

**Markus Langer**

**Vom Fachbereich VI  
(Geographie/Geowissenschaften)  
der Universität Trier**

**zur Verleihung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte Dissertation**

**Einfluss von Flächennutzung auf die genetische  
Variabilität und genetische Populationsstruktur von  
*Arion lusitanicus* Mabilie (Gastropoda, Pulmonata)**

Betreuer: Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Paul Müller  
Berichterstattender: Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Paul Müller  
Berichterstattende: apl. Prof. Dr. Mechthild Neitzke

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 08.07.2003

Trier, 2003

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Kartenverzeichnis.....	VIII
Verzeichnis des Anhangs.....	VIII
1. Einleitung und Problemstellung.....	1
2. Habitatmerkmale von Ackerstandorten .....	4
3. Untersuchungs- und Referenzgebiete.....	5
3.1 Untersuchungsgebiet Herl.....	6
3.1.1 Untersuchungsflächen.....	6
3.2 Referenzgebiet Wahlen.....	9
3.3 Referenzgebiet Belm.....	12
4. Verbreitung und Biologie von <i>Arion lusitanicus</i> .....	13
4.1 Systematik und Taxonomie.....	13
4.2 Artbeschreibung.....	14
4.3 Verbreitung.....	14
4.4 Lebenszyklus.....	15
4.5 Ökologische Ansprüche.....	16
5. Flächennutzung und Bewirtschaftungssysteme.....	17
5.1 Vergleich der Bewirtschaftungssysteme.....	17
5.1.1 Begriffsbestimmung: Konventionelle Landwirtschaft.....	17
5.1.2 Begriffsbestimmung: Biologische Landwirtschaft.....	19
5.2 Beschreibung der Landbewirtschaftung auf den Untersuchungs- flächen.....	20
5.2.1 Nutzungsintensität auf der Fläche „Wiese“.....	21
5.2.2 Nutzungsintensität auf den konventionell bewirtschafteten Flächen.....	21
5.2.2.1 Chemischer Pflanzenschutz auf den konventionell bewirtschafteten Flächen.....	22
5.2.3 Nutzungsintensität auf den biologisch bewirtschafteten Flächen.....	22
6. Populationsgenetische Analysen.....	23
6.1 Entstehung und Bedeutung genetischer Variation.....	23
6.2 Auswirkungen des Verlustes genetischer Variation .....	26
6.3 Molekulargenetische Analysemethoden.....	27
6.3.1 Randomly-amplified-polymorphic DNA –PCR (RAPD-PCR) .....	27
6.3.1.1 Prinzip und Durchführung der RAPD-PCR..	27

6.3.2 DNA-Mikrosatellitenanalyse.....	29
6.3.2.1 Mikrosatelliten-Mutations-Modelle.....	30
6.3.2.2 Cycle-Sequenzierung.....	31
7. Material und Methoden.....	32
7.1 Schätzung der Dichte von <i>Arion lusitanicus</i> .....	32
7.2 Bioanalytische Methoden.....	33
7.2.1 Puffer und Lösungen.....	33
7.2.2 Geräte.....	33
7.2.3 Kits.....	33
7.2.4 Material für die Mikrosatellitenanalyse.....	34
7.2.5 Material für die Sequenzierung.....	34
7.2.6 Software.....	34
7.2.7 Polymerase.....	34
7.3 Probenahme und Probenaufbereitung.....	35
7.4 RAPD-PCR.....	36
7.4.1 Durchführung der RAPD-PCR.....	36
7.4.2 Primertest der RAPD-Primer.....	36
7.4.3 Verwendete RAPD-Primer.....	37
7.4.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
7.4.5 Datenerfassung.....	38
7.4.6 Auswertebereich.....	38
7.4.7 Molekulargenetische Artunterscheidung zwischen <i>Arion</i> <i>lusitanicus</i> und <i>Arion rufus</i> .....	39
7.5 Mikrosatellitenanalyse.....	39
7.5.1 Test der Mikrosatellitenprimer.....	39
7.5.2 Verwendete Mikrosatellitenprimer.....	41
7.5.3 Mikrosatelliten-PCR.....	42
7.5.4 Kapillarelektrophoretische Fragmentlängendetektion.....	42
7.5.5 Erfassung und Auswertung der Mikrosatellitendaten.....	42
7.5.6 Acrylamid-Gelelektrophorese der HA-7 Mikrosatelliten- Allele.....	43
7.6 Sequenzierung der Mikrosatellitenloci.....	43
7.6.1 Aufreinigung der Mikrosatelliten-PCR-Produkte.....	43
7.6.2 Cycle-Sequencing-PCR.....	44
7.6.3 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	44
7.6.4 DNA-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese.....	45
8. Populationsgenetische Auswertung.....	46
8.1 Genetische Diversität.....	47
8.2 F-Statistik.....	48

8.3 $\Phi$ -Statistik.....	50
8.4 Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	53
8.5 Ähnlichkeitsmaße.....	55
8.6 Genetische Distanzen.....	56
8.7 Test auf "Isolation by distance".....	57
8.8 Clusteranalyse.....	58
8.9 Hauptkomponentenanalyse.....	58
8.10 Diskriminanzanalyse.....	58
9. Ergebnisse.....	59
9.1 Dichteschätzung von <i>Arion lusitanicus</i> .....	59
9.2 RAPD-PCR.....	60
9.2.1 Polymorphiegrad.....	61
9.2.2 Bandsharingrate (BSR).....	63
9.2.3 Genetische Diversität.....	67
9.2.4 Genetische Distanzen.....	68
9.2.5 Populationsunterteilung und Populationsstrukturierung.....	70
9.2.6 Test auf "Isolation by distance".....	74
9.2.7 Hauptkomponentenanalyse.....	77
9.2.8 Diskriminanzanalyse.....	77
9.3 Mikrosatellitenanalyse.....	80
9.3.1 Auswertung des Mikrosatellitenlocus Arin 1.....	80
9.3.2 Auswertung des Mikrosatellitenlocus HA-7.....	85
9.3.3 Ergebnisse beider Loci.....	88
9.3.4 Test auf „Isolation by distance“.....	93
9.3.5 Hierarchische Populationsstruktur mit AMOVA.....	94
9.3.6 Ergebnisse der Sequenzanalyse des Locus Arin1.....	95
9.3.7 Mikrosatelliten-Genotypen.....	96
10. Diskussion.....	100
10.1 Populationsgenetische Studien mit Schnecken.....	100
10.2 Stichprobengröße.....	101
10.3 Diskussion RAPD-Analyse.....	102
10.3.1 Einfluss von Auswertefehlern und Reproduzierbarkeit von RAPD –Daten.....	102
10.3.2 Populationsstrukturierung und genetische Diversität auf Basis der RAPD-Daten.....	103
10.3.3 „Isolation by distance“.....	105
10.3.4 Einfluss der Flächennutzung.....	105
10.4 Diskussion Mikrosatellitenanalyse.....	107
10.4.1 Populationsstrukturierung und genetische Diversität auf	

Basis der Mikrosatelliten-Daten .....	107
10.4.2 Gründereffekt und genetischer Flaschenhals.....	110
10.4.3 "Isolation by distance".....	111
10.4.4 Einfluss der Flächennutzung.....	111
10.5 Vergleich der Ergebnisse der RAPD- und Mikrosatellitenanalyse....	112
10.6 Ausbreitung und Verbreitung.....	113
11. Schlussfolgerungen	116
12. Zusammenfassung.....	117
13. Literatur.....	119
Anhang.....	129

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Luftbild von Herl (Luftbildquelle: H-S-W).....	6
Abbildung 2: Genitalmorphologische Merkmale der Arten <i>Arion ater</i> , <i>Arion rufus</i> und <i>Arion lusitanicus</i> .....	14
Abbildung. 3: Bottleneck-Effekt durch Verkleinerung der Populationsgröße (verändert nach BERRY 1997).....	25
Abbildung 4: Basensequenz der Mikrosatellitenregion des Primerpaares HA-7 f/r .....	41
Abbildung 5: Basensequenz der Mikrosatellitenregion des Primerpaares Arin 1 f/r .....	41
Abbildung 6: Schematische Verbindung zwischen Besiedlungsquelle und „Vorposten“ nach dem Kontinent-Insel-Modell.....	52
Abbildung 7: Schematische Verbindung zwischen verschiedenen Populationen nach dem Insel-Modell.....	52
Abbildung 8: Schematische Verbindung zwischen Populationen nach dem Trittstein-Modell .....	52
Abbildung 9.: Beispielhafte Darstellung eines Agarose-Gels zur Auswertung des RAPD-Primers Roth 270-5 des Standortes „Konv1“.....	60
Abbildung 10: Verteilung der paarweisen BSR aller Individuen auf 10 Gruppen von > 0,80 bis 0,39-0,35.....	63
Abbildung 11: Verteilung der Bandsharingraten „innerhalb der Standorte in Herl, zwischen den Flächen und zwischen den Regionen.....	64
Abbildung 12: Regressionsanalyse: genetische Diversität vs. Geländehöhe (m ü.NN) aller Herler Populationen.....	68
Abbildung 13: UPGMA-Clusterdiagramm, basierend auf den LYNCH & MILLIGAN-Distanzen .....	69
Abbildung 14: UPGMA-Clusterdiagramm, basierend auf der $\Phi$ -Statistik (EXCOFFIER ET AL., 1992).....	71
Abbildung 15. Räumliche Assoziation der auf Basis der $\Phi_{ST}$ -Werte geclusterten Standorte (UPGMA-Degrogramm).....	72
Abbildung 16. Isolation by distance Korrelation aller Untersuchungsstandorte in Herl auf Basis der genetischen Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) .....	75
Abbildung 17. Isolation by distance Korrelation der biologisch bewirtschafteten Untersuchungsstandorte in Herl auf Basis der genetischen Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) .....	76

---

Abbildung 18: Kanonische Diskriminanzfunktion aller untersuchten Standorte, basierend auf den Faktorwerten der Faktorenanalyse.....	78
Abbildung 19: Kanonische Diskriminanzfunktion der biologisch und konventionell bewirtschafteten Flächen, basierend auf den Faktorwerten der Faktorenanalyse.....	79
Abbildung 20: Agarosegel der Amplifikationsprodukte des Primer Arin1 (invertierte Darstellung).....	80
Abbildung 21: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms des Primer Arin1.....	81
Abbildung 22: Clusterdiagramm der $F_{ST}$ -Werte des Locus Arin1.....	84
Abbildung 23: Beispielhafte Darstellung eines Agarose-Gels zur Auswertung des Mikrosatellitenprimers HA-7 des Standortes Konv. 4.	85
Abbildung 24: Clusterdiagramm der $F_{ST}$ -Werte für den Locus HA-7.....	87
Abbildung 25: Clusterdiagramm der $F_{ST}$ -Werte für beide Loci.....	90
Abbildung 26.: Dendrogramm der genetischen Distanzen ( $NEI$ ) für beide Mikrosatellitenloci .....	93
Abbildung 27: Regressionsanalyse zwischen geografischer Distanz und genetischer Distanz nach $NEI$ (1972) beider Mikrosatellitenloci.....	94
Abbildung 28: Elektropherogramm der Mikrosatellitenregion Arin 1.....	95
Abbildung 29: Partielle Sequenz eines Mikrosatelliten-Allels von Primer Arin1.....	95
Abbildung 30: Genotypenverteilung auf den Standorten in Herl.....	97
Abbildung 31: Genotypenverteilung auf den Standorten in Wahlen und Belm.....	98
Abbildung 32: Klinale Abnahme der Genotypenhäufigkeit (BBDD) von Süd nach Nord.....	99
Abbildung 33: Vergleich der genetische Diversität zwischen RAPD-Analyse und Mikrosatellitenanalyse.....	112

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Nutzungen der Untersuchungsflächen in den Jahren 1999-2001.....	22
Tabelle 2: Eigenschaften und Eignung von RAPD-Markern und Mikrosatelliten. ....	28
Tabelle 3: Übersicht über die getesteten RAPD-Primer.....	39
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten RAPD-Primer .....	39
Tabelle 5: Übersicht über die getesteten Mikrosatellitenprimer.....	42
Tabelle 6: PCR-Temperaturprofile der Mikrosatellitenprimer.....	46
Tabelle 7: Erwartete Allel-Häufigkeit eines zwei-Allel-Systems der Genotypen in Hardy- Weinberg-Gleichgewicht.....	54
Tabelle 8: <i>Arion lusitanicus</i> -Dichte an den Untersuchungsstandorten, Flächengröße und Höhe ü. NN.....	61
Tabelle 9: Auswertebereich, Zahl der RAPD-Marker und Polymorphiegrad...	62
Tabelle 10: Übersicht über monomorphe RAPD-Marker .....	63
Tabelle 11: Bandsharingraten innerhalb (Diagonale) und zwischen Standorten .....	67
Tabelle 12: Vergleich der genetischen Diversitäten und deren Rangfolge nach verschiedenen Berechnungsmethoden.....	68
Tabelle 13: Genetische Distanz (LYNCH & MILLIGAN 1994) und Abweichung vom HWG.....	70
Tabelle 14: $\Phi_{ST}$ (unterhalb) und Genfluss (oberhalb der Diagonale).....	71
Tabelle 15: Verteilung der molekularen Varianz auf verschiedenen hierarchischen Ebenen. ....	74
Tabelle 16. Geografische Distanzen zwischen den Untersuchungsflächen in km.....	75
Tabelle 17: Vergleich der Höhe des Genflusses und geografischer Distanz beider Bewirtschaftungssysteme.....	78
Tabelle 18: Populationsgenetische Parameter des Locus Arin1.....	84
Tabelle 19: Paarweise $F_{ST}$ -Werte aller Standorte für den Locus Arin1.....	85
Tabelle 20: Populationsgenetische Parameter des Locus HA-7 .....	87
Tabelle 21: Paarweise $F_{ST}$ -Werte aller Standorte des Locus HA 7.....	88
Tabelle 22: Populationsgenetische Parameter der Loci Arin1 und HA-7.....	90
Tabelle 23: Paarweise $F_{ST}$ -Werte aller Standorte berechnet auf Basis beider Mikrosatellitenloci.....	90
Tabelle 24: $N_e m$ -Werte zwischen den Untersuchungsflächen auf Basis der Mikrosatellitendaten beider Loci.....	92
Tabelle 25.: Nei`s genetische Distanz nach POPGENE (NEI 1972).....	93
Tabelle 26: Verteilung der molekularen Varianz auf verschiedenen hierarchischen Ebenen.....	96
Tabelle 27: Genotypenverteilung .....	99

## Kartenverzeichnis

Karte 1: Lage der Untersuchungsgebiete in Deutschland.....	5
Karte 2: Lage der Untersuchungsflächen in Herl.....	7
Karte 3: Flächennutzung des Untersuchungsgebietes Herl-Thomm im Jahr 2001	8
Karte 4: Lage der Untersuchungsgebiete Herl und Wahlen.....	9
Karte 5: Gebietsausschnitt des Untersuchungsgebietes Wahlen.....	10
Karte 6: Flächennutzung des Untersuchungsgebietes Wahlen im Jahr 2001.....	11
Karte 7: Gebietsausschnitt des Untersuchungsgebietes Belm.....	12
Karte 8: Ungefähres Areal von <i>Arion lusitanicus</i> mit Ausbreitungsrichtung.....	15
Karte 9: Dichte von <i>Arion lusitanicus</i> im Untersuchungsgebiet Herl.....	59

## Verzeichnis des Anhangs

Anhang 1: Frequenzen der RAPD-Marker.....	128
Anhang 2: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Konv1“.....	130
Anhang 3: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Konv2“.....	131
Anhang 4: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Konv3“.....	132
Anhang 5: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Konv4“.....	133
Anhang 6: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Bio1“.....	134
Anhang 7: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Bio2“.....	135
Anhang 8: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Bio3“.....	136
Anhang 9: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Bio4“.....	137
Anhang 10: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Brache“.....	138
Anhang 11: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Wiese“.....	139
Anhang 12: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Wahlen“.....	140
Anhang 13: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Belm“.....	141

## 1. Einleitung und Problemstellung

Evolution ist kein abgeschlossener Prozess. Besonders in agrarisch genutzten Ökosystemen müssen sich Biota an ständig wechselnde Umweltbedingungen anpassen. Voraussetzung für diese Anpassungsfähigkeit ist eine hohe genetische Variabilität. Sind Populationen nicht in der Lage den ständigen Veränderungen durch genetische Veränderung entgegenzuwirken, ist oft das Aussterben der betreffenden Arten und damit ein Verlust von Biodiversität die Folge.

Bei Arten, die aus einer Vielzahl von Subpopulationen bestehen, können Migrationsbarrieren, wie sie durch Landschaftsstrukturen hervorgerufen werden können, durch Verminderung bzw. Unterbindung des Genflusses zu einer Populationsstrukturierung führen. Das Erkennen solcher Barrieren und die Vorhersage ihrer Auswirkungen sind ein wichtiger Forschungsgegenstand der Populationsbiologie (SLATKIN 1985, SORK et al. 1999, WIEGAND et al. 1999).

Die meisten Studien, die sich mit genetischen Austauschprozessen zwischen Teilpopulationen beschäftigen, analysieren die Auswirkungen von Habitatfragmentierungen durch Habitatverlust bei oftmals gefährdeten oder bedrohten Tier- und Pflanzenarten (ALDRICH et al. 1998, GIBBS 1998, VAN DONGEN et al. 1998).

In der aktuellen Diskussion um Artensterben und Biodiversitätsverlust wird zudem oft die intensive Landwirtschaft als ein Faktor benannt, der zum lokalen Aussterben vieler Arten der offenen Feldflur führt.

