000	0,033	0,100
	197	0,017	0,000	0,000
	199	0,000	0,017	0,300
	203	0,000	0,000	0,050
	207	0,167	0,083	0,033
	211	0,133	0,083	0,050
	215	0,117	0,083	0,083
	219	0,083	0,100	0,050
	223	0,050	0,117	0,000
	227	0,017	0,083	0,033
	231	0,083	0,017	0,000
	235	0,083	0,033	0,017
	239	0,000	0,067	0,017
Lid1	N	30	30	30
	244	0,000	0,033	0,017
	246	0,000	0,000	0,017
	248	0,000	0,167	0,033
	250	0,000	0,000	0,217
	252	0,000	0,017	0,000
	254	0,300	0,550	0,300
	258	0,083	0,033	0,000
	260	0,383	0,083	0,083
	262	0,083	0,017	0,150
	266	0,017	0,033	0,050
	268	0,133	0,067	0,133
Lid8	N	30	30	30
	113	0,350	0,150	0,383
	117	0,067	0,250	0,000
	123	0,000	0,033	0,150
	127	0,417	0,183	0,150
	129	0,150	0,183	0,067
	131	0,000	0,000	0,033
	133	0,017	0,200	0,217
Rhca20	N	30	30	30
	102	0,533	0,633	0,883
	104	0,467	0,367	0,117
Z21908	N	30	30	30
	144	0,000	0,033	0,033
	146	0,367	0,533	0,317
	148	0,000	0,067	0,000
	150	0,383	0,233	0,250
	154	0,000	0,000	0,033
	156	0,000	0,000	0,017
	158	0,000	0,000	0,017
	162	0,250	0,117	0,333
	182	0,000	0,017	0,000

Anhang 3: Allelfrequenzen Brassen-Blutplasma (Abramis brama) 2002-2008 über alle Loci

Diese Tabelle ist aufgrund ihrer Größe hier nicht abgebildet, wird aber auf Nachfrage gerne nachgereicht.

Locus	Allele	Sylt	Jadebusen	Darßer Ort
Me15/16	N	30	28	30
	168	0,000	0,000	0,100
	180	1,000	1,000	0,900
Mgµ3	N	26	25	28
	135	0,019	0,040	0,000
	136	0,000	0,000	0,018
	140	0,058	0,020	0,000
	141	0,000	0,040	0,018
	142	0,635	0,580	0,750
	143	0,192	0,200	0,089
	144	0,096	0,100	0,054
	145	0,000	0,020	0,054
Maus	146	0,000	0,000	0,018
wgµs	N 104	28	28	30
	124	0,018	0,000	0,050
	126	0,143	0,232	0,117
	128	0,232	0,125	0,117
	130	0,089	0,036	0,000
	132	0,000	0,054	0,150
	104	0,200	0,393	0,417
	130	0,190	0,107	0,150
	130	0,030	0,030	0,000
Mauß	140 N	0,000	0,018	0,000
wgµo	10/	0.017	0.000	0.017
	194	0,017	0,000	0,017
	190	0,100	0,030	0,150
	200	0,107	0,077	0,007
	200	0,000	0,038	0,050
	202	0,000	0,000	0.083
	204	0,350	0,110	0,000
	208	0.067	0.038	0,150
	210	0.067	0.038	0.050
	212	0.000	0.096	0.000
	214	0.033	0.000	0.017
	216	0.017	0.077	0.067
	218	0,017	0,000	0,017
	220	0,067	0,115	0,000
	226	0,000	0,000	0,017
MT203	N	30	26	30
	173	0,000	0,038	0,000
	174	0,117	0,135	0,200
	175	0,333	0,288	0,350
	176	0,100	0,058	0,000
	177	0,067	0,038	0,000
	178	0,000	0,019	0,000
	179	0,050	0,077	0,017
	180	0,100	0,058	0,000
	181	0,167	0,019	0,217
	183	0,017	0,019	0,033
	184	0,000	0,000	0,033
	185	0,017	0,000	0,000
	186	0,000	0,019	0,017
	187	0,017	0,019	0,000
	188	0,000	0,000	0,017
	189	0,017	0,135	0,067
	190	0,000	0,038	0,017
	194	0,000	0,000	0,033
	198	0,000	0,019	0,000
	204	0.000	0.019	0.000