Der Bestandsrückgang vieler Tier- und Pflanzenarten belegt, dass der Anpassungsprozess in der heutigen Kulturlandschaft nicht immer greift (HENLE et al. 1995). Es wird angenommen, dass Umweltveränderungen bzw. Landschaftswandel zu einer Veränderung der Populationsstruktur und zu einem Verlust von genetischem Polymorphismus führen können, da der Genfluss zwischen einzelnen Teilpopulationen behindert werden kann.

Rückgängen von Arten und Zusammenbrüchen von Populationen stehen inselartige Refugialräume in anderen Regionen gegenüber und führen zu unterschiedlichen Bewertungen des Regenerationsvermögens (MÜLLER et al. 2002). Zahlreiche Flächenmanagementmethoden wurden erprobt, um Kooperationsmodelle zwischen wettbewerbsfähiger Landwirtschaft und Bio-Ressourcenschutz zu erreichen (LYS & NENTWIG 1992, NENTWIG 1988, 1993, LYS 1994, MÜLLER 1995). Deshalb ist es notwendig, die funktionalen Zusammenhänge zwischen Populationsgenetik, Flächennutzung und Taxa-Migration aufzuklären.

Die Landwirtschaft hat auf die (Arten)- Biodiversität einen bedeutenden Einfluss. Die landwirtschaftlich genutzte Fläche nimmt in den meisten Ländern einen Großteil der

Landesfläche ein, auch im hoch industrialisierten Deutschland prägt die Landwirtschaft über 50% der Landesfläche (Daten zur Umwelt, Anonymus).

Seit der Einführung des Ackerbaus in Mitteleuropa hat die Landwirtschaft auch zur Steigerung der Habitat-Vielfalt und damit auch der Biodiversität beigetragen. Viele Taxa der offenen Feldflur würden ohne diese Landschaftseingriffe in Mitteleuropa nicht existieren können.

Die Intensivierung der Landwirtschaft und die Steigerung der Agrarproduktion haben dagegen auch einen negativen Einfluss auf die Biodiversität. Die Landwirtschaft gilt mittlerweile als Hauptverursacher des Artenrückgangs (SUKOPP 1969, 1972, KORNECK & SUKOPP 1988).

Es wäre also viel erreicht, wenn dieser flächenmäßig so bedeutsame Nutzungstyp zukunftsfähiger und nachhaltiger wirtschaften würde. Es stellt sich also generell die Frage, wie man den Landbau unter den ökonomischen Zwängen globalisierter Agrarmärkte umweltfreundlicher und zukunftsfähiger gestaltet, so dass die Agrarökosysteme auch für künftige Generationen dauerhaft funktionsfähig bleiben.

Um die Biodiversität zu erhalten und diese Ressourcen nachhaltig zu nutzen, wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen (LEHMANN et al. 2000). Diese Bestrebungen führten 1992 zur Unterzeichnung der Biodiversitätskonvention (CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, CBD). Ziel der Biodiversitätskonvention ist es, sämtlich Aspekte der Biodiversität abzudecken.

Laut Definition der Biodiversitätskonvention beinhaltet Biodiversität drei Ebenen:

- Ökosystem-Diversität
- Arten-Diversität und
- genetische Diversität

Zu den Themenkomplexen „Ökosystem-Diversität“ und „Arten-Diversität“ sind schon zahlreiche Studien veröffentlicht worden (LETSCHERT 1986, INGRISCH et al. 1989); welchen Einfluss jedoch die Flächennutzung auf die genetische Diversität von Arten hat, ist bisher jedoch kaum bekannt.

In dieser Arbeit sollten also folgende Fragen untersucht werden:

- gibt es einen Zusammenhang zwischen Flächenbewirtschaftung und Populationsdichte?
- hat die Populationsdichte einen Einfluss auf populationsgenetische Faktoren wie Diversität, Drift oder Inzucht?
- tragen bestimmte Bewirtschaftungsformen zur Verbreitung und Ausbreitung von Arten bei?
- gibt es bewirtschaftungsbedingte Ausbreitungshindernisse, die den Genfluss zwischen den Flächen beeinträchtigen können?
- werden durch die Art der Bewirtschaftung bestimmte Genotypen gefördert bzw. dezimiert?
- unterscheidet sich die genetische Diversität zwischen ökologisch und konventionell bewirtschafteten Flächen?

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde als Modellorganismus das Neozoon *Arion lusitanicus* MABILLE 1868 ausgewählt, da *Arion lusitanicus* keine tierschutzrechtlichen Bedenken hervorruft und auf Ackerstandorten mittlerweile beinahe ubiquitär vorhanden ist. Darüber hinaus ist von Vorteil, dass das Alter der recht jungen Population in Herl bekannt ist und somit genetische Veränderungen den aktuell vorherrschenden Bewirtschaftungssystemen oder lokalen Ausbreitungs- und Extinktionsprozessen zugeordnet werden können.

In dieser populationsgenetischen Arbeit soll jedoch nicht auf eine Nützlings- bzw. Schädlingdiskussion eingegangen werden.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereiches „Umwelt und Region“ der Universität Trier durchgeführt und war Bestandteil des Projektes B7 „Veränderungen und Anpassungsprozesse von Tier- und Pflanzenpopulationen in agrar- und forstwirtschaftlich genutzten Ökosystemen der Region Trier“.

Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Taxa untersucht, die sich hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit, Mobilität, Ernährungsweise usw. unterscheiden, wie z.B. *Lumbricidae*, *Microtus spec.* *Caenorhabditis elegans* usw..

## 2. Habitatmerkmale von Ackerstandorten

Äcker sind komplexe Lebensräume, deren floristische und faunistische Diversität stark von der Bodenart und der damit zusammenhängenden Bodenfeuchte und der Intensität der Bewirtschaftung abhängt (TISCHLER 1980, INGRISCH et al. 1989). Auf biologisch bewirtschafteten Flächen wurden bei vielen Insektengruppen höhere Artenzahlen nachgewiesen als auf konventionell bewirtschafteten Flächen (LETSCHERT 1986, OSEAU 1987, INGRISCH et al. 1989). Zu den Ackerzoozöosen Mitteleuropas gehören ca. 2800 bis 3000 Organismenarten, ein Großteil davon sind Wirbellose (ca. 2500 Arten). Die Lebensgemeinschaften haben sich mit dem Vordringen des Ackerbaus seit etwa 5000 Jahren langsam herausgebildet.

Die Arten der offenen Feldflur ertragen bzw. bevorzugen, sofern sie nicht nachtaktiv sind, höhere Durchschnittstemperaturen und Sonneneinstrahlung (BLAB 1993).

Nur diejenigen Arten können auf Ackerbiotopen existieren, deren Entwicklungszyklus an die Dynamik des Lebensraumes angepasst ist. Neben den mikroklimatischen Besonderheiten spielen die Bodenbearbeitung und der Zeitpunkt der Ernte eine überragende Rolle, da bei der Ernte oftmals die gesamte Vegetationsdecke entfernt wird, so dass der kurze Zeitraum von der Ackerbestellung bis zur Ernte die Lebensgemeinschaften prägt. Zu den periodisch wiederkehrenden Bodenbearbeitungsmaßnahmen kommt die wechselnde Fruchtfolge als Herausforderung des Lebensraumes an die Anpassungsfähigkeit der Organismen (BLAB 1993).

Typische Acker- Zoozöosen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur raschen Neubesiedlung des Lebensraumes aus, wenn in erreichbarer Entfernung Refugialräume wie Hecken oder Ackerraine vorhanden sind. Durch die Vergrößerung der Schläge und Beseitigung von Kleinbiotopen wurden jedoch viele dieser Refugialräume beseitigt.

Die Heterogenität der Landschaft durch Einhaltung gewisser Fruchtfolgen und Brachejahren wurde durch die Verfügbarkeit von Pflanzenschutzmitteln und Düngemitteln reduziert. Die Anwendung von Pestiziden erlaubt heute eine sehr einseitige Fruchtfolge (HEYDEMANN & MEYER 1983).

Die Bodenbearbeitung erfolgt heute überwiegend mit landwirtschaftlichen Großgeräten, was die Gefahr der Bodenverdichtung und Verringerung des Porenvolumens in den oberen Bodenschichten mit sich bringt.

### 3. Untersuchungs- und Referenzgebiete

Die meisten Untersuchungsflächen liegen in der Gemeinde Herl, hier wurden die Flächen nach ihrer Bewirtschaftungsform ausgewählt. Um überregionale genetische Muster identifizieren zu können, bzw. die Methoden generell auf ihre Eignung zu prüfen, Standorte zu differenzieren, wurden zwei weitere Referenzflächen ausgewählt. Die Referenzfläche in Wahlen wurde ausgewählt, da das Fach Biogeografie der Universitäten Saarbrücken bzw. Trier dort seit vielen Jahren ökologische Dauerbeobachtungen durchführt. Die Fläche in der niedersächsischen Gemeinde Belm wurde aufgrund der geografischen Entfernung als überregionale Referenzfläche gewählt (vgl. Karte 1).



Karte 1: Lage der Untersuchungsgebiete in Deutschland

### **3.1 Untersuchungsgebiet Herl**

#### **3.1.1 Untersuchungsflächen**



Abbildung 1: Luftbild von Herl (Luftbildquelle: H-S-W)

Um kleinräumliche Effekte der verschiedenen Bewirtschaftungssysteme untersuchen zu können, wurden in der Gemeinde Herl zehn, größtenteils landwirtschaftlich genutzte Untersuchungsflächen ausgewählt. Darunter fielen vier ökologisch und vier konventionell bewirtschaftete Flächen mit teilweise unterschiedlicher Flächennutzungsdynamik. Darüber hinaus wurde eine langjährige Brachfläche und eine Dauergrünlandfläche mit in die Untersuchung einbezogen. Die landwirtschaftlichen Flächen sollten möglichst durch Getreideanbau gekennzeichnet sein. Aufgrund des Fehlens reiner Getreideflächen aus ökologischer Bewirtschaftung wurden hier einige Flächen mit Gemenge (Mischung aus Getreide und Leguminosen) mit hinzugenommen.

Die Gemeinde Herl liegt auf einer Rumpffläche am nordwestlichen Rand des Osburger Hochwaldes, der als Teil des Hunsrücks zum Rheinischen Schiefergebirge gehört. Herl liegt ca. 10 km südöstlich von Trier (Luftlinie) und ist mit seinen ca. 250 Einwohnern durch bäuerliche Landwirtschaft geprägt.

Was die Gemeinde Herl für diese spezielle Untersuchung besonders interessant macht, ist die Tatsache, dass das Alter der Population sehr genau bekannt ist. Durch Gespräche mit den Landwirten konnte herausgefunden werden, dass ein Landwirt ca. 1980 von seinem früheren Betrieb in der Nähe von Pforzheim, Kompost nach Herl mitgebracht hat und kurze Zeit später in seinem Hofgarten und seinen Kulturen die Schnecken in zum Teil hohen Dichten bemerkt hat. Ausgehend von einigen

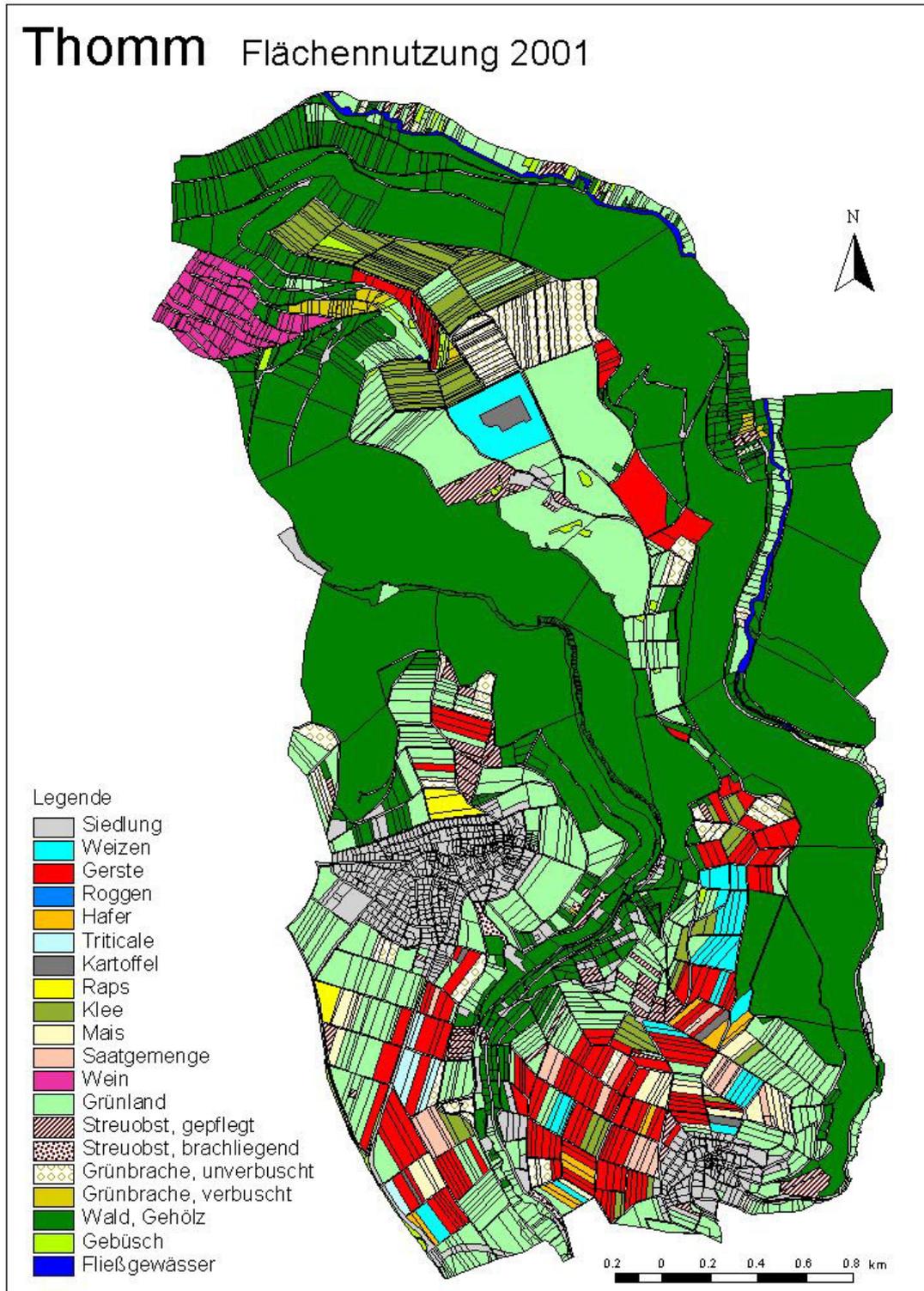
Ausbreitungszentren hat sich die Population entweder durch aktives Dispersal oder durch weitere Verschleppungsereignisse ausgebreitet. Die aktuelle Verbreitung in Herl wurde im Jahr 2001 dokumentiert (vgl. Karte 9).

Die Karte 2 zeigt die Lage der zehn Untersuchungsflächen im Untersuchungsgebiet Herl.



Karte 2: Lage der Untersuchungsflächen in Herl

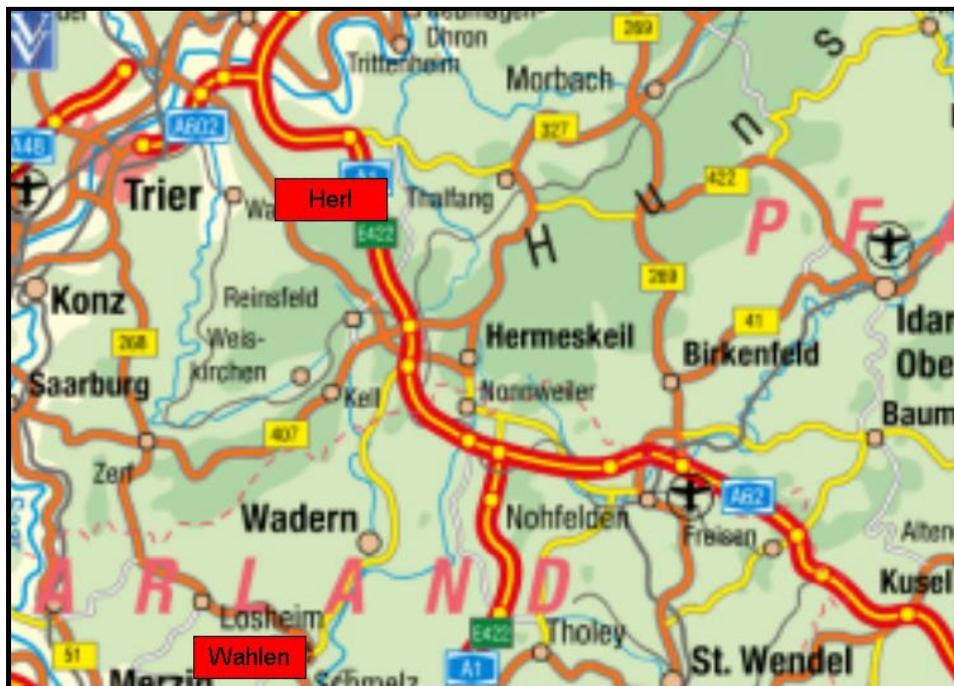
Die Flächennutzung in Herl wurde vom Fach Biogeografie der Universität Trier seit 1999 im Rahmen von Geländepraktika erfasst. Die Karte 3 zeigt die Flächennutzung in Herl im Untersuchungsjahr 2001.



Karte 3: Flächennutzung des Untersuchungsgebietes Herl-Thomm im Jahr 2001

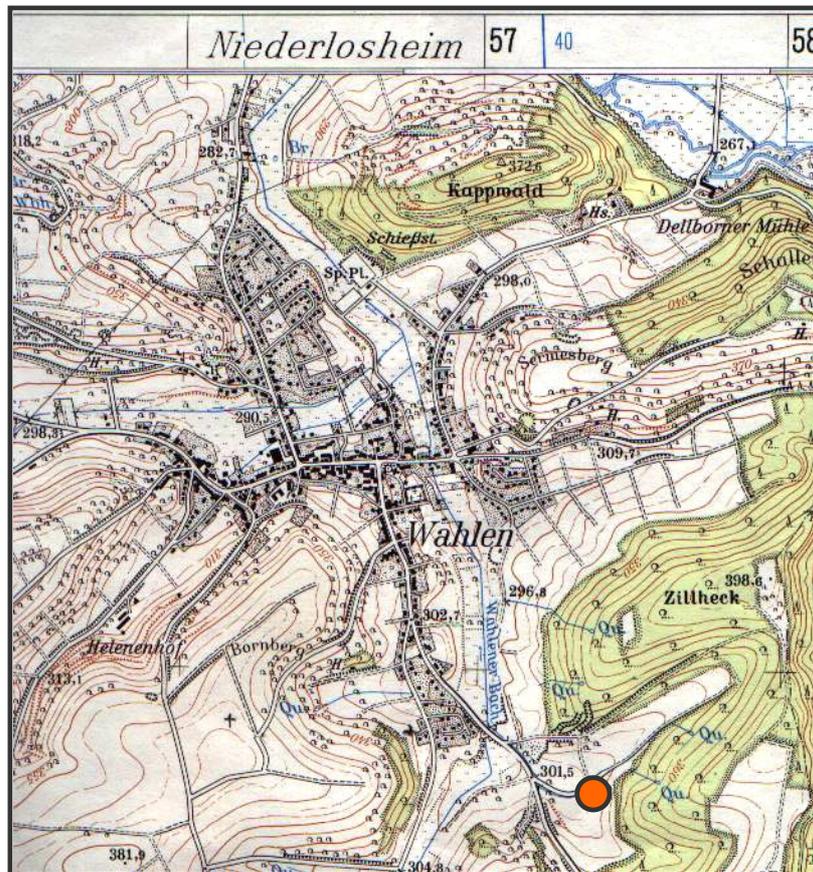
### 3.2 Referenzgebiet Wahlen

Das Untersuchungsgebiet „Wahlen“ ( $6^{\circ}47'E$ ,  $49^{\circ}29'N$ ), liegt in Südwestdeutschland im nordwestlichen Saarland. Von der naturräumlichen Gliederung Deutschlands (SCHNEIDER 1972), gehört es zur sogenannten „Wahlener Platte“, einer Untereinheit der „Merziger Muschelkalkplatte“. Als leicht gewellte Fläche im Höhengniveau um 350 m ü. NN wird das Gebiet von verschiedenen steilwandigen und bewaldeten Talschlüssen gegliedert und von bewaldeten Kuppen im Süden und Südosten eingerahmt. Der mittlere Jahresniederschlag liegt bei ca. 750 – 800 mm, die Jahresmitteltemperatur bei  $9^{\circ}$  Celsius. Die Karte 4 zeigt die Lage der Untersuchungsgebiete Herl und Wahlen.



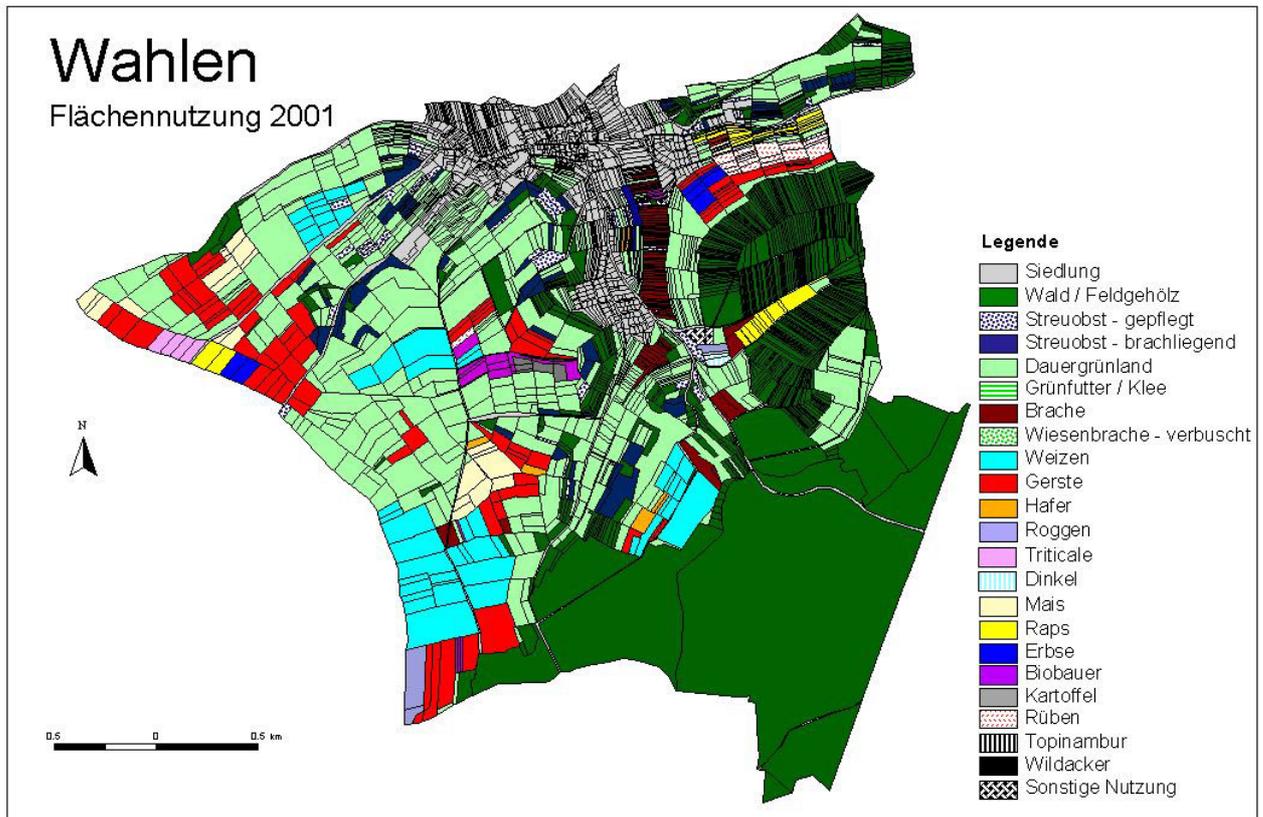
Karte 4: Lage der Untersuchungsgebiete Herl und Wahlen

Die Karte 5 zeigt die Lage der Untersuchungsfläche in der Gemeinde Wahlen (farbiger Kreis).



Karte 5: Gebietsausschnitt des Untersuchungsgebietes Wahlen, die Lage der Untersuchungsfläche ist durch den farbigen Kreis gekennzeichnet (Kartengrundlage: TK 25, Blatt 6506, Reimsbach).

Die Flächennutzung in Wahlen wurde vom Fach Biogeografie der Universitäten Saarbrücken und Trier seit mehr als zehn Jahren im Rahmen von Geländepraktika erfasst. Die Karte 6 zeigt die Flächennutzung in Wahlen im Untersuchungsjahr 2001.

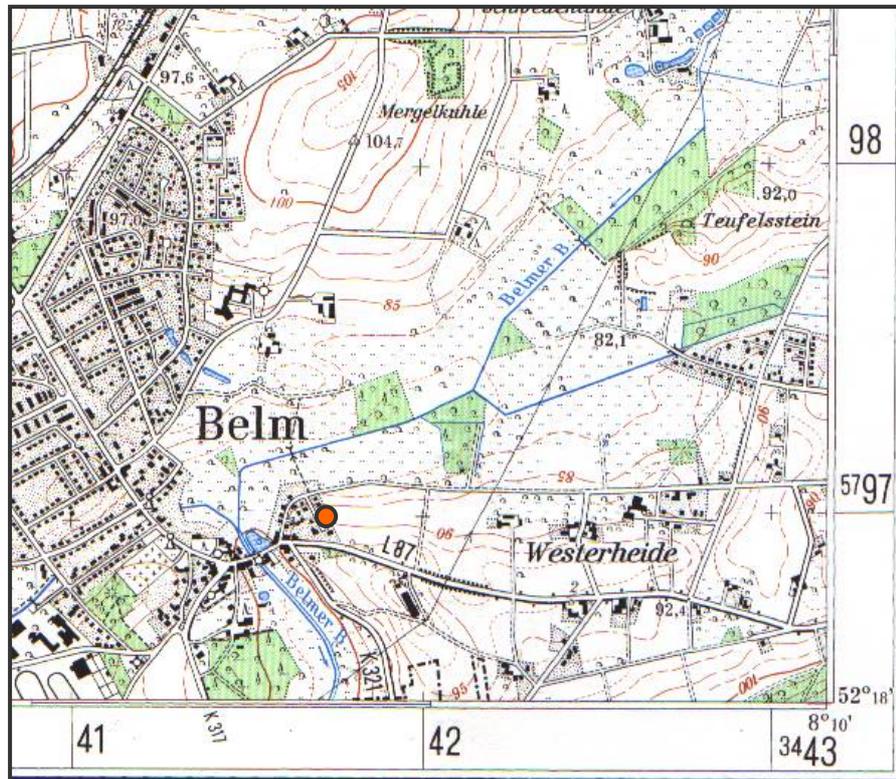


Karte 6: Flächennutzung des Untersuchungsgebietes Wahlen im Jahr 2001

### 3.3 Referenzgebiet Belm

Die Referenzfläche liegt 10 km nordöstlich der niedersächsischen Stadt Osnabrück und gehört zum Naturraum „Osnabrücker Hügelland“, das zwischen den Mittelgebirgszügen Teutoburger Wald und Wiehengebirge liegt. Die leicht hügelige Landschaft liegt in einer Höhenlage von ca. 70 bis 170 m ü. NN. Die mittleren Jahresniederschläge liegen bei ca. 850 mm. Die Jahresmitteltemperatur beträgt 9,4 °C.

Bei der Untersuchungsfläche handelt es sich um einen Garten, der direkt an landwirtschaftlich genutzte Flächen angrenzt. Den Bewohnern der Siedlung zufolge wird die *Arion lusitanicus* Population dort als Problem empfunden, dass sich erst in den letzten drei Jahren gravierend verstärkt hat. Die Karte 7 zeigt die Lage der Untersuchungsfläche in der niedersächsischen Gemeinde Belm.



Karte 7: Gebietsausschnitt des Untersuchungsgebietes Belm, die Lage der Untersuchungsfläche ist durch den farbigen Kreis gekennzeichnet (Kartengrundlage: TK 25, Blatt Wallenhorst).

## 4. Verbreitung und Biologie von *Arion lusitanicus*

### 4.1 Systematik und Taxonomie

Die Familie der Arionidae oder Wegschnecken umfasst Arten von Nacktschnecken, deren innere Kalkplatte gewöhnlich reduziert ist. Allen Arionidae fehlt ein Kiel, während alle Arten eine caudale Schleimdrüse über der Schwanzspitze besitzen. Der Mantel ist genarbt, die Atemöffnung befindet sich vor der Mantelmitte. An der Lage der Atemöffnung können die Arten der Familie eindeutig von anderen Familien abgegrenzt werden.

Die Familie Arionidae besteht aus vier Gattungen und aus 30 bis 50 Arten (BACKELJAU 1996). Mit Ausnahme von *Arion sibiricus* kommen alle Vertreter der Familie in Europa vor.

Viele dieser Arten können nur durch feinste morphologische und anatomische Unterschiede voneinander unterschieden werden. Daher ist die Taxonomie und Systematik der Arionidae nach wie vor problematisch.

Stamm Mollusca

Klasse Gastropoda Cuvier 1797 - Schnecken

Ukl. Pulmonata CUVIER 1817

Ord. Stylomatophora A. SCHMIDT 1855 - Landlungenschnecken

ÜFam. Arionoidea GRAY 1840

Fam. Arionidae GRAY 1840 - Wegschnecken

*Arion lusitanicus* MABILLE 1868 – Spanische Wegschnecke

Die Nomenklatur und Systematik richtet sich nach den Angaben der DEUTSCHEN MALAKOZOOLOGISCHEN GESELLSCHAFT (in Vorbereitung).

## 4.2 Artbeschreibung

*Arion lusitanicus* ist eine mittelgroße bis große Nacktschnecke, die ausgestreckt ca. 7 – 14 cm lang werden kann. In der Färbung kann sie sehr variabel sein; das Spektrum geht von grau- grün bis orangerot (in Bulgarien). Die normale Färbung ist grau bis braun. Die Jungtiere weisen oft eine dunkle Seitenbinde auf dem Mantel auf. Die Sohle ist oft weißlich, der Schleim farblos. Ein Fußsaum mit feiner Querstreifung bildet die Begrenzung zur Körperoberseite, die grobe Querrunzeln aufweist. *Arion lusitanicus* kann mit *Arion rufus* und *Arion subfuscus* verwechselt werden, wobei allerdings *Arion subfuscus* stets unter sieben cm Länge bleibt (KERNEY et al. 1983). Anhand der genitalmorphologischen Merkmale sind die Arten jedoch gut zu unterscheiden (vgl. Abbildung 2).

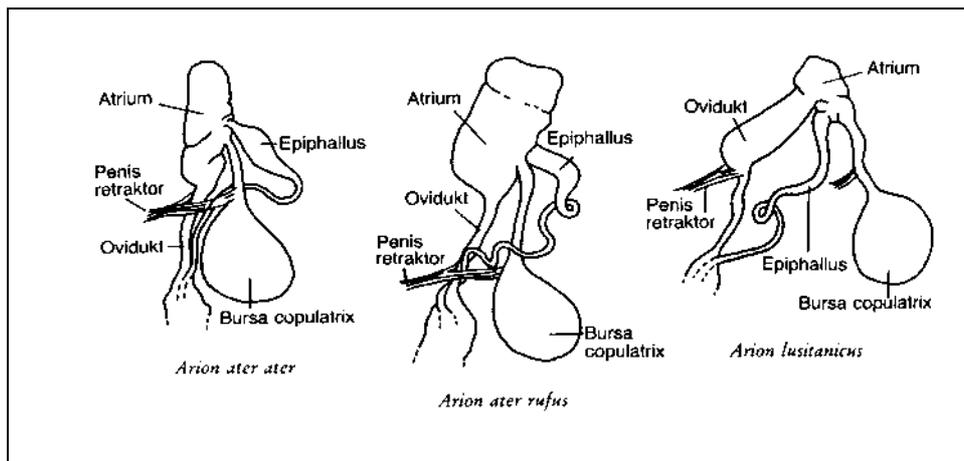


Abbildung 2: Genitalmorphologische Merkmale der Arten *Arion ater*, *Arion rufus* und *Arion lusitanicus* (KERNEY et al. 1983))

## 4.3 Verbreitung

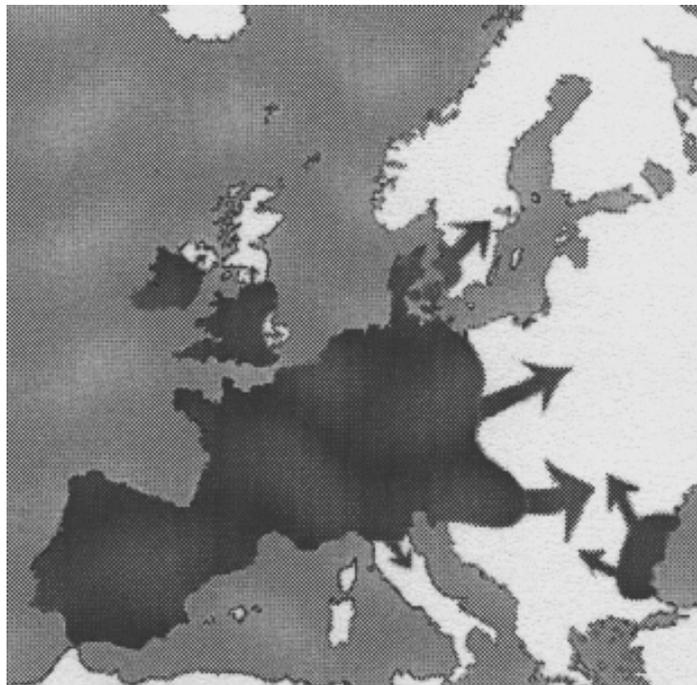
Die Spanische Wegschnecke war ursprünglich ausschließlich in Südwesteuropa verbreitet. Sie besiedelt dort naturnahe Lebensräume (WIESE 1999). Durch Verschleppung wurde die Art seit den 60er Jahren des 20sten Jahrhunderts nach Mittel - und Südosteuropa eingeführt und hat sich dort vor allem auf Kulturland stark ausgebreitet. Vor allem Gartenbaubetriebe und Baumschulen sollen Ausbreitungszentren gewesen sein (WIESE 1999).

Die aktuelle Verbreitung von *Arion lusitanicus* und das erste Auftreten in Mitteleuropa ist nur schlecht dokumentiert. In der Schweiz wurden das erste Auftreten der Art

1955 dokumentiert (SCHMID 1970). Der Erstnachweis für Österreich erfolgte 1972 durch REISCHÜTZ und STOJASPAI. Die ersten Fundstellen beschränkten sich auf Gärtnereien, Gärten und Mülldeponien. Dort wo *Arion lusitanicus* auftritt, verdrängt sie *Arion rufus*; obwohl auch an Orten, an denen *A. lusitanicus* nicht vorkommt ein Rückgang von *Arion rufus* beobachtet wird. Inzwischen zählt *A. lusitanicus* zu den häufigsten Schnecken und gilt als großer Ernteschädling (REISCHÜTZ 1984).