Anhang 4: Allelfrequenzen Miesmuschel (Mytilus spec.) 2009 über alle Loci

Locus	Allele	Sylt	Jadebusen	Darßer Ort
Me15/16	N	30	30	30
	168	0,000	0,000	0,117
	180	1,000	1,000	0,883
Mgµ3	N	30	30	30
	133	0,017	0,000	0,000
	135	0,000	0,000	0,017
	138	0,000	0,000	0,017
	140	0,017	0,033	0,000
	141	0,017	0,017	0,017
	142	0,667	0,667	0,650
	143	0,183	0,200	0,200
	144	0,050	0,050	0,033
	145	0,017	0,033	0,017
	146	0,000	0,000	0,017
	149	0,033	0,000	0,000
	152	0,000	0,000	0,033
Mgµ5	N	30	30	29
	122	0,017	0,000	0,000
	124	0,067	0,000	0,017
	126	0,133	0,200	0,155
	128	0,167	0,200	0,103
	130	0,067	0,067	0,034
	132	0,083	0,067	0,086
	134	0,183	0,350	0,241
	136	0,233	0,083	0,259
	138	0,033	0,000	0,034
	140	0,017	0,000	0,017
	142	0,000	0,033	0,052
Mgµ6	N	30	30	30
	194	0,000	0,033	0,000
	196	0,150	0,133	0,117
	198	0,083	0,033	0,233
	200	0,117	0,050	0,067
	202	0,083	0,033	0,033
	204	0,033	0,117	0,100
	206	0,117	0,300	0,217
	208	0,083	0,117	0,067
	210	0,117	0,050	0,017
	212	0,000	0,000	0,017
	214	0,050	0,050	0,033
	216	0,033	0,033	0,050
	218	0,017	0,033	0,017
	220	0,117	0,017	0,000
1/20.00	226	0,000	0,000	0,033
MT203	N	30	30	29
	164	0,017	0,000	0,000
	171	0,000	0,033	0,000
	1/4	0,083	0,100	0,086
	1/5	0,250	0,167	0,362
	1/6	0,017	0,017	0,155
	1//	0,183	0,167	0,069
	1/9	0,083	0,033	0,052
	180	0,033	0,017	0,000
	181	0,200	0,200	0,1/2
	182	0,017	0,000	0,034
	183	0,017	0,117	0,000
	185	0,033	0,033	0,000
	187	0,033	0,050	0,017
	189	0,017	0,033	0,034
	190	0,000	0,000	0,017
	191	0,017	0,017	0,000
	197	1 0.000	0.017	1 0.000

Anhang 5: Allelfrequenzen Miesmuschel (Mytilus spec.) 2010 über alle Loci

Locus	Allele	Meldorfer B.	Jadebusen	Darßer Ort
A01_Zvi1	N	30	30	30
	210	0,017	0,017	0,017
	219	0,017	0,000	0,067
	222	0,017	0,000	0,217
	225	0,000	0,000	0,017
	228	0,017	0,000	0,033
	234	0,033	0,017	0,067
	237	0,033	0,033	0,033
	240	0,233	0,317	0,133
	243	0,017	0,050	0,033
	246	0,100	0,050	0,000
	249	0,133	0,100	0,050
	252	0,183	0,150	0,167
	255	0,133	0,133	0,133
	258	0,033	0,083	0,033
	261	0,000	0,033	0,000
	264	0,033	0,000	0,000
	270	0,000	0,017	0,000
B08_Zvi2	N	30	30	30
	259	0,017	0,000	0,000
	261	0,083	0,017	0,017
	267	0,017	0,033	0,000
	269	0,100	0,233	0,350
	271	0,067	0,067	0,000
	273	0,067	0,083	0,000
	275	0,067	0,100	0,017
	277	0,067	0,017	0,083
	279	0,050	0,033	0,083
	281	0,017	0,050	0,050
	285	0,050	0,017	0,000
	287	0,017	0,050	0,017
	289	0,200	0,183	0,183
	291	0,050	0,017	0,083
	293	0,033	0,033	0,033
	295	0,067	0,050	0,000
	297	0,017	0,000	0,017
	299	0,017	0,017	0,067
B10_Zvi1	N	30	30	29
	394	0,033	0,017	0,069
	396	0,033	0,000	0,000
	398	0,000	0,083	0,017
	400	0,267	0,267	0,172
	402	0,100	0,033	0,138
	404	0,017	0,017	0,017
	406	0,000	0,000	0,017
	408	0,283	0,233	0,172
	410	0,017	0,017	0,052
	412	0,100	0,033	0,155
	414	0,033	0,033	0,034
	416	0.050	0 133	0.000