Seit 1975 wird auch eine starke Ausbreitung der Art in Schweden beobachtet (PROSCHWITZ 1989), die ersten Vorkommen in Dänemark werden seit 1991 gemeldet. Die Karte 8 zeigt das ungefähre Areal in Europa.

In den USA ist bisher keine starke Ausbreitung bekannt, obwohl es auch dort Fundorte gibt (Cornell University). Auch von Funden auf den Falklandinseln wird berichtet.



Karte 8.: Ungefähres Areal von *Arion lusitanicus* mit Ausbreitungsrichtung. Für einige Gebiete liegen keine aktuellen Daten vor (Quelle: WIESE 1999).

#### **4.4 Lebenszyklus**

*Arion lusitanicus* Mabile 1868 hat in West- und Nordeuropa einen univoltinen und semelparen Zyklus (QUICK 1952; CHEVALIER 1971, DAVIES 1987; RISCH & BACKELJAU 1989, GRIMM 2001). Sie lebt also nur ein Jahr und pflanzt sich nur einmal in ihrem Leben fort. Die Geschlechtsreife wird im Frühsommer erreicht. Bei der Paarung im Sommer übertragen die Tiere wechselseitig Spermatophoren. Die Eiablage erfolgt im Herbst. Es werden pro Individuum oft mehrere hundert Eier abgelegt, die einen

Durchmesser von 3-4 mm aufweisen. Sowohl Eigelege als auch Jungtiere können im Herbst und Frühjahr gefunden werden, so dass die Überwinterung in beiden Entwicklungsstadien erfolgen kann (SOUTH 1989). Der Schlüpzeitpunkt wird durch den Temperaturverlauf beeinflusst (KAISER et al. 1993).

Die Körpergröße der Individuen einer Population kann daher deutlich variieren (GRIMM 1991). Die im Herbst geschlüpften Individuen sollen früher zur Eiablage kommen, als die im Frühjahr geschlüpften Individuen (CHEVALIER 1971). So kommt es zu zwei Eiablageperioden im Juni und im August.

Wie viele andere Schneckenarten ist *Arion lusitanicus* hermaphroditisch (FOLTZ 1982). Hermaphroditismus (Zwittrigkeit) ist eine Form der geschlechtlichen Fortpflanzung, wie sie bei vielen sessilen oder grabenden Tieren zu beobachten ist. Jedes der Individuen besitzt sowohl weibliche, als auch männliche Fortpflanzungsorgane. Einige Hermaphroditen können sich selbst befruchten, die meisten sind jedoch auf die geschlechtliche Fortpflanzung angewiesen.

#### **4.5 Ökologische Ansprüche**

*Arion lusitanicus* bevorzugt offene Landschaften und ist in vielen landwirtschaftlich genutzten Flächen ein ernstzunehmender Ernteschädling (FRANK 1996). In manchen Habitaten können so Populationsdichten von mehr als 50 Individuen pro Quadratmeter gefunden werden (GRIMM 1991).

Während der Jugend- und der weiblichen Reifephase verbreiten sich die Tiere deutlich mehr als in der Zwischenphase und der männlichen Reifephase (GRIMM et al. 2001).

Nacktschnecken sind weltweit wichtige Schadorganismen in Landwirtschaft und Gartenbau (BAHR 1989, BEER 1989, BYERS & CALVIN 1994). Wie bei vielen anderen Schadorganismen wurde ihr Schadpotential erst durch menschliche Aktivitäten wie die Schaffung von Monokulturen und Bodenbearbeitungsmethoden, die ihnen Schutz vor Austrocknung und Feinden bieten, erreicht.

Im Naturhaushalt spielen Nacktschnecken in normalen Populationsdichten, ähnlich wie Regenwürmer, eine wichtige Rolle als Destruenten abgestorbener Pflanzenmaterials (SWIFT et al. 1979).

In der Ökotoxikologie haben Nacktschnecken eine große Bedeutung als Monitor-Organismen und Frühwarnsystem für Umweltbelastungen und – gifte (TRIEBSKORN et al. 1996); an Nacktschnecken werden z.B. Zellwandschädigungen sublethaler Konzentrationen untersucht.

## **5. Flächennutzung und Bewirtschaftungssysteme**

### **5.1 Vergleich der Bewirtschaftungssysteme**

#### **5.1.1 Begriffsbestimmung: Konventionelle Landwirtschaft**

Der Begriff konventionelle Landwirtschaft wird zur Abgrenzung der in den letzten Jahrzehnten entwickelten alternativen Anbauverfahren verwendet. Er wird oft im allgemeinen Sprachgebrauch mit intensiver oder sogar industrieller Landwirtschaft gleichgesetzt. In der Regel aber handelt es sich in den meisten Fällen um kleinbäuerliche Betriebe, die nach den Vorschriften des landwirtschaftlichen Fachrechts, wie Düngemittel-, Pflanzenschutz- und Bodenschutzgesetz wirtschaften. Das Fachrecht gilt für landwirtschaftliche Betriebe aller Rechtsformen mit ihren unterschiedlichen Produktionsrichtungen, Anbauverhältnissen und Betriebsgrößen. Für Deutschland wird die Einhaltung der „guten landwirtschaftlichen Praxis“ im Sinne der EG - Verordnung Nr. 1257/99 durch die geltenden Regelungen des Fachrechts festgelegt und von den Ländern umgesetzt und kontrolliert. Die „gute fachliche Praxis“ beschreibt die von den Landwirten zu beachtenden Grundsätze der landwirtschaftlichen Flächenbewirtschaftung. Hinsichtlich der Umweltauswirkungen sind hauptsächlich die mit der Düngung und dem Pflanzenschutz verbundenen Stoffeinträge in Agrarökosysteme maßgebend. Ihre Einhaltung soll ein hohes Niveau zum Schutz der Umweltgüter Boden, Wasser und Luft im Sinne der Nachhaltigkeitsstrategie sichern und zur Erhöhung und Sicherung der Biodiversität beitragen (Anonymus 2002).

Nach dem Pflanzenschutzgesetz soll der Pflanzenschutz nach guter fachlicher Praxis im Sinne des integrierten Pflanzenschutzes durchgeführt werden. Die Grundsätze der guten fachlichen Praxis bilden einen Handlungsrahmen, der für jeden gilt, der Pflanzenschutzmaßnahmen in der Landwirtschaft, im Gartenbau oder der Forstwirtschaft durchführt. Ziel des Pflanzenschutzmittelgesetzes ist es, ein hohes Schutzniveau für Mensch, Tier und Naturhaushalt zu garantieren. So kommen nur Pflanzenschutzmittel in den Verkehr, die nach einer umfangreichen wissenschaftlichen Prüfung die Zulassung bekommen haben. Neben der Prüfung und Zulassung der Pflanzenschutzmittel müssen auch die Anwender ausgebildet werden und einen Sachkundenachweis erbringen. Darüber hinaus ist auch die Prüfung der Feldspritzen vom Pflanzenschutzrecht vorgeschrieben.

Auch das Düngemittelgesetz schreibt eine Anwendung von Düngemitteln nach guter fachlicher Praxis vor. Die Einhaltung dieser Grundsätze hat eine hohe Umweltrelevanz, da Pflanzen, Boden und Wasser direkt von diesen Maßnahmen betroffen sind. Düngungsmaßnahmen sollen so erfolgen, dass sie nach Art, Menge

und Zeit auf den Bedarf der Pflanzen und auf den vorhandenen Nährstoffvorrat des Bodens ausgerichtet sind.

Im Interesse des Gewässerschutzes dürfen keine Nährstoffe in die Oberflächengewässer gelangen, es ist daher ein angemessener Abstand einzuhalten. Für gewisse stickstoffhaltige Sekundärrohstoffdünger wie Jauche, Gülle und Geflügelkot gilt eine Sperrfrist vom 15. November bis zum 15. Januar. Zur Umsetzung der EU – Nitratrichtlinie werden auf Betriebsebene Obergrenzen für die Stickstoffdüngung erlassen, die bei Ackerland bei 170 kg/ha N und bei Grünland bei 210 kg/ha liegen. Bei Betrieben mit Tierhaltung darf ein Viehbesatz von 2,8 Großvieheinheiten/ha landwirtschaftlicher Nutzfläche nicht überschritten werden. Die gute fachliche Praxis schließt auch das Ausbringen von Klärschlamm und Bioabfallkompost mit ein, sofern diese die Schadstoffgrenzwerte der abfallrechtlichen Vorschriften wie Klärschlammverordnung und Bioabfallverordnung einhalten. Kommt es zu Verstößen durch unsachgemäße Anwendung, kann dieses durch die zuständigen Landwirtschaftsämter geahndet werden. Kontrollen erfolgen als geplante Kontrollen in Abhängigkeit vom Vegetationsverlauf, Stichprobenkontrollen und Anlasskontrollen auf Verdacht oder Anzeige hin.

Alle der beschriebenen Bestimmungen und Maßnahmen zielen auf eine größtmögliche Minimierung der Umweltauswirkungen, Produktsicherheit und Verbraucherschutz.

Dennoch gehen vielen die Bestimmungen der guten fachlichen Praxis nicht weit genug, zumal durch Lebensmittelskandale das Vertrauen der Verbraucher in die konventionelle Landwirtschaft, insbesondere der intensiven Tierhaltung, Schaden genommen hat. Zurzeit ist sogar das erklärte politische Ziel der Bundesregierung, die biologische Landwirtschaft zu fördern und die konventionelle Landwirtschaft umweltgerechter zu gestalten.

Kritik an der guten landwirtschaftlichen Praxis wird dahingehend geäußert, dass es keinerlei Einschränkungen zur Fruchtfolgegestaltung gibt, keine Vorgaben zu standortangepassten oder resistenten Sorten gebe, die Sperrfrist für die Ausbringung von flüssigen Wirtschaftsdüngern zu kurz sei, die Viehbesatzdichte zu hoch und das Schadschwellenprinzip beim Pflanzenschutz nur eine unverbindliche Empfehlung sei (Anonymus 2002).

Diese Kritikpunkte sollen z.B. durch den integrierten Landbau aufgegriffen und entschärft werden.

### 5.1.2 Begriffsbestimmung: Biologische Landwirtschaft

Der Begriff „Biologische Landwirtschaft“ bezeichnet keine einheitliche Anbauform in der Pflanzenproduktion. Er wird im Sprachgebrauch oft als Sammelbegriff verwendet, der alle Anbauformen umfasst, die die negativen Umweltwirkungen der Landbewirtschaftung auf Boden, Wasser und Luft zu minimieren versuchen. Wissenschaftlich ist der Begriff umstritten, da alle Arten der Landwirtschaft biologischen Gesetzmäßigkeiten unterliegen (DIERCKS 1983).

Synonyme Bezeichnungen sind auch „ökologischer“, „organischer“, „naturgemäßer“ oder „alternativer“ Landbau. Die landwirtschaftlichen Betriebe sind meist einem Anbauverband angegliedert. Die einzelnen Anbauverbände unterscheiden sich hinsichtlich ihrer methodischen Konzepte, einige entstammen sogar philosophischen und religiösen Denkansätzen.

Alle Richtungen des biologischen Landbaus beruhen auf einer ganzheitlichen, zyklischen Lebensbetrachtung (DIERCKS 1983). Darunter versteht man zum einen den Grundsatz möglichst geschlossener Stoff- und Energiekreisläufe, die Fremdstoffzufuhr bleibt auf ein Minimum beschränkt. Diese Forderung setzt eine gemischte Betriebsstruktur voraus, der Umfang des Viehbestandes ist an die landwirtschaftliche Nutzfläche angepasst und entspricht etwa 1 Großvieheinheit (GV). Die Art und Anzahl der angebauten Marktfrüchte richtet sich nicht nur nach ökonomischen sondern vor allem an ökologischen Forderungen, was sich an einer möglichst ausgewogenen Fruchtfolge widerspiegelt, auch um die Gefahr von Fruchtfolgekrankheiten zu minimieren. Auch der vollständige Verzicht auf Mineraldünger und chemisch-synthetische Pestizide sind Grundvoraussetzungen für die biologische Landwirtschaft.

Ein Hauptprinzip ist eine ausgeglichene Humusbilanz, die auf Gaben von organischem Hofdünger (Stallmist), mehrjährigem Leguminosenanbau für Futterzwecke und Zwischenfrüchten zur Gründüngung beruhen.

Auch die mechanische Bodenbearbeitung wird nach bodenschonenden Gesichtspunkten durchgeführt, die das Bodenleben wenig stören, sogar nachhaltig fördern soll. Die Bodenbearbeitung soll die vertikale Struktur des Bodens nicht verändern, was u.a. Verzicht auf tiefes Pflügen bedeutet. Nach der Ernte wird der Boden in der Regel flach gelockert und saarfertig gekrümelt, um Wasserverluste zu minimieren und Ausfallgetreide und Unkrautsamen zum Auflaufen anzuregen, was eine spätere Vernichtung durch weitere mechanische Bearbeitung erleichtert. Die Ernterückstände werden oberflächennah in den Boden eingearbeitet.

Pflanzenschutz wird im biologischen Landbau hauptsächlich vorbeugend durchgeführt. Das beinhaltet neben der erwähnten vielfältigen Fruchtfolge auch den

Anbau resistenter Sorten und nützlingsfördernde Maßnahmen, die die Selbstregulation natürlicher Ökosysteme simulieren soll. Unkräuter werden daher nicht ausschließlich als Konkurrenten der Nutzpflanzen betrachtet, sondern als Hilfsmittel zur Erhaltung der Selbstregulationsfähigkeit.

Dem ökologischen Landbau liegen zum einen die EU-Verordnung von 1991 über den biologischen Landbau und die jeweiligen Verbandsrichtlinien zugrunde.

Die in Deutschland ökologisch bewirtschaftete Fläche beträgt 623000 ha (Daten zur Umwelt, Stand Januar 2002). Dies entspricht rund 3,7 % der landwirtschaftlichen Nutzfläche und einer Zunahme zum Vorjahr von 16 %.

### ***5.2 Beschreibung der Landbewirtschaftung auf den Untersuchungsflächen***

Die genetische Populationsstruktur und genetische Diversität sind Parameter, die sich über mehrere Generationen herausbilden und nicht nur Spiegelbild der jeweiligen Nutzung im Untersuchungsjahr sind. In der Tabelle 1 sind die Nutzungen der letzten drei Jahre angegeben. Da im biologischen Landbau auf eine vielfältige Fruchtfolge besonderer Wert gelegt wird, ist hier auch die Zahl der durchschnittlichen Nutzungen mit 2,75 höher als bei den konventionellen Flächen (2,00). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, da auf der Untersuchungsfläche „Bio1“ nur zwei, statt drei verschiedene Nutzungen stattfanden. Andererseits wird hier durch die Kleegrasesaat von den Biolandwirten gezielt versucht, eine Erholung des Bodens herbeizuführen.

Aufgrund dieser Indikatoren für Bewirtschaftungsintensität sollte abgeschätzt werden, ob es Hinweise darauf gibt, dass hier Einflüsse auf populationsgenetische Parameter stattfinden.

Tabelle 1: Übersicht über die Nutzungen der Untersuchungsflächen in den Jahren 1999-2001

	1999	2000	2001	Zahl der Nutzungen
<b>Konv1</b>	Brache	Brache	S-Gerste	2
<b>Konv2</b>	Weizen	Hafer	S-Gerste	3
<b>Konv3</b>	Weizen	Gerste	S-Gerste	2
<b>Konv4</b>	Gerste	Gerste	S-Gerste	1
<b>Bio1</b>	Kleegras	Kleegras	W-Weizen	2
<b>Bio2</b>	Kleegras	W-Weizen	Gemenge	3
<b>Bio3</b>	Kleegras	W-Weizen	Gemenge	3
<b>Bio4</b>	Kartoffel	W-Gerste	Gemenge	3
<b>Brache</b>	Brache	Brache	Brache	1
<b>Wiese</b>	Grünland	Grünland	Grünland	1
<b>Wahlen</b>	Gemenge	Gemenge	Grünland	2
<b>Belm</b>	Garten	Garten	Garten	1

### 5.2.1 Nutzungsintensität auf der Fläche „Wiese“

Die Wiese ist eine relativ stark vernässte Fläche, die zur Bodenmelioration aufgekalkt wurde. Das Gras wurde dreimal jährlich bei trockenem Wetter mit dem Kreiselmäher bei einer Schnitthöhe von sieben cm gemäht, gewendet und das Anwelkgut gehäckselt. einmal jährlich wird ca. 20 m<sup>3</sup> Gülle ausgebracht. Insgesamt werden jährlich 13 verschiedene Bearbeitungsschritte durchgeführt.

### 5.2.2 Nutzungsintensität auf den konventionell bewirtschafteten Flächen

Ein konventionell wirtschaftender Landwirt ist vollständig auf die pfluglose Bodenbearbeitung umgestiegen („Konv2“ bis „Konv4“). Bei dieser Art der Bodenbearbeitung, die in Deutschland schon auf einem Sechstel der Flächen praktiziert wird, wird die Scholle nicht komplett gewendet, sondern nur mit speziellen Maschinen so vorsichtig wie möglich aufgelockert (DEWALD 1983). Die neue Saat wird auf den Halmresten des letzten Jahres ausgebracht. Auflaufende Unkräuter und Ausfallgetreide werden vor der Aussaat mit Totalherbiziden beseitigt. Der Grund für die Umstellung sind vor allem die geringen Arbeitskosten. Der Einsatz an chemischen Spritzmitteln ist in Deutschland jedoch mit dem herkömmlicher

Bodenbearbeitung zu vergleichen. Das Verfahren kann jedoch nur dort eingesetzt werden, wo die Böden nicht zu nass oder zu trocken sind (DEWALD 1983).