Anhang 6: Allelfrequenzen Aalmutter (Zoarces viviparus) 2009 über alle Loci

	418	0,017	0,067	0,052
	420	0,017	0,033	0,017
	422	0,000	0,017	0,034
	426	0,000	0,000	0,017
	428	0,017	0,017	0,000
	432	0,017	0,000	0,034
C01_Zvi1	N	30	30	30
	233	0,033	0,017	0,017
	235	0,133	0,100	0,133
	237	0,100	0,117	0,333
	239	0,100	0,167	0,117
	241	0,083	0,050	0,017
	243	0,017	0,067	0,000
	249	0.033	0.000	0.017
	253	0.000	0.017	0.000
	255	0.000	0.017	0.000
	257	0.017	0.000	0.000
	261	0.000	0,117	0.000
	263	0.067	0.017	0.000
	265	0.000	0.017	0.017
	267	0.017	0.000	0.033
	269	0.350	0.233	0.317
	271	0,000	0.067	0.000
	273	0.017	0.000	0.000
	275	0.033	0.000	0.000
D01_Zvi1	N	30	30	30
	342	0,933	0,917	0,950
	344	0.033	0.083	0.000
	352	0,017	0,000	0,000
	354	0,000	0,000	0,050
	356	0,017	0,000	0,000
E10 Zvi1	N	30	30	30
_	261	0,633	0,783	0,533
	265	0,150	0,117	0,167
	267	0,133	0,033	0,233
	269	0,083	0,067	0,067
F03_Zvi2	N	30	30	30
	333	0,000	0,000	0,050
	339	0,000	0,067	0,017
	341	0,000	0,017	0,017
	343	0,183	0,167	0,267
	345	0,267	0,267	0,067
	347	0,083	0,117	0,133
	349	0,133	0,050	0,083
	351	0,250	0,200	0,250
	353	0,033	0,050	0,067
	355	0,033	0,033	0,050
	357	0,017	0,033	0,000
H03_Zvi1	N	30	30	30
	181	0,333	0,367	0,433
	182	0,667	0,617	0,567
	184	0,000	0,017	0,000

Locus	Allele	Meldorfer B.	Jadebusen	Darßer Ort
A01_Zvi1	N	30	30	30
_	210	0,033	0,000	0,033
	213	0,000	0,000	0,017
	216	0,000	0,017	0,017
	219	0,033	0,000	0,033
	222	0,017	0,000	0,183
	228	0,050	0,017	0,000
	234	0,017	0,050	0,050
	237	0,017	0,033	0,050
	240	0,200	0,167	0,150
	243	0,083	0,033	0,033
	246	0,050	0,000	0,017
	249	0,117	0,217	0,167
	252	0,217	0,150	0,150
	255	0,083	0,117	0,067
	258	0,067	0,117	0,033
	261	0,000	0,067	0,000
	264	0,017	0,017	0,000
B08 Zvi2	N	30	30	30
	255	0,017	0,000	0,000
	261	0,067	0,067	0,117
	267	0,000	0,017	0,000
	269	0.117	0.200	0.117
	271	0,033	0,050	0,017
	273	0,050	0,067	0,033
	275	0,050	0,150	0,033
	277	0,017	0,050	0,067
	279	0,033	0,067	0,017
	281	0,033	0,000	0,000
	283	0,083	0,067	0,017
	285	0,050	0,000	0,050
	287	0,033	0,017	0,083
	289	0,300	0,167	0,267
	291	0,050	0,000	0,017
	293	0,033	0,033	0,050
	295	0,000	0,033	0,000
	297	0,000	0,017	0,050
	299	0,017	0,000	0,067
	301	0,017	0,000	0,000
B10_Zvi1	N	30	30	30
	394	0,017	0,000	0,017
	396	0,017	0,000	0,000
	398	0,000	0,017	0,000
	400	0,333	0,383	0,317
	402	0,067	0,050	0,117
	404	0,017	0,000	0,033
	408	0,217	0,200	0,183
	410	0,017	0,017	0,083
	412	0,083	0,017	0,067
	414	0.033	0.033	0.017

Anhang 7: Allelfrequenzen Aalmutter (Zoarces viviparus) 2010 über alle Loci
	416	0,067	0,083	0,000
	418	0,017	0,050	0,017
	420	0,017	0,067	0,017
	422	0.017	0.000	0.000
	424	0.017	0.017	0.017
	426	0.000	0.017	0.033
	428	0.000	0.017	0.050
	430	0.017	0.017	0.017
	432	0.050	0.017	0.017
C01 Zvi1	N	30	30	30
•••=	229	0.033	0.000	0.000
	231	0,000	0.017	0.033
	233	0.017	0.033	0,000
	235	0.183	0.083	0,083
	233	0,183	0,003	0,003
	230	0,105	0,103	0,233
	239	0,200	0,105	0,103
	241	0,033	0,030	0,083
	243	0,000	0,017	0,017
	247	0,000	0,000	0,033
	249	0,000	0,000	0,017
	251	0,000	0,017	0,000
	200	0,033	0,000	0,000
	205	0,007	0,133	0,033
	203	0,000	0,017	0,033
	207	0,017	0,033	0,000
	209	0,107	0,103	0,103
	277	0,017	0,017	0,000
	275	0,033	0,033	0,000
	273	0,000	0,000	0,017
DO1 Zvi1	N	30	30	30
D01_2V11	342	0.967	0.917	0.967
	344	0,007	0,067	0,000
	354	0,000	0,007	0,000
	356	0,000	0,017	0,000
E10 Zvi1	N	30	30	30
L10_2V11	261	0.533	0.717	0.567
	265	0,555	0,167	0,387
	267	0.067	0.083	0,700
	269	0,007	0,000	0,200
	200	0.033	0,000	0,000
F03 Zvi2	<u> </u>	30	30	30
	327	0.017	0.017	0.000
	333	0,000	0.017	0,000
	335	0,000	0.017	0,000
	339	0.017	0.067	0,000
	3/1	0.017	0,000	0,000
	2/12	0.150	0,000	0.233
	345	0,100	0,300	0,200
	343	0,000	0,100	0,150
	3/0	0.067	0.050	0,130
	351	0.150	0.200	0.250
	353	0,000	0.017	0.100
1	000	3,000	5,017	5,100

	355	0,050	0,067	0,067
	357	0,017	0,017	0,033
	359	0,017	0,000	0,000
H03_Zvi1	Ν	30	30	30
	181	0,350	0,400	0,417
	182	0,633	0,600	0,583
	184	0,017	0,000	0,000

Locus	Allele	Halle	Leipzig	Saartal
LTM163	Ν	28	29	31
	137	0,000	0,000	0,081
	139	0,000	0,000	0,016
	140	0,000	0,000	0,016
	143	0,000	0,000	0,016
	145	0,179	0,293	0,129
	148	0,000	0,000	0,016
	149	0,000	0,000	0,210
	151	0,018	0,000	0,000
	152	0,000	0,000	0,081
	154	0,089	0,052	0,000
	155	0,000	0,000	0,065
	157	0,000	0,155	0,016
	160	0,143	0,310	0,000
	161	0,000	0,000	0,016
	163	0,304	0,069	0,000
	164	0,000	0,000	0,161
	167	0,000	0,000	0,065
	169	0,071	0,052	0,000
	172	0,089	0,034	0,016
	173	0,000	0,017	0,000
	174	0,000	0,000	0,016
	175	0,000	0,000	0,016
	178	0,071	0,017	0,000
	181	0,036	0,000	0,000
	193	0,000	0,000	0,016
	196	0,000	0,000	0,016
	202	0,000	0,000	0,016
	209	0,000	0,000	0,016
LTM128	N	28	28	28
	150	0,036	0,161	0,000
	172	0,500	0,304	0,000
	174	0,000	0,000	0,179
	188	0,000	0,000	0,036
	202	0,089	0,000	0,036
	204	0,000	0,000	0,018
	206	0,000	0,000	0,089
	208	0,000	0,036	0,268
	210	0,036	0,232	0,054
	216	0,000	0,000	0,036
	218	0,000	0,000	0,018
	220	0,000	0,000	0,036
	222	0,000	0,000	0,089
	224	0,107	0,214	0,018
	226	0,214	0,054	0,000
	230	0,000	0,000	0,125
	258	0,018	0,000	0,000
LTM193	Ν	12	15	29
	259	0,000	0,267	0,000
	262	0 125	0.067	0.052