Auf allen untersuchten konventionellen Flächen wurde im Jahr 2001 Sommer-Gerste angebaut. Die Bearbeitungsschritte auf den Flächen „Konv2“, „Konv3“ und „Konv4“ bestanden aus je einmal Drillen, Mineraldünger streuen, Stalldung ausbringen, Pflanzenschutz, Mähen, Rundballen pressen (und Abtransport). Hier sind sieben Bearbeitungsschritte durchgeführt worden, die Auswirkungen auf die Schneckenpopulation haben könnten.

Auf der Fläche „Konv1“ wird die Bearbeitung von einem anderen Landwirt vorgenommen, der nicht pfluglos arbeitet. Die Bearbeitungsschritte fallen daher anders aus: Je einmal Pflügen, Eggen, Walzen, Direkteinsaat, Drillen, Kalk streuen, Mineraldünger streuen, Pflanzenschutz, Mähen und Rundballen pressen (und Abtransport). Hier sind demnach zehn Bearbeitungsschritte durchgeführt worden.

### **5.2.2.1 Chemischer Pflanzenschutz auf den konventionell bewirtschafteten Flächen**

Neben Saatgutbeizmitteln, die hier nicht näher aufgeführt werden, wurden die Getreidefelder der konventionellen Betriebe mit Herbiziden und Fungiziden behandelt.

Als Herbizide zur Unkrautbekämpfung im Getreide dienten Präparate wie „BASAGRAN DP<sup>®</sup>“ (Wirkstoffe: Bentazon und Dichlorprop), „DUPLOSAN DP<sup>®</sup>“ (Wirkstoff: Dichlorprop), Eine Mischung aus „POINTER<sup>®</sup>“ (Wirkstoff: Tribenuron) und „HOESTAR<sup>®</sup>“ (Wirkstoff: Amidosulfuron), „RALON SUPER<sup>®</sup>“ gegen Flughafer (Wirkstoffe: Fenoxapron und Mefenpyr) und als Totalherbizid, das gegen Ende der Vegetationsperiode ausgebracht wurde „ROUNDUP ULTRA<sup>®</sup>“ (Wirkstoff: Glyphosat).

Als Fungizid wurde das Präparat „OPUS TOP<sup>®</sup>“ mit den Wirkstoffen Epoxiconazol und Fenpropimorph eingesetzt. Insektizide, Molluskizide bzw. andere Biozide kamen in den letzten Jahren nicht zum Einsatz.

### **5.2.3 Nutzungsintensität auf den biologisch bewirtschafteten Flächen**

Die Bearbeitung der Flächen „Bio2“ bis „Bio4“, auf denen im Jahr 2001 Gemenge angepflanzt wurde, bestand aus jeweils einmaligem Pflügen, Kreiseldrillen und Ausbringen von Gülle (20 m<sup>3</sup>/ha), zweimalige Düngung mit Hornmist, einmal Mähen und einmal Rundballen pressen. Hier sind demnach 7 verschiedene Arbeitsschritte durchgeführt worden. Ähnlich sieht es auf der Winter-Weizen-Fläche aus (Bio1), mit Ausnahme der Gülleausbringung wurden die gleichen Arbeitsschritte durchgeführt.

## 6. Populationsgenetische Analysen

Das Prinzip molekularer Studien auf Populationsebene besteht darin, durch geeignete Merkmale Teilpopulationen genetisch zu charakterisieren, um somit Unterschiede oder Ähnlichkeiten zu anderen Teilpopulationen herauszustellen. So werden Rückschlüsse auf die zwischen Teilpopulationen bestehenden Beziehungen möglich. Eine der theoretischen Grundannahmen der Populationsgenetik ist die Zugrundelegung von panmiktischen Populationen, was bedeutet, dass unter allen Mitgliedern einer Population eine theoretisch gleiche Paarungswahrscheinlichkeit besteht (HARTL & CLARK 1997).

### ***6.1 Entstehung und Bedeutung genetischer Variation***

Genetische Variation ist in natürlichen Populationen oftmals überraschend hoch und es gibt eine intensive Debatte darüber, wie genetische Variation zustande kommt (ORR 1998, COMERON et al. 1999, HEY 1999, QUESADA et al 1999).

Nach Ansicht der sogenannten Neutralisten werden instabile Polymorphismen überwiegend durch genetische Drift hervorgerufen (KIMURA 1968, NEI 1988).

Im Gegensatz dazu sehen die sogenannten Selektionisten Polymorphismen als stabil an, da durch balancierende Selektion verschiedene Allele in verschiedenen Mikrohabitaten erhalten werden (SILVA & RUSSO 2000).

Die Begriffe genetische Variation und genetische Variabilität werden oftmals synonym verwendet, in der Evolutionsbiologie z.B. werden sie jedoch unterschiedlich definiert. Genetische Variation bedeutet aktuell beobachtete Unterschiede zwischen Individuen, während Variabilität die potentielle Differenzierung beschreibt. Variabilität ist die Fähigkeit, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. Wenn an einem Genort genetische Variation beobachtet wird, muss er natürlich variabel sein. Der Umkehrschluss hingegen kann nicht getroffen werden.

Das Auftreten von genetischer Variation kann viele Ursachen haben. Als Ursachen kommen Mutationen, Rekombination der Allele bei zweigeschlechtlicher Paarung, Zufallsprozesse wie genetische Drift, lokale Muster von Genfluss, Austauschprozesse zwischen Teilpopulationen und verschiedene Selektionsbedingungen aufgrund lokal unterschiedlicher abiotischer und biotischer Faktoren in Frage.

Als Mutation wird das Auftreten von vererbaren Veränderungen der Basensequenz eines bestimmten Genabschnitts bezeichnet. Diese Sequenzveränderungen können nur während der Replikation der DNA entstehen. Wirkt sich diese Veränderung phänotypisch aus, wird diese neue Eigenschaft durch Selektion auf ihre Eignung getestet. Mutation und Selektion sind die wesentlichen Faktoren der Evolution.

Genetische Variabilität bildet die Basis für natürliche und künstliche Selektion und stellt damit eine wichtige Voraussetzung für das Überleben der Populationen dar. Auch die effektive Populationsgröße ( $N_e$ ) spielt bei der Erhaltung genetischer Variation eine bedeutsame Rolle. Die effektive Populationsgröße umfasst alle Tiere einer Population, die fortpflanzungsfähig sind und auch tatsächlich am Fortpflanzungsgeschehen teilnehmen (EWENS 1984). Die effektive Populationsgröße ist deshalb meist kleiner als die Zahl der Individuen einer Population. Bei simultan hermaphroditischen Arten, wie z.B. *Arion lusitanicus* ist die effektive Populationsgröße dementsprechend höher, als bei getrenntgeschlechtlichen Arten. Bei simultan hermaphroditischen Arten wurde daher oftmals eine hohe genetische Variation ermittelt (RITTE & PASHTAN 1982, SOLÉ-CAVA & THORPE 1990, 1991, THORPE & SOLÉ-CAVA 1994).

Offenbar können auch kleinräumige Unterschiede der Standortbedingungen genetische Variation hervorrufen (LINHART 1974, TURKINGTON & AARSON 1984, MENGES 1991).

Genetische Differenzierung ist jedoch nur durch einen lokal eingeschränkten Genfluss möglich.

Neben den ständig auf eine Population einwirkenden Faktoren wie Genfluss und Gendrift, Selektion und Mutation gibt es einige historische Faktoren, die die genetische Zusammensetzung von Populationen beeinflussen. Solche historischen Ereignisse können Habitatfragmentierungen sein, die den Genfluss zwischen Teilpopulationen verringern können und zu erhöhter Inzucht führen können oder die Arealausdehnung, die die gegenläufigen Auswirkungen hat.

Ebenso bedeutsam wie die vorher genannten Faktoren sind historische Ereignisse bei der Neubesiedlung eines Areals (founder effect) oder ein genetischer Flaschenhals (bottleneck), der durch extreme Verkleinerung der Populationsgröße hervorgerufen werden kann.

Die Abbildung 3 zeigt die Veränderung der Allelfrequenzen, wie sie durch einen genetischen Flaschenhals oder Gründereffekt hervorgerufen werden können.

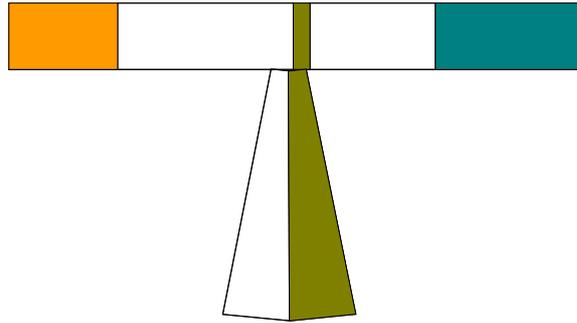


Abbildung 3: Bottleneck-Effekt durch Verkleinerung der Populationsgröße bewirkt eine Veränderung der Zahl der Allele und der Allelfrequenzen (verändert nach BERRY 1997). Die verschiedenen Farben repräsentieren die verschiedenen Allele eines Locus.

Vor Entwicklung der molekulargenetischen Methoden konnten Mutationen nur morphologisch, ethologisch oder aufgrund der Leistungsfähigkeit der Individuen erkannt werden. Da sich nicht alle Mutationen auf die Expression der Aminosäuresequenzen auswirken und diese sich nicht in jedem Fall durchsetzen können, ist auf der Ebene der DNA eine größere genetische Variation vorhanden, als bei der Untersuchung phänotypischer Merkmale erkennbar ist. Hinzu kommt, dass der größte Teil der genomischen DNA neben diesen kodierenden Bereichen aus nicht kodierenden Sequenzen besteht, deren Mutationen, soweit heute bekannt ist, keine Wirkung auf den Phänoyp ausüben. Außerdem sind innerhalb von Genen die ursächlichen Mutationen oft nicht bekannt, so dass die Variabilität nicht kodierender Bereiche in Form von molekulargenetischen Markern als Informationsquelle genutzt wird. Untersuchungen mit verschiedenen Markersystemen z.B. bei *Homo sapiens* (BOWCOCK et. al. 1994), *Rattus spec.* (RUSSEL et al. 1993), *Equus africanus* (JORDANA et al. 1999) bestätigen die geringere Variabilität auf dem Niveau der Proteine im Vergleich zur DNA (IRGANG 2001).

Die molekulare Populationsgenetik untersucht die genetische Struktur von Populationen mit den Methoden der Molekularbiologie. Es gibt nur wenige Bereiche in der Biologie, die im gleichen Maße von mathematischer Theorie beeinflusst und geleitet wurden, wie die Populationsgenetik. Um die mathematischen Schwierigkeiten unter Kontrolle zu halten, werden viele Vereinfachungen verwendet, die allerdings die Komplexität natürlicher Populationen ignorieren. Dennoch haben sowohl empirische als auch theoretische Methoden in der Populationsgenetik große Erfolge erzielt.

Genetische Variation ist als direkt beobachtbare Eigenschaft vergleichsweise einfach zu messen. Auf der Individuenebene wird sie als Heterozygotie angegeben. Im Gegensatz dazu ist die genetische Variabilität schwieriger zu messen, sie wird oftmals als Mutationsrate angegeben.

Auf der Populationsebene kann die Verteilung genetischer Variation mit dem Inzuchtkoeffizienten  $F_{IS}$  als Maß genotypischer Diversität angegeben werden.

Inzucht bedeutet, dass zwei Individuen sich kreuzen, die näher miteinander verwandt sind als zwei zufällig ausgewählte Individuen der Population (HEDRICK 1999).

Der Inzuchtkoeffizient drückt die Wahrscheinlichkeit aus, dass zwei homologe Allele eines Individuum von gleicher Abstammung sind (identity by descent). Das bedeutet, dass beide Kopien eines Allels einen gemeinsamen Ursprung haben.

Daneben können jedoch auch Allele vorkommen, die zwar die gleiche Größe aufweisen, jedoch nicht von gleicher Abstammung sind (identity in state).

Eine extreme Form der Inzucht ist die Selbstbefruchtung. Bei kompletter Selbstbefruchtung in einer Population entstehen schnell verschiedene Linien, die schnell einen hohen Homozygotenanteil aufweisen (HEDRICK 1999).

Beim Vergleich verschiedener Populationen wird die Verteilung der Allelfrequenzen als  $F_{ST}$ -Wert angegeben

### ***6.2 Auswirkungen des Verlustes genetischer Variation***

Im Zusammenhang mit verringerter genetischer Variation wird bei einigen Arten eine verringerte Fitness beobachtet (inbreeding depression). Fruchtbarkeit und Anpassungsfähigkeit können reduziert werden (BIJLSMA et al. 1991, BRAKEFIELD 1992).

### 6.3 Molekulargenetische Analysemethoden

In dieser Arbeit wurden zwei grundlegend unterschiedliche molekulargenetische Methoden angewandt und kombiniert. Die Methoden unterscheiden sich nicht nur in ihrem experimentellen Aufwand, sondern auch im Ausmaß der beobachtbaren genetischen Variation. Die Tabelle 2 stellt die Stärken und Schwächen der Methoden gegenüber.

Tabelle 2: Eigenschaften und Eignung von RAPD-Markern und Mikrosatelliten. Verändert nach BERGMANN & LEINEMANN (2000) sowie GLAUBITZ & MORAN (2000).

	RAPD's	Mikrosatelliten
<b>Eigenschaften</b>		
Anzahl der Loci pro Reaktion	5 bis 80	1 oder mehr
Vererbung	dominant	codominant
Variabilität	hoch	sehr hoch
Entwicklungsaufwand	niedrig	sehr hoch
<b>Eignung</b>		
Genetische Diversität	gut	sehr gut
Populationsdifferenzierung	gut	gut
Genotypische Struktur, Heterozygotie	nicht geeignet	gut

#### 6.3.1 Randomly-amplified-polymorphic DNA –PCR (RAPD-PCR)

##### 6.3.1.1 Prinzip und Durchführung der RAPD-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein in vitro-Verfahren, welches das Zellreparatursystem lebender Systeme imitiert. Durch zyklische Replikation wird bei jedem Zyklus die vorhandene DNA verdoppelt, so dass Fragmente von bis zu 4 kb tausend- bis millionenfach vervielfältigt werden können.

Erst die Entdeckung hitzestabiler Polymerasen z.B. aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) ermöglichte den automatisierten Einsatz der PCR mittels Thermocycler.

Heute ist PCR eine Standardanwendung in der medizinischen Diagnostik, Forensik, Bioanalytik und Populationsgenetik.

Bei der RAPD-PCR handelt es sich um eine Sonderform der PCR, die erstmals 1990 von WILLIAMS et al. beschrieben wurde.

Es werden hier kurze, meist decamere Oligonucleotid-Primer mit einem GC –Gehalt von 50–80% eingesetzt. Statistisch gesehen findet sich in einem Genom alle  $10^6$  Basen ein komplementärer Bindungsort. Liegen zwei dieser Hybridisierungsstellen in entgegengesetzter Richtung und in einer Entfernung von weniger als 5 kb, kann mit Hilfe der Polymerase und unter Verwendung der vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) der dazwischen liegende Bereich amplifiziert werden.

Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist, dass sie auch bei Arten durchgeführt werden kann, deren Genom nicht hinreichend bekannt ist, und demzufolge keine spezifischeren Methoden angewandt werden können. Trotz der relativ einfachen Anwendung sind die Fehlerquellen ungleich größer, als bei der konventionellen PCR und können nur durch sorgfältige Versuchsdurchführung und mehrfache Wiederholungen vermieden werden.

Ein Hauptproblem der RAPD-PCR ist die Reproduzierbarkeit, da unterhalb einer Primerlänge von 15 bp die unspezifische Primeranlagerung erhöht sein kann (HADRYs et al. 1992). Das Amplifikationsmuster ist ebenfalls sensitiv gegenüber verschiedenen Polymerase- und Templatekonzentrationen und Templatequalitäten.

Die RAPD-Marker verhalten sich dominant, im Vergleich zu kodominanten Markern wie Isoenzymen oder Mikrosatelliten. Das bedeutet, dass durch die Dominanz der Marker keine Unterscheidung zwischen Heterozygoten und Homozygoten gemacht werden kann. Bei der RAPD-PCR unterscheidet man +-Allele (Bande vorhanden) von Null-Allelen (Bande nicht vorhanden). Die Homozygoten des dominanten Allels (MM) und Heterozygote (Mm) werden beide als +-Allel detektiert und die Homozygoten des rezessiven Allels (mm) als Null-Allel dargestellt.

Die RAPD-PCR besteht aus verschiedenen Temperaturzyklen (vgl. TAYLOR 1993):

- Denaturierung der DNA bei 94 °C
- Annealing (Primeranlagerung bei spezifischer Temperatur)
- Polymerisation (bzw. DNA-Synthese, Replikation bei 72 °C)

### 6.3.2 DNA-Mikrosatellitenanalyse

Eine große Bedeutung für die Analyse genomischer Variabilität hat die „tandem repetitive DNA“, die auch als Satelliten-DNA bezeichnet wird, da bei der Gradientenzentrifugation neben der Hauptbande aus genomischer DNA, spezifische Satellitenbanden sichtbar werden. Je nach Länge der wiederholten Sequenz werden sie in klassische Satelliten, Minisatelliten und Mikrosatelliten eingeteilt (IRGANG 2001). Mikrosatelliten sind hoch polymorphe DNA-Regionen, die von Allel zu Allel in der Zahl der Wiederholungen variieren können. Wegen ihrer hohen Mutationsrate weisen die meisten Mikrosatelliten-Regionen eine große Zahl verschiedener Allele auf (WEBER & WONG 1993). Sie bestehen normalerweise aus 10-50 Kopien von 1-6 Basenpaarfolgen (LITT & LUTY 1998, SCHLÖTTERER & TAUTZ 1992, TAUTZ 1989, WEBER & MAY 1989). Mikrosatelliten werden in reine, zusammengesetzte und unterbrochene Repetitionen eingeteilt (JARNE & LAGODA 1996):

- reiner, perfekter Repeat                   CACACACACACACACACACAC
- zusammengesetzter Repeat           CACACACACAGAGAGAGAGA
- unterbrochener, imperfekter Repeat   CACATTCACACATTCATTCACA

Im Gegensatz zur RAPD-PCR ist die DNA-Sequenz der Region meist bekannt, die Primer können oftmals auch bei nah verwandten Spezies eingesetzt werden, wie zum Beispiel Huhn/Pute (LEVIN et al. 1995), Huhn/Wachtel (PANG et al. 1999), Rind/Schaf (CRAWFORD et al. 1995), Schaf/Ziege (YANG et al. 1999), Rind/Bison (MOMMENS et al. 1998) und Pferd/Esel (JORDANA et al. 1999).