Anhang 8: Allelfrequenzen Regenwurm (Lumbricus terrestris) 2009 über alle Loci

	265	0,083	0,000	0,000
	268	0,000	0,000	0,517
	271	0,292	0,233	0,086
	274	0,167	0,067	0,017
	277	0,250	0,267	0,069
	280	0,000	0,033	0,034
	283	0,000	0,000	0,034
	289	0,083	0,067	0,069
	298	0,000	0,000	0,017
	301	0,000	0,000	0,017
	304	0,000	0,000	0,069
	307	0,000	0,000	0,017
LTM165	N	26	27	20
	160	0,000	0,037	0,125
	172	0,077	0,037	0,250
	180	0,000	0,000	0,100
	188	0,038	0,000	0,025
	192	0,000	0,000	0,150
	196	0,115	0,148	0,025
	200	0,019	0,037	0,000
	204	0,038	0,130	0,100
	208	0,038	0,000	0,125
	216	0,000	0,000	0,050
	220	0,000	0,000	0,050
	224	0,135	0,056	0,000
	228	0.538	0.556	0.000

Primer	dq	AHH 93	AHH 94	AHH 95	AHH 96	AHH 97	AHH 98	AHH 99	AHH 00	AHH 01	AHH 02	AHH 03	AHH 04	AHH 05	AHH 06	AHH 07	AHH 08	AGH 92	AGH 94	AGH 95	AGH 96	AGH 97	AGH 98	AGH 99	AGH 00	AGH 01	AGH 02	AGH 03	AGH 04	AGH 05	AGH 06	AGH 07	AGH 08	AJH 02	AJH 03	AJH 04	AJH 05	90 HLA	AJH 07
Ca1	98	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
Ca1	104	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Ca1	106	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Ca1	108	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Ca1	110	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
Ca1	114	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Ca1	116	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
Ca1	118	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Ca1	120	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Ca1	122	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG24	166	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG24	168	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
CypG24	170	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
CypG24	172	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
CypG24	174	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG24	182	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
CypG24	186	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CypG24	190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
CypG24	192	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
CypG24	194	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG24	196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CypG30	155	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CypG30	159	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG30	161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG30	163	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
CypG30	165	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
CypG30	167	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
CypG30	169	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG30	171	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
CypG30	173	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
CypG30	175	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
CypG30	177	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang 9: 0/1-Matrix der Homogenatproben Brassen (Abramis brama) über alle Loci

CypG30	179	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
CypG30	183	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CypG30	187	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
CypG30	189	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG30	191	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CypG30	195	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
CypG30	199	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
CypG30	203	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0
CypG30	205	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CypG30	207	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
CypG30	211	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
CypG30	215	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CypG30	219	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
CypG30	223	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
CypG30	225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
CypG30	227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
CypG30	231	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
CypG30	235	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1
CypG30	239	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
CypG30	243	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Lid1	242	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lid1	244	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
Lid1	246	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1
Lid1	248	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
Lid1	250	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
Lid1	256	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
Lid1	258	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
Lid1	260	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lid1	262	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Lid1	264	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
Lid1	266	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Lid1	268	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lid8	111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lid8	115	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Lid8	117	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Lid8	121	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
Lid8	123	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lid8	125	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Lid8	129	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lid8	131	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Lid8	133	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
Lid8	135	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
RhCa20	106	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
Rru3	157	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rru3	161	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
Rru3	167	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
Z21908	136	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z21908	142	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z21908	144	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Z21908	146	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Z21908	148	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Z21908	150	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Z21908	152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
Z21908	154	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Z21908	156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Z21908	160	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Z21908	176	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z21908	180	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Z21908	182	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Z21908	184	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
Z21908	186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Z21908	188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1

Primer	dq	MJH 85	MJH 86	MJH 88	06 HCM	MJH 92 MJH 93	MIH 94							M.IH 01	MJH 02	MJH 03	MJH 04	30 HLM	90 HLM	70 HLM	80 HLM	<b>MSH 86</b>	MSH 88	MSH 90	MSH 92	MSH 93	MSH 94	MSH 95		MSH 9/		MSH 00	MSH 01	MSH 02	MSH 03	MSH 04	MSH 05	MSH 06	MSH 07		MDH 93	MDH 95	MDH 96	MDH 98	MDH 99	MDH 00	MDH 01	MDH 02	MDH 03	MDH 04	MDH 05	MDH 06	MDH 07	MDH 08
Me15/16	168	0	0	0	0	0 0	0	) (	) (	0 (	0 0	0	) (	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	)	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Me15/16	180	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ3	141	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ3	143	0	0	0	0	0 0	0		) (	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0 0	5	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mgµ5	126	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ5	128	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ5	130	1	1	0	1	1 0	0	) 1	1	1	1 1	0	) 1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1 1	1	0 1	1	0	0	0	0	1	1	1 0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
Mgµ5	132	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ5	134	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ5	136	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ5	138	0	0	0	1	1 0	0	) 1	1 (	0	1 1	0	) (	) 0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0 1	1	0 1	1	0	0	0	0	0	0 (	0 0	) 1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0
Mgµ5	140	0	0	0	0	1 0	0		) (	0 0	0 0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	5	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	192	0	0	0	0	0 0	0		) (	0 0	0 0	) 0	) (	) 0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	)	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	194	0	0	0	0	0 0	0		0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0 0	5	0 0	0	0	1	0	0	0	0 (	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	196	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	0	) 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1 (	5	1 1	1	1	0	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ6	198	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ6	200	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1 (	)	0 0	) 1	1	1	1	1	0	1	1 1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
Mgµ6	202	0	0	0	0	0 0	0		0 0	0 0	0 0	) 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0 1	1	1 1	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	204	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ6	206	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1 (	5	0 1	1	1	0	1	1	1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Mgµ6	208	0	0	0	0	0 0	0		) (	0 0	0 0	0	) 1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0 1	1	1 1	1	1	1	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	210	1	0	0	0	0 0	) 1	1 (	) (	0	1 1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 1	1	1 1	1	1	1	0	0	1	0	1 0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Mgµ6	212	0	0	0	0	0 0	0		0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0 0	5	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	214	0	0	0	0	0 0	0		0 0	0 0	0 0	) 1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1 (	0 1	1	1 1	1	0	1	0	0	1	1 (	0 0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
Mgµ6	216	1	1	0	1	1 1	1	1 1	1 (	0	1 0	) 1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	0	1	1	0	1 0	) 1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mgµ6	218	0	0	0	0	0 0	0		) (	0 0	0 0	) 1	0	) 0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0 0	)	0 0	0	1	1	0	0	0	0 (	0 0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
Mgµ6	220	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1 (	0	1 1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1 1	1	1 1	1	1	1	1	1	1	0	1 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	224	0	0	0	0	0 0	0	) (	) (	0 (	0 0	) 0	) (	) 0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 0	0	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	226	0	0	0	0	0 0	0	) (	) (	0 0	0 0	) ()	) (	) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0 0	0	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mgµ6	228	0	0	0	0	0 1	C		) (	0 0	0 0	) 1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0 0	0	0 0	0	0	0	0	0	0	0 0	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang 10: 0/1-Matrix der Homogenatproben Miesmuschel (Mytilus spec.) über alle Loci

Primer	dq	ZBH92	ZBH93	ZBH94	ZBH95	ZBH96	ZBH97	ZBH98	ZBH99	ZBH00	ZBH02	ZBH03	ZBH04	ZBH05	ZBH06	ZBH07	ZBH08	ZDH94	ZDH95	2DH96	ZDH98	2DH99	ZDH00	ZDH01	ZDH02	ZDH03	ZDH04	ZDH05	ZDH06	ZDH07	ZDH08	ZJH94	ZJH95	20H96	ZJH97	ZJH98	21H99	2JH00	ZJH01	ZJH02	ZJH03	ZJH04	ZJH05	ZJH06	ZJH07
H03	181	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H03	182	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E10	261	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E10	265	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E10	267	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E10	269	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D01	342	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D01	344	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
D01	354	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C01	227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C01	229	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
C01	231	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	233	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	235	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	237	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	239	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	241	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	243	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
C01	245	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C01	255	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
C01	257	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
C01	259	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
C01	261	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
C01	263	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	265	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	267	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	269	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C01	271	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
B08	253	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	255	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B08	257	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
B08	259	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1

Anhang 11: 0/1-Matrix der Homogenatproben Aalmutter (Zoarces viviparus) über alle Loci

B08	261	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	263	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
B08	265	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
B08	267	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	271	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	273	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
B08	275	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	277	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	279	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
B08	281	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
B08	283	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
B08	285	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	287	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	289	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	291	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B08	293	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
B08	295	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
B08	297	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
B08	299	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B08	301	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
B10	392	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B10	394	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
B10	396	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
B10	398	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	402	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	404	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	406	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	408	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	412	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	414	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	416	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	418	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B10	420	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
B10	422	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
B10	424	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0

B10	426	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
B10	428	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
B10	430	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0
B10	432	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
A01	210	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
A01	213	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A01	216	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A01	219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A01	222	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	225	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A01	228	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
A01	234	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
A01	237	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	243	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	246	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	249	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	252	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	255	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	258	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A01	261	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
A01	264	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
A01	267	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A01	270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F03	339	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F03	341	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F03	343	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F03	345	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F03	347	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F03	349	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F03	351	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F03	353	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
F03	355	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
F03	357	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F03	359	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0