Da Mikrosatelliten codominant sind, können aus Allelfrequenz und Heterozygotiegrad Aussagen über die Variabilität der Populationen und den Genfluss zwischen Populationen gemacht werden (JARNE & LAGODA 1996).

Neben der Primerentwicklung bedeuten Artefakte in der Amplifikation während der PCR, die durch slippage verursacht werden (WEBER 1990) und das Auftreten von sogenannten Null-Allelen, die Hauptnachteile dieser Methode. Null-Allele können durch Mutationen der Primerbindungsstellen entstehen.

### 6.3.2.1 Mikrosatelliten-Mutations-Modelle

Das Verständnis der Mikrosatelliten-Evolution ist für die Auswahl einer möglichst genauen Analyseverfahren unerlässlich. Ein wichtiges Mutationsmodell ist das sogenannte IAM-Modell (Infinite Alleles Model, KIMURA & OHTA 1978). Nach dem IAM-Modell entsteht mit der entsprechenden Mutationsrate bei jeder Mutation ein neues Allel. Demzufolge gibt es in diesem Modell keine Homoplasie und alle identischen Allele sind gleichen Ursprungs (BALLOUX & LUGON-MOULIN 2002).

In jüngster Zeit hat sich für die Erklärung der Mikrosatelliten-Mutation das „Stepwise Mutation Model (SMM)“ (KIMURA & OHTA 1978) durchgesetzt, um die Längenvariationen bei Mikrosatelliten zu erklären (GOLDSTEIN et al. 1995, SLATKIN 1995). Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass jede Mutation durch Hinzufügen oder Löschen eines einzelnen Repeat ein neues Allel hervorbringt. Demnach sind Allele die eine sehr unterschiedliche Größe aufweisen weniger nah miteinander verwandt als Allele ähnlicher Größe.

Die Mutationsrate eines bestimmten Mikrosatelliten-Locus ist im Allgemeinen unbekannt. Man geht davon aus, dass die meisten Mikrosatelliten eine Mutationsrate von ungefähr  $10^{-3}$  aufweisen (WEBER & WONG 1993, JARNE & LAGODA 1996). Dennoch gibt es Unterschiede zwischen Di-, Tri- und Tetranucleotiden, Basenzusammensetzung des Repeatmotivs, Mikrosatelliten-Typ, Art der flankierenden Region, Lage auf dem Chromosom und zwischen taxonomischen Gruppen (SCHLÖTTERER et al. 1998, BACHTROG et al. 2000).

Zur Auswertung der genetischen Variation sind verschiedene Berechnungsmethoden entwickelt worden, die den entsprechenden Mutationsmodellen Rechnung tragen. Jedoch soll keines der beschriebenen Mutationsmodelle, als auch keines der davon abgeleiteten Modelle wie z.B. das K-Allel-Modell (KAM) und Zwei-Phasen-Modell (TPM) die Asymmetrien der Mikrosatellitenmutation korrekt widerspiegeln. Die „Wahrheit“ soll zwischen den beiden Extremen „IAM“ und „SMM“ liegen (BALLOUX & LUGON MOULIN 2002).

### 6.3.2.2 Cycle-Sequenzierung

Dieses Verfahren der direkten Sequenzierung doppelsträngiger DNA beruht auf einer Kombination der PCR-typischen Zyklen von Denaturierung, Primer- Anlagerung und Elongation mit der Sanger- Kettenabbruchmethode. Die Methode nach SANGER (1977), beruht darauf, daß bei der künstlichen DNA-Synthese mittels PCR katalytische Mengen von Didesoxy- Nukleotiden hinzu gegeben werden, denen die reaktive OH-Gruppe an der 3` Position fehlt. Jedes mal, wenn ein Didesoxy-Nukleotid in den wachsenden DNA-Strang eingebaut wird, bricht die Reaktion an dieser Stelle ab. Man erhält eine Mischung von Fragmenten von denen das zuletzt eingebaute Nukleotid bekannt ist.

Bei der Cycle-Sequenzierung wurden der PCR-Reaktion vier Didesoxy- Nukleotide zugegeben, die mit Fluoreszenzfarbstoffen (dRhodamin- Terminatoren) markiert waren. dRhodamin- Terminatoren bestehen aus dem Energiedonor Fluoreszin und dem daran gebundenen Akzeptor Dichlorrhodamin.

Die verschiedenen Fragmente wurden danach mit dem „ABI-PRISM 310 GENETIC ANALYZER“ kapillarelektrophoretisch detektiert und ausgewertet.

## 7. Material und Methoden

### 7.1 Schätzung der Dichte von *Arion lusitanicus*

Die Erfassung der Dichte von Nacktschnecken wird durch die nächtliche Aktivität und versteckte Lebensweise in unregelmäßig verteilten Verstecken erschwert. Die Populationsdichteschätzung über Fang- und Sammelverfahren liefert angesichts der stark wechselnden Aktivität der Tiere nur ungenaue Werte (MÜLLER et al. 1985).

Da alle Methoden, die zur Dichteabschätzung von Schnecken zum einen extrem aufwändig und zum anderen oft ungenaue Daten liefern, wurde nur eine Einstufung der Untersuchungsflächen in vier Kategorien vorgenommen:

- keine Tiere
- geringe Dichte
- mittlere Dichte
- hohe Dichte

Da es sich bei den meisten Flächen um Getreidefelder handelte, wurden in den Flächen zwei Transekte von je 50 m abgeschritten, die sich an den Fahrspuren der Traktoren orientierten. Dadurch wurden zum einen Zerstörungen der Feldfrüchte vermieden, zum anderen konnten die Tiere in den Fahrspuren am leichtesten aufgefunden werden. Die Dichteschätzungen erfolgten vormittags zwischen 9 und 11 Uhr und wurden bei feuchter Witterung durchgeführt. Um Randeffekte zu vermeiden, lagen alle Transekte mindestens 3 m von der Flächengrenze entfernt.

Die vier Kategorien wurden folgendermaßen festgelegt:

- 1-2 Tiere pro Transekt => „geringe Dichte“
- 3-10 Tiere pro Transekt => „mittlere Dichte“
- 10 Tiere pro Transekt => „hohe Dichte“

Ziel dieser Dichteschätzung war es zu überprüfen, in wieweit sich Unterschiede in der Populationsdichte auf populationsgenetische Parameter wie genetische Diversität und Populationsstruktur auswirken.

## 7.2 Bioanalytische Methoden

### 7.2.1 Puffer und Lösungen

Bisbenzimid-Lösung $10^{-3}$ mol/l	Höchst, Hattersheim
Chloroform p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethanol abs., unvergällt	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70 % in sterilem $H_2O$ deion	
Ethidiumbromid-Lösung 1 $\mu$ g/ml	Boehringer, Ingelheim
10 x PCR-Puffer Finnzymes	Biometra, Göttingen
10 mM Tris-HCl (pH 8,8)	
1,5 mM $MgCl_2$	
50 mM KCl	
0,1 % Triton® X-100	
Stop-Lade-Mix	
0,25 % w/v Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
40 % w/v Saccharose	Roth, Karlsruhe
0,1 M $Na_2EDTA$	Roth, Karlsruhe
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)	Biometra, Göttingen
0,089 M Tris-HCl	
0,089 M Borsäure	
0,002 M $Na_2EDTA$ pH 8,0-8,2	
Längenstandard	Life-Technologies, Eggenstein
Längenstandard	Peqlab, Erlangen
Oligonukleotid-Primer	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (40 %)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat 10 % (APS)	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe

### 7.2.2 Geräte

Elektrophorese-Kammer Sub-Cell GT	BIO-RAD, München
Elektrophorese-Kammer Protea II XI Cell	BIO-RAD, München
Gelgießstand	BIO-RAD, München
Gel-Tray	BIO-RAD, München
Netzgerät Power Pac 300	BIO-RAD, München
Slotkamm (20 slots)	BIO-RAD, München
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Gel-Dokumentation	Eastman Kodak, Stuttgart
Digitalkamera Kodak DC 120	Eastman Kodak, Stuttgart

### 7.2.3 Kits

DNEasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QiAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle SequencingReady Reaktion Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt

### 7.2.4 Material für die Mikrosatellitenanalyse

Fluoreszenzmarkierte Desoxynucleosid-Triphosphate [F] dNTP's	Applied Biosystems, Weiterstadt
Performance Optimized Polymer 4 (POP-4)	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI PRISM Genetic Analyzer Kapillare: 47 cm, Ld=36 cm, i.d.= 50 µm	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gene-Scan Längenstandard: GS 500 ROX	Applied Biosystems, Weiterstadt
Genetic Analyzer-Puffer mit EDTA	Applied Biosystems, Weiterstadt
Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt
1ml GeneScan Glass Syringe	Applied Biosystems, Weiterstadt
0,5 ml Genetic Analyzer Reaktionsgefäße mit Septa	Applied Biosystems, Weiterstadt

### 7.2.5 Material für die Sequenzierung

ABI PRISM dRhodamine Matrix Standards Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
DNA Sequencing Polymer (POP-6) mit Template Supression Reagent (TSR)	Applied Biosystems, Weiterstadt

### 7.2.6 Software

SPSS 10.0		Hauptkomponentenanalyse Diskriminanzanalyse ANOVA, U-Test
STATISTICA 5.0	Statsoft	Clusterdiagramme, Regressionsanalyse
ARLEQUIN	Schneider et al. 1997	AMOVA Mikrosatelliten
WINAMOVA 1.55	Excoffier et al. 1992	AMOVA (RAPD's)
POPGENE VERSION 1.32	YEH et al. 1997	
GENEPOP, VERSION 3.1	Raymond & Rousset, 1995	Mikrosatellitenanalyse
AMOVA-PREP	MILLER, 1998	Erstellen der Distanzmatrix für die AMOVA
MANTEL	LIEDLHOFF 1999	Signifikanztest für Isolation by distance
AFLP-SURV	VEKEMANS, 2002	Genetische Distanzen, genetische Diversität, $F_{ST}$ , (RAPD's)
ABI PRISM 310 COLLECTION SOFTWARE	Applied Biosystems, Weiterstadt	Fragmentanalyse
GENESCAN ANALYSIS SOFTWARE	Applied Biosystems, Weiterstadt	Fragmentanalyse
GENOTYPER V. 2.0	Applied Biosystems, Weiterstadt	Fragmentanalyse

### 7.2.7 Polymerase

Für alle PCR-Anwendungen wurde die DYNAZYME™ II rekombinante DNA-Polymerase von Finnzymes verwendet. Die Cycle Sequencing PCR wurde mit dem „ABI PRISM DRHODAMINE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING READY REAKTION KIT“ mit AMPLITAQ POLYMERASE durchgeführt.

### **7.3 Probenahme und Probenaufbereitung**

Für die Populationsgenetischen Untersuchungen wurden pro Fläche 30 Tiere als Zufallsstichprobe einer einheitlich bewirtschafteten Fläche entnommen. Als Mindestabstand zu den Nachbarflächen wurde ein Randstreifen von 3 m nicht besammelt.

Für die weiteren populationsgenetischen Analysen wurden 19 Individuen mit der RAPD-PCR untersucht und 30 Individuen sind in die Auswertung der Mikrosatellitenanalyse eingeflossen.

Die zur genetischen Analyse verwendeten Tiere wurden hauptsächlich mit Handbesammlungen gewonnen bzw. als Beifang in Lebendfallen für Kleinsäuger (Hengstlerfallen) vorgefunden. Die in flüssigem Stickstoff abgetöteten Tiere wurden unter Laborbedingungen gereinigt, aufgeschnitten und der Darminhalt entfernt. Zur weiteren genetischen Analyse wurde das Muskelgewebe unter flüssigem Stickstoff zermörsert und bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Zur Isolierung der DNA wurde das DNEASY TISSUE KIT der Firma Qiagen eingesetzt. Das System basiert darauf, dass die DNA-Lösung durch eine Silikagel-Membran zentrifugiert wird, durch die dann Waschpuffer zentrifugiert werden. Am Ende der Prozedur wird dann die gereinigte DNA aus der Membran eluiert. Bei dieser Methode war der Gehalt störender Verunreinigungen (z.B. Mucosaccharide) relativ gering. Für die DNA-Isolierung wurden jeweils 15 mg Schneckengewebe eingesetzt. Als Gewebe wurde nur Material des Mantels der Schnecke verwendet, da das Fußgewebe höhere Anteile störenden Schleims enthält. Das unter flüssigem Stickstoff zermörserte Gewebe wurde nach den Vorgaben des Herstellers bei  $55\text{ °C}$  eine Stunde im Wärmeschrank inkubiert. Die restlichen Arbeitsschritte hielten sich ebenfalls streng an die Vorgaben des Herstellers. Die Elution wurde mit  $2 \times 200\ \mu\text{l}$  Elutionspuffer durchgeführt. Das erste Eluat wurde verworfen, da es die meisten Verunreinigungen enthielt. Das zweite Eluat wurde für die anschließenden PCR eingesetzt.

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Spektralphotometers Gene Quant II ermittelt.

Um den Erfolg der Isolierung zu überprüfen und die Qualität der DNA in der Stammlösung zu kontrollieren, erfolgte zusätzlich eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proben auf 0,8%igen Agarosegelen, die 1:3000 mit Ethidiumbromid vorgefärbt waren. Als Puffersystem wurde TBE-Puffer verwendet.  $15\ \mu\text{l}$  der DNA-Stammlösung wurden mit  $4\ \mu\text{l}$  Stop-Lade-Mix versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Auf diese Weise lassen sich Aussagen über Menge und Reinheit der DNA machen.

Nach ca. 45 Min. und einer elektrischen Spannung von 4 V/cm Gel-Länge wurde jedes Gel auf dem Leuchttisch fotografiert und dokumentiert.

## **7.4 RAPD-PCR**

### **7.4.1 Durchführung der RAPD-PCR**

Nach vorangegangenen Tests und Optimierungen wurde die PCR mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

Nach einer anfänglichen Denaturierung von 5 Minuten bei 94°C erfolgten 40 Wiederholungen von 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Annealing bei 38 °C ( bei 60 und 70 %igem GC-Gehalt der Primer) und 40°C (bei 80%igem GC-Gehalt der Primer), 120 Sek. Primerextension bei 72°C. Nach einer abschließenden Extension von 10 Minuten bei 72°C wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Ein 25 µl PCR-Reaktionsansatz bestand aus 2,5 µl PCR-Puffer, 2 µl Template-DNA mit einer DNA-Menge pro Ansatz von 50-100 nmol, 2,5 µl Primer (25 pmol), 0,5 µl dNTP'S (200 µmol/l), 0,25 µl Polymerase (0,5 U) und 17,25 µl H<sub>2</sub>O (bidest.).

### **7.4.2 Primertest der RAPD-Primer**

Um auswertbare Polymorphismen zu erkennen, wurden mehr als 160 Primer getestet. Kriterien zur Auswahl geeigneter Primer waren gute Auswertbarkeit und hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Gute Auswertbarkeit bedeutet, dass die erzeugten Banden eine ausreichende Stärke aufweisen und im Agarose-Gel ausreichend von einander getrennt werden konnten. Zusätzlich zu den 150 hier aufgeführten Primern (Tabelle 3) wurden noch verschiedene Primer getestet, die in anderen populationsgenetischen Studien des Institutes verwendet wurden. Die Primer der Roth-Kits sind mit den häufig verwendeten Operon-Kits identisch.

Tabelle 3: Übersicht über die getesteten RAPD-Primer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anzahl</b>
Roth Primer Kit 170	10
Roth Primer Kit 270	10
Roth Primer Kit 370	10
Roth Primer Kit 470	10
Roth Primer Kit 180	10
Roth Primer Kit 280	10
Roth Primer Kit 380	10
Roth Primer Kit 480	10
Roth Primer Kit A	20
Roth Primer Kit B	20
Roth Primer Kit C	20
Roth Primer Kit D	20

### 7.4.3 Verwendete RAPD-Primer

In die Auswertung sind letztendlich vier Primer eingegangen, die sich zum einen durch einen hohen Polymorphiegrad und andererseits gute Auswertbarkeit durch gut unterscheidbare Bandenpositionen und eine hohe Zahl von polymorphen RAPD-Markern auszeichneten. Tabelle 4 zeigt die Primer und ihre genaue Basensequenz. Der GC-Gehalt der vier Primer lag zwischen 60 und 80%, was unterschiedliche Annealingtemperaturen für die Primer-Anlagerung erforderte. Die Annealingtemperatur wurde zu Beginn durch einen Temperaturgradienten ermittelt. Der Primernamen „Arion lus.“ wurde für einen Primer verwendet, der keinem der oben angeführten Primer-Kits entstammt und ursprünglich für eine andere Organismenart beschafft wurde.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten RAPD-Primer

<b>RAPD-Primer</b>	<b>5'&gt;3'</b>	<b>GC-Gehalt</b>	<b>annealing</b>
270-5	GCC CTC TTC G	70%	38 °C
380-3	GGC CCC ATC G	80%	40 °C
480-4	CGC CAC GAG C	80%	40 °C
Arion lus.	GTA GTC TCG C	60%	38 °C

#### **7.4.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Der Nachweis der PCR-Produkte fand auf 1,2%igen Agarosegelen statt. Die Auftrennung des 25 µl PCR-Ansatz erfolgte auf ca. 5 mm starken Gelen mit einer Größe von 15 X 15 cm. Die Gele wurden während des Abkühlvorgangs mit 4 µl Ethidiumbromid versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nach einer Laufzeit von ca. 5 h bei 100 V wurden die Gele im UV-Durchlicht (254 nm) unter Verwendung eines Filters mit einer digitalen Kamera (Kodak DC 120) fotografiert und zur späteren Auswertung gespeichert.

#### **7.4.5 Datenerfassung**

Die RAPD-Bandenmuster der einzelnen Individuen wurden mit der Analysesoftware „Kodak Digital Science“ bearbeitet und die Fragmentlängen der einzelnen Bandenpositionen ermittelt. Jeder Marker wurde bei allen untersuchten Individuen entweder als fehlend oder vorhanden dokumentiert. Eine Bande wurde nur dann als solche gewertet, wenn sie mindestens zweimal in verschiedenen PCR-Ansätzen und Gelen als Bande festgestellt wurde.

Die daraus resultierende binäre 0/1- Matrix (siehe Anhang) wurde für die weiteren statistischen Analysen verwendet.

#### **7.4.6 Auswertebereich**

Der Auswertebereich der einzelnen Primer richtete sich nach Reproduzierbarkeit und Auswertbarkeit. Bei Primer Roth 270-5 wurden Fragmente zwischen 460 und 1860 bp in die Auswertung einbezogen, bei Primer Roth 380-3 Fragmente zwischen 530 und 1840 bp, bei Primer Roth 480-4 Fragmente zwischen 510 und 1860 bp und bei Primer „Arion lus.“ waren es Fragmente zwischen 380 und 1940 bp.

Darüber hinaus wurden nur Fragmente in der Auswertung berücksichtigt, die in zwei von drei Wiederholungen reproduzierbare Ergebnisse liefern konnten.

#### **7.4.7 Molekulargenetische Artunterscheidung zwischen *Arion lusitanicus* und *Arion rufus***

Da die Individuen der Art *Arion lusitanicus* von *Arion rufus* /*Arion ater* im Gelände kaum und im Labor nur durch Sektion bestimmt werden konnten, wurde zusätzlich zur Sektion, das Untersuchungsmaterial mit Hilfe Der RAPD-PCR getestet. Es wurde ein Primer eingesetzt, der deutliche Bandenunterschiede im Agarose-Gel aufzeigen konnte (Roth A 16). Nur im Untersuchungsgebiet Wahlen sind jedoch Individuen beider Arten gesammelt worden. Diese Individuen, die als *Arion rufus* determiniert wurden, hatten alle eine deutlich rote Färbung, im Gegensatz zu den bräunlich gefärbten *Arion lusitanicus*.

### **7.5 Mikrosatellitenanalyse**

#### **7.5.1 Test der Mikrosatellitenprimer**

In dieser Arbeit wurden insgesamt 14 Primerpaare getestet, die in anderen Studien zur Auswertung von Mikrosatelliten bei Schnecken eingesetzt worden sind. Es sind nur Primer aus Arbeiten über Landschnecken verwendet worden, die meisten allerdings stammen von Gehäuseschnecken und nicht von Nacktschnecken. Die Primer mit der Bezeichnung „Arin“ stammen von *Arion intermedius* (BROOKS et al. 2001), die mit der Bezeichnung „HA“ von *Helix aspersa* (Guiller 2000) und „Hita“ von *Helicella itala* (Wirth 1999).

Tabelle 5: Übersicht über die getesteten Mikrosatellitenprimer, Primerbezeichnung, Basensequenz des Primers in 5'-3'-Richtung, Genbank-Nummer, eingesetzte Annealingtemperatur und Literaturzitat

<b>Bezeichnung 5'&gt;3'</b>		<b>Genbank- Accession- Nr.</b>	<b>Annealing</b>	<b>Zitat</b>
<b>Arin 1 F</b>	GTG TGG GCA TTA AAT ATA C	AF335765	58°C	BROOKS ET AL. 2001
<b>Arin 1 R</b>	GAT GTG TCG ATA TGC AAT AG			
<b>Arin 2 F</b>	GCA CGT GTG AAT GCC ATA AC	AF335766	58°C	BROOKS ET AL. 2001
<b>Arin 2 R</b>	GTA CGA CTA ACC CTC AAC CT			
<b>Arin 3 F</b>	AGG CAA CGA CTG GCT TAC TC	AF335767	58°C	BROOKS ET AL. 2001
<b>Arin 3 R</b>	AAT ACT TTC CAT CAA CTC GG			
<b>Arin 4 F</b>	ACG CAG ATT AGC AGT GTT AG	AF335768	50°C	BROOKS ET AL. 2001
<b>Arin 4 R</b>	GTA CAT CTG TCT GTG CGG TG			
<b>Arin 5 F</b>	AAT CTG GTT CAT CGG TCA AG	AF335769	58°C	BROOKS ET AL. 2001
<b>Arin 5 R</b>	ATA GAT TTT CTA GAG ATC CC			
<b>Arin 6 F</b>	CAT CAG TCT AGG CGG GGA AC	AF335770	58 °C	BROOKS ET AL. 2001
<b>Arin 6 R</b>	CGC TCA ATA TCG ACC ACC TG			
<b>Ha 6 – F</b>	TTA TCC GCT TGA TAT ATC CT	AF204932	51,4°C	GUILLER, A. 2000
<b>Ha 6 – R</b>	ACT CGT ACA TGG TTG AAA AC			
<b>Ha 7 – F</b>	GCC ATA TGG GAT AAA ATA CCG GTG	AF204933	54°C	GUILLER, A., 2000
<b>Ha 7 – R</b>	CGC CCC TTG TTT ACA CGA GAA A			
<b>Ha 8 – F</b>	AGT TTG CTG GTT TGT ACA CTC G	AF204937	51,4°C	GUILLER, A. 2000
<b>Ha 8 – R</b>	CGT TTT TAG CTC TTG AAT ACG G			
<b>Ha 11 – F</b>	CGT GTA CTA CTG GGC AAC GT	AF204938	54°C	GUILLER, A. 2000
<b>Ha 11 – R</b>	ACG GAA AGA GAC AGA AAG TGA G			
<b>Ha 13 – F</b>	AAA ATA GTT CCT GCA TGT TAC GTA	GAF204930	54°C	GUILLER, A. 2000
<b>Ha 13 – R</b>	CTG GTG TTA ACA GCG AAG TTC T			
<b>Hita 2 – F</b>	TGT CCT CAC CTT CCT CAG CA	AF060904	57°C	WIRTH, T. 1999
<b>Hita 2 – R</b>	GGA ATG GAG GTG GAG GCG GC			
<b>Hita 4 – F</b>	CAG TTC CAT GTC TGC TAG GC	AF060906	55°C	WIRTH, T. 1999
<b>Hita 4 – R</b>	TGC AAC CAA CTG AGC TAG GG			
<b>Hita 5 – F</b>	AAA CGA AAC TCA GCC AGC TA	AF060907	57°C	WIRTH, T. 1999
<b>Hita 5 - R</b>	CAG CAT CTG CTG CGG GGG TG			



### **7.5.3 Mikrosatelliten-PCR**

Die Mikrosatelliten-PCR wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Nach einer anfänglichen Denaturierung von 5 Minuten bei 94°C erfolgten 40 Wiederholungen von 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Annealing bei der spezifischen Annealingtemperatur, 120 Sek. Primerextension bei 72°C. Nach einer abschließenden Extension von 10 Minuten bei 72°C wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Ein 25 µl PCR-Reaktionsansatz bestand aus 2,5 µl PCR-Puffer, 2 µl Template-DNA mit einer DNA-Menge pro Ansatz von 50-100 nmol, 2,5 µl Primer (jeweils 25 pmol), 0,5 µl dNTP'S (200 µmol/l), 0,25 µl Polymerase (0,5 U) und 17,25 µl H<sub>2</sub>O (bidest.).

### **7.5.4 Kapillarelektrophoretische Fragmentlängendetektion**

Die Fragmentlängenbestimmung der PCR-Produkte erfolgte mit der lasergestützten Kapillarelektrophorese des ABI Prism<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Zur Denaturierung der PCR-Produkte wurden 2 µl jeder Probe mit 12 µl Formamid versehen.

Die Proben wurden vor dem Lauf bei 95 °C auf einem Thermoblock denaturiert und danach auf Eis gelagert. Als interner Längenstandard wurde GENESCAN<sup>®</sup> -500 (ROX) Size Standard, als Laufpuffer 1 x Genetic Analyzer Puffer verwendet. Die Kapillare (50 µm, 47 cm) wurde mit dem Polymer POP-4<sup>TM</sup> gefüllt. Die Injektionszeit von 4 Sekunden bei einer Spannung von 15 KV und 60 °C brachten hierbei die besten Ergebnisse.

### **7.5.5 Erfassung und Auswertung der Mikrosatellitendaten**

Unabhängig vom Detektionssystem wurden bei der Mikrosatellitenanalyse jeweils die höchsten Peaks (Primer Arin 1) bzw. stärksten Banden im Agarosegel (Primer HA-7) als Allele gewertet. Bei beiden Auftrennungsmethoden waren regelmäßig sogenannte Stotterbanden zu erkennen, die allerdings recht gut durch ihre geringere Größe im Elektropherogramm und ihrer geringeren Intensität im Agarosegel von den Allel-Banden unterschieden werden konnten.

Heterozygote Individuen wurden nur dann als solche erfasst, wenn beide Peaks bzw. Banden eine nahezu identische Intensität aufwiesen. Die Daten des Primers Arin 1 wurden am Genetic Analyzer 310 (PE Biosystems) erfasst und mit Hilfe der GENESCAN ANALYSIS - Software ausgewertet. Die GENESCAN-Software erlaubt die

Darstellung der Ergebnisse in Form eines Elektropherogramms. Dieses stellt die Fragmente als Peaks dar. Jede Probe ist sowohl einzeln als auch kombiniert darstellbar. Als Allelsignale werden die Peaks aufgenommen, die innerhalb der direkt an sie anschließenden Wiederholungseinheit die stärksten Signalintensitäten aufweisen. Peaks, die diesen Allelsignalen vorangehen oder diesen folgen und um die Hälfte kleiner als diese sind, werden als Artefaktsignale (Stotterbanden, Schattenbanden) gewertet.

### **7.5.6 Acrylamid-Gelelektrophorese der HA-7 Mikrosatelliten-Allele**

Um die Fragmentlänge des Mikrosatellitenprimer HA-7 genauer zu überprüfen, wurden die Allele von mehreren Individuen aus Herl, Wahlen und Belm nochmals mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese getestet. Dazu wurde ein 5 %iges Acrylamidgel hergestellt (6,23 ml Acrylamid (40%), 10 ml 5 x TBE, 33,42 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 350 µl APS) und 10 Minuten in einer Saugflasche auf dem Magnetrührer im Vakuum entgast. Danach wurden 18 µl TEMED zugegeben und das Gel im Gelträger zwischen zwei Glasplatten gegossen und eine Stunde Polymerisieren lassen. Danach wurde der Gel-Träger in die mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gestellt und an die Kühlung angeschlossen. Das Gel wurde bei 180 V fünf Stunden laufen gelassen und danach in Ethidiumbromidlösung (10 µl /100 ml) angefärbt und fotografiert.

## **7.6 Sequenzierung der Mikrosatellitenloci**

### **7.6.1 Aufreinigung der Mikrosatelliten-PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte aus der Mikrosatelliten-PCR wurden auf ein 1,4 %iges Agarosegel aufgetragen, das mit 3 µl Ethidiumbromid versetzt und bei 4 V/cm eine Stunde aufgetrennt wurde. Die Ziel-DNA war als Bande unter dem UV-Licht detektierbar und wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Ziel-DNA in dem Gelstück wurde mit dem QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT extrahiert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Zentrifugation durch eine Silikagel- Membran, die selektiv größere Mengen an Nukleinsäuren bindet. Während die DNA an die Membran bindet, werden die Oligonukleotide, die kleiner als 50 bp sind, Salze und andere Moleküle abzentrifugiert. Die Vorgehensweise hielt sich dabei streng an die Empfehlungen des Herstellers.

### 7.6.2 Cycle-Sequencing-PCR

Die aus dem Gel extrahierte DNA wurde als Template für die nachfolgende Sequenzier-PCR eingesetzt. Ein 20 µl PCR Ansatz bestand aus:

2 µl Template-DNA (ca. 50 – 100 ng)

8 µl Terminator Ready Reaktion Mix

0,5 µl Primer (10 pmol/µl)

9,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Die Sequenzier-PCR wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Tabelle 6: PCR-Temperaturprofile der Mikrosatellitenprimer

Primer Arin 1	PCR-Temperaturprofil	HA-7	PCR-Temperaturprofil
96°C	5 min	96°C	5 min
96°C	10 sec.	96°C	10 sec.
54°C	15 sec.	60°C bzw 45	15 sec.
60°C	4 min	60°C	4 min
4°C	∞	4°C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 39 mal wiederholt.

### 7.6.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierreaktion, von ihren Puffersalzen, überschüssigen Primern, dNTP`s und Polymerase mit Hilfe des Reinigungskits DyeEx 2.0 Spin Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Prinzip der Gelfiltrations-Chromatographie. Während die großen DNA-Fragmente das Gel durch Zentrifugation durchwandern, werden die dRhodamin-Terminatoren in der Gelmatrix zurückgehalten. Dieser Schritt ist notwendig, da nicht eingebaute fluoreszenz-markierte Terminatoren störende Signale während der Sequenzierung hervorrufen können. 20 µl PCR-Produkt wurden in den Vorgang eingesetzt, wobei sich die Vorgehensweise genau an die Angaben des Herstellers hielt. Das Elutionsvolumen entsprach weitgehend der Ausgangsmenge.

#### **7.6.4 DNA-Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese**

Bei der Kapillar-Elektrophorese (ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer) werden die markierten Produkte über einen Autosampler elektrokinetisch in eine mit Polymer (POP 6) gefüllte Glaskapillare (50 µm, 61 cm) als Trennmedium injiziert. Die fluoreszenzmarkierte DNA wird in der Kapillare elektrophoretisch ihrer Länge nach aufgetrennt und passiert dabei ein Fenster, wo die Fluorezenzfarbstoffe, durch einen Laser angeregt, Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren.

Das spektrographisch separierte Licht wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen und als elektrisches Signal gespeichert. Diese Daten werden dann mit der Analyse-Software „ABI PRISM™ SEQUENCING ANALYSIS™ 3.0“ (PE Biosystems) zu Elektropherogrammen umgewandelt, in denen die Basen der DNA durch Peaks unterschiedlicher Farbe dargestellt werden.

Die Läufe wurden mit dem Modul „SEQPOPC RAPID (1ML) E COPY“ durchgeführt. Bei einer Injektionszeit von 60 bis 100 Sekunden (je nach Stärke des Signals) und einer Spannung während des Laufs von 15 KV und 50 °C.

## 8. Populationsgenetische Auswertung

### 8.1 Genetische Diversität

Wie bei allen dominanten Markern, können bei der RAPD-PCR heterozygote und homozygote Individuen nicht unterschieden werden. Daraus resultiert eine schwierige statistische Berechnung der Allelfrequenzen (LYNCH & MILLIGAN 1994). Die Schätzung der Allelfrequenzen ist deshalb relativ ungenau (JORDE 1999). Dieser methodische Fehler kann durch die Erhöhung der Stichprobengröße oder durch statistische Korrekturen ausgeglichen werden (BOROWSKY 2000).

Drei Methoden sind entwickelt worden, um diesen systematischen Fehler der Unterschätzung der Nullallel-Frequenz zu beheben (KRAUS 2000).

a. **Quadratwurzel-Methode** (BERNSTEIN 1930)

Die Häufigkeit des Nullallels eines bestimmten Locus wird über die Quadratwurzel der Null-Homozygote geschätzt.

b. **Lynch & Milligan- Berechnung**

Um einen systematischen Fehler zu minimieren haben LYNCH & MILLIGAN (1994) vorgeschlagen, dass alle Loci mit einer Nullallel-Häufigkeit von weniger als  $3/N$  Null-Homozygoten von der Nullallel-Frequenz-Berechnung ausgeschlossen werden. Zudem empfehlen sie den Fehler durch eine hohe Stichprobengröße ( $> 100$  pro Population) zu minimieren. Durch eine große Stichprobenzahl wird so die Zahl der nicht berücksichtigten Loci minimiert.

c. **Bayesisches Schätzverfahren** (ZHIVOTOVSKI 1999)

Da auch der LYNCH & MILLIGAN – Ansatz zu falschen Berechnungen der Heterozygotie und genetischen Distanz führen kann, wurde von ZHIVOTOVSKI 1999 das Bayesische Verfahren eingeführt. Dieser Ansatz ergab in einer Studie über Koniferen, bei denen neben dem diploiden Chromosomensatz auch der haploide Chromosomensatz verfügbar war, völlig fehlerfreie Berechnungen der Heterozygotie, genetischen Distanz und F-Statistik (KRAUS 2000).

### **Shannon-Information-Index (LEWONTIN 1972)**

Die genetische Diversität  $H_s$  beruht auf der Berechnung der Spezies-Diversität nach Shannon-Weaver (1949). Sie ist ein Maß für die relative Variabilität der Allelverteilung in einer Population. Sie berechnet sich aus der relativen Häufigkeit der einzelnen Banden (Allele).

$$H_s = - \sum_{i=1}^n p_i \cdot \ln p_i$$

$p_i$  = relative Abundanz der i-ten Bande  
 $n$  = Anzahl der Bandenpositionen

Der Shannon- Index ist relativ unempfindlich gegenüber den Effekten, die durch den dominanten Charakter der RAPD-Marker hervorgerufen werden. Es sind daher keine Informationen über das Paarungsverhalten erforderlich. Der Shannon Index verzichtet auf die Schätzung des Heterozygotiegrades (DAWSON 1995, BUSSELL 1999).

Diese Vorteile sind neben der einfachen Handhabung auch der Grund für die häufige Verwendung in RAPD-Studien (vgl. CHALMERS et al. 1992, MONAGHAN & HALLORAN 1996, MARTIN et al. 1997, WOLFF et al. 1997).

Auf die Mikrosatelliten- Daten angewendet, misst der Shannon-Index die Variation in einem Daten-Set. Normalerweise basiert der Index  $H_s$  auf dem  $\log_{10}$ . In einigen Studien wird jedoch auch der  $\ln$  verwendet, was den Vergleich der Daten erschwert.

Die genetische Diversität nach NEI (1973) ist synonym mit der erwarteten Heterozygotie (NEI 1973) und wurde für die Mikrosatellitendaten mit Hilfe des Programms POPGENE (YEH et al. 1997) berechnet.

### Gen-Diversität (NEI 1973)

$$H_T = 1 - \sum_k \left( \frac{\sum_i p_{ik}}{n} \right)^2$$

$p_{ik}$  = Frequenz des k-ten Allels der Population i  
 $n$  = Anzahl der Populationen

Die genetische Diversität nach Lynch & Milligan (1994) wurde für die RAPD-Daten mit Hilfe des Programms AFLP-SURV (VEKEMANS 2002) berechnet.

Gen-Diversität nach LYNCH & MILLIGAN 1994

$$\hat{H}_j = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \hat{H}_j(i)$$

$$\hat{H}_j(i) = 2\hat{q}_j(i)[1 - \hat{q}_j(i)] + 2\text{Var}[\hat{q}_j(i)]$$

$$\hat{q} = \hat{x}^{1/2} \left( 1 - \frac{\text{Var}(\hat{x})}{8\hat{x}^2} \right)^{-1}$$

$$\text{Var}(\hat{q}) = (1 - \hat{x}) / 4N$$

$\hat{H}_j$  = geschätzte Gen-Diversität, (entspricht der erwarteten Heterozygotie unter HWG)

$\hat{H}_j(i)$  = Gen-Diversität am  $i_{\text{ten}}$  Locus (Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Gene, die zufällig einer Population j entnommen werden, am  $i_{\text{ten}}$  Locus unterscheiden)

$\hat{q}$  = geschätzte Frequenz des Nullallels

$\text{Var}(\hat{q})$  = Varianz der Allel-Frequenz

$\text{Var}(\hat{x})$  = Varianz der Frequenz der Null-Homozygoten (Null-Allele)

$\hat{x}$  = Anteil der Individuen der Stichprobe, die das Allel (Marker) nicht besitzen

L = Zahl der Loci

N = Stichprobengröße, Zahl der untersuchten Individuen

**Das 3/N Kriterium:** Sind mehr als 10 % der Null-Allel-Frequenzen kleiner als 3/N, sind die errechneten Werte möglicherweise ungenau. Man sollte vorher die betreffenden Allele von der Berechnung ausschließen (LYNCH & MILLIGAN 1994). Bei 19 untersuchten Individuen sollten also <10 % der Null-Allelfrequenzen eine Allelfrequenz von < 0,157 aufweisen. Da in der vorliegenden Arbeit mehr als 10 % der Marker eine Null-Allel-Frequenz von weniger als 0,157 aufwiesen, wurden alle Loci von der Berechnung ausgeschlossen, in denen das Null-Allel weniger als vier mal vorkommt.

Dieses Ausschlussprinzip ist für populationsgenetische Untersuchungen praktikabler, als die von LYNCH UND MILLIGAN (1994) vorgeschlagene Stichprobengröße von 100 Individuen, da der Fehler formelbedingt bei steigender Stichprobengröße geringer wird.

## 8.2 F-Statistik

Die F-Statistik nach WRIGHT (1951, 1965) wird bei codominanten genetischen Markern wie Allozymen und Mikrosatelliten eingesetzt. Die Berechnung des Parameters  $F_{ST}$  beruht auf dem „Insel-Modell“ (WRIGHT 1969). Dieser Index „F“ vergleicht die erwartete Heterozygotie einer bestimmten hierarchischen Ebene mit der reduzierten Heterozygotie auf Grund einer Populationsstrukturierung.

Die F-Statistik gibt Angaben über die Populationsstruktur auf einer niedrigeren Ebene. HEWITT & BUTLIN (1997) definieren Populationsstruktur als Variation in der genetischen Zusammensetzung einer Population. Populationsstruktur ist neben Inzucht die zweite Ursache für nichtzufällige Paarung und die daraus resultierende Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Es ist zu erwarten, dass die Gesamtpopulation einer Art in verschiedene, unterschiedlich stark von einander abgetrennte, Populationen unterteilt ist. Die Konsequenz einer Populationsstruktur ist die genetische Differenzierung von Subpopulationen. Sie wird als Verschiebung von Allelfrequenzen in den einzelnen Subpopulationen definiert.

Genetische Differenzierung kann verschiedene Ursachen haben:

- Lokale Adaptation unterschiedlicher Genotypen in verschiedenen Populationen
- Genetische Drift in einzelnen Subpopulationen
- Gründereffekt (zufällige Unterschiede in der Allelfrequenz von Individuen, die eine neue Population gründen)

$F_{ST}$ -Werte können zwischen 0 und 1 liegen. Liegt  $F_{ST}$  nahe 1, tritt in einer Population der Verlust jeglicher Variabilität auf (starke Populationsstruktur durch Fixierung bestimmter Allele in den einzelnen Subpopulationen). Der Wert 0 bedeutet im Umkehrschluss, dass keine Populationsstruktur vorhanden ist, da alle Subpopulationen die gleichen Allelfrequenzen aufweisen.

Für die Interpretation von  $F_{ST}$ -Werten wurden folgende Klassen vorgeschlagen (WRIGHT 1978, HARTL & CLARK 1997):

- 0 – 0,05: geringe genetische Differenzierung
- 0,05 – 0,15: mittlere genetische Differenzierung
- 0,15 – 0,25: große genetische Differenzierung
- > 0,25: sehr große genetische Differenzierung

IAM basierte F-Statistik (NEI 1977):

$$F_{ST} = \frac{H_T - \bar{H}_S}{H_T}$$

$H_S$ = Erwartete Heterozygotenrate in der Subpopulation, die sich unter der Annahme ergeben würde, dass zwischen den Individuen der gepoolten Subpopulationen Zufallspaarungen stattfinden würden.

$$H_S = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

$H_T$ = Erwartete Heterozygotenrate in der Gesamtpopulation, die sich unter der Annahme ergeben würde, dass zwischen den Individuen der gepoolten Subpopulationen Zufallspaarungen stattfinden würden.

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

$p_i$ = Frequenz des i-ten Allels, gemittelt über alle k Subpopulationen

**8.3  $\Phi$ -Statistik**

Um die Unterteilung der genetischen Populationsstruktur zu untersuchen, wurde das Programm WINAMOVA VER. 1.55 (Analysis of molecular Variance, EXCOFFIER et al. 1992) eingesetzt. Das Programm wurde ursprünglich für RFLP-Haplotypen entwickelt, ist aber auch sehr gut für RAPD-Daten anwendbar (HUFF et al. 1993, PALACIOS et al. 1997). Bei der AMOVA wird die Gesamtvarianz des gesamten Datensatzes einzelnen Varianzkomponenten zugeordnet. Es werden die Varianzkomponenten „innerhalb von Populationen“ und „zwischen Populationen“ unterschieden. Die Berechnung der Signifikanz-Level beruht auf Permutationen.

Die in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten Berechnungen beruhen auf den Verfahren nach WEIR & COCKERHAM (1984), bei denen es keine Einschränkung hinsichtlich der Stichprobengröße und Populationsanzahl gibt. Diese Methode ist varianzbasiert und erleichtert es, in verschiedenen Studien ermittelte Werte zu vergleichen. Die sogenannte  $\Phi$ -Statistik ist ein Äquivalent zur F-Statistik von WRIGHT (1951), die zur Analyse codominanter genetischer Marker entwickelt wurde (REYNOLDS et al. 1983). Die Berechnungen werden in WIN-AMOVA auf der Basis paarweise quadrierter Euklidischen Distanzen zwischen den molekularen Phänotypen durchgeführt. Molekulare Phänotypen sind in diesem Fall die Anzahl der unterschiedlichen Bandenpositionen pro Individuum. Die verschiedenen Datensätze mit den Euklidischen Distanzen zwischen den Individuen (EXCOFFIER et al. 1992)

wurden mit dem Programm AMOVA-PREP vorbereitet. Dieses Programm wurde speziell für dominante Marker wie RAPD's und AFLP's entwickelt (MILLER 1998).

#### F-Statistik nach WEIR & COCKERHAM (1984)

$$\phi_{ST} = \frac{\sum_i \sum_u u \sigma_B^2}{\sum_i \sum_u u \sigma_T^2} \quad , \text{ die Varianzen der Allelfrequenzen werden über alle Allele } i \text{ und Loci } u$$

aufsummiert, wobei die Gesamtvarianz der Allelfrequenz gleich der Summe ihrer Komponenten ist

$$\sigma_T^2 = \sigma_B^2 + \sigma_W^2 + \sigma_I^2$$

$\sigma_T^2$  = Gesamtvarianz der Allelfrequenz

$\sigma_B^2$  = Varianz der Allelfrequenz zwischen Subpopulationen

$\sigma_W^2$  = Varianz der Allelfrequenz zwischen Individuen einer Subpopulation

$\sigma_I^2$  = Varianz zwischen Gameten innerhalb Individuen

Genfluss auf der Basis von RAPD-Daten kann mit Hilfe des  $\Phi_{ST}$ -Wertes berechnet werden (SINCLAIR et al. 1996, GOMES et al. 1998, GRASHOF-BOKDAM et al. 1998, BENDER 1999).

#### Genfluss (SLATKIN & Barton 1989)

$$N_e m \approx 0,25 \left( \frac{1}{\phi_{ST} - 1} \right)$$

$N_e m$  = Anzahl der Migranten pro Generation

$N_e$  = effektive Populationsgröße

$m$  = Migrationsrate (Anteil neuer Allele, der in einer Generation durch Migration in eine Subpopulation gelangt)

Die genetische Verbindung zwischen Populationen hängt weitgehend vom Ausmaß des Genflusses ab. Genfluss ist der Austausch von Allelen zwischen Populationen durch Austausch von Individuen (Migration). Migration hat natürlich nur dann Genfluss zur Folge, wenn sich die ausgetauschten Individuen fortpflanzen. Die wichtigste Auswirkung von Genfluss ist die Einbringung neuer Allele und damit die Erhöhung der genetischen Variabilität.

Ist  $N_e m$  „viel kleiner als 1“ gelten die untersuchten Populationen als räumlich getrennt (WRIGHT 1978).

Der Genfluss zwischen Populationen ist zum einen abhängig von der geografischen Distanz zwischen ihnen (JAIN & BRADSHAW 1966), zum anderen aber auch von den

Verbreitungsmechanismen einer Art. Auch die Art der Vermehrung kann eine Rolle spielen.

Die Differenzierung von Populationen ist demnach u.a. vom Genfluss zwischen ihnen abhängig. Zur Beschreibung unterschiedlicher Populationsstrukturen wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen (HANSKI & GILPIN 1991).

- Das „Kontinent-Insel-Modell“ ist durch Genfluss von einer großen (kontinentalen) Population in Richtung einer kleinen „Inselpopulation“ gekennzeichnet

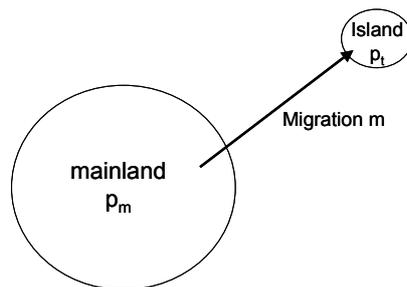


Abbildung 6: Schematische Verbindung zwischen Besiedlungsquelle und „Vorposten“ nach dem Kontinent-Insel-Modell

- Beim „Insel-Modell“ tritt Genfluss mit gleicher Wahrscheinlichkeit zwischen allen kleinen Populationen auf.  $F_{ST}$  als Maß für genetische Divergenz wird in diesem Modell hauptsächlich durch genetische Drift beeinflusst (WRIGHT 1978, SLATKIN & VOELM 1991, WEIR & COCKERHAM 1993).

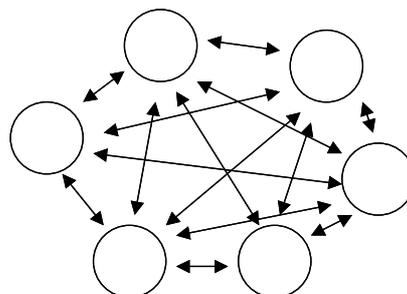


Abbildung 7: Schematische Verbindung zwischen verschiedenen Populationen nach dem Insel-Modell

- Beim „Sprungbrett“ - oder „Trittsteinmodell“ tritt Migration nur zwischen benachbarten Populationen auf

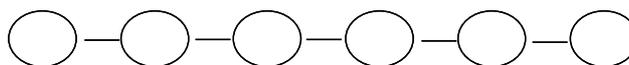


Abbildung 8: Schematische Verbindung zwischen Populationen nach dem Trittstein-Modell

- und schließlich das „Isolation durch Entfernung-Modell“ (SLATKIN 1993) beschreibt in einer kontinuierlich verbreiteten Population einen mit der Entfernung abnehmenden Genfluss.

#### **8.4 Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht**

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) ist eines der wichtigsten Erkenntnisse der theoretischen Populationsgenetik und beschreibt den Zusammenhang zwischen Genotyp- und Allelfrequenzen eines Locus in einer Population diploider Organismen. Dieser populationsgenetische Grundsatz geht davon aus, dass sich die Population im Gleichgewicht befindet, zufällige Paarung zwischen allen Individuen herrscht und keine evolutionären Kräfte auf die Population einwirken. Nach dem HWG wird die Beziehung zwischen Allelfrequenz und Genotypfrequenz einer Population, für einen Locus mit zwei Allelen, folgendermaßen charakterisiert:

Tabelle 7: Erwartete Allel-Häufigkeit eines Zwei-Allel-Systems der Genotypen in Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Genotyp	AA	Aa	aa
HW-Häufigkeit	$p^2$	$2pq$	$q^2$

In Populationen diploider Organismen wird das HWG innerhalb von zwei Generationen erreicht. Für zufällig sich paarende Populationen diploider Organismen gleicht die Heterozygotität der Häufigkeit von Heterozygoten. Da die Heterozygotität nur Allelfrequenzen und keine Genotypfrequenzen verwendet, kann sie als Maß für genetische Diversität von Populationen herangezogen werden, die sich nicht im HWG befinden (NEI 1973).

Anhand der Daten aus der Mikrosatelliten-Analyse wurde mit Hilfe des  $X^2$ -Tests für jede Teilpopulation die Übereinstimmung der genotypischen Struktur mit der entsprechenden Hardy-Weinberg-Struktur getestet.

Mit dem Programm GENEPOP 3.0 wurde ein p-Wert eines log-likelihood ('G') basierten Exact Test einer Markov-Chain-Methode (GOUDET 1996) berechnet.

Heterozygotität (H)

$$H_{\text{exp}} = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

$H_{\text{exp}}$  = erwartete Heterozygotenrate bzw. Gen-Diversität (D)

$k$  = Anzahl der Allele

$p_i$  = Frequenz des  $i$ -ten von  $k$  Allelen

$$H_{\text{obs}} = \sum_{j=1}^i \frac{h_j}{i}$$

$H_{\text{obs}}$ : durchschnittliche Heterozygotenrate ist der Durchschnittswert über alle untersuchten Loci (NEI 1987)

$h_j$  = Heterozygotenrate für den  $j$ -ten Locus

$i$  = Zahl der Loci

$j$  = Locus

Abweichungen vom erwarteten Heterozygotiegrad kann verschiedene Ursachen haben. Ein Heterozygoten-Überschuss kann ein Hinweis auf überdominante Selektion oder Auskreuzen (outbreeding) sein. Viele Untersuchungen zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Heterozygotie und verschiedenen Fitness-Komponenten, wie Lebensfähigkeit, Größenwachstum und anderen physiologischen Variablen (MITTON & GRANT 1984, ALLENDORF & LEARY 1986, MITTON 1994). Besonders in ökologisch wenig stabilen Lebensräumen bedeutet eine hohe Heterozygotie eine bessere Anpassungsfähigkeit von Populationen an sich ändernde Selektionsbedingungen (FRANKEL et al. 1995, RANKEVICH et al. 1996, NEVO 1997).

In kleinen, geschlossenen Populationen nimmt die Wahrscheinlichkeit von Paarungen zwischen verwandten Tieren zu. Verwandte Tiere haben einen oder mehrere Vorfahren und sind durch die Übereinstimmung eines Teils ihres Genoms charakterisiert. Diese Herkunftsgleichheit der Allele einiger Genorte bewirkt die Ähnlichkeit zwischen den Verwandten. Sie nimmt zu, wenn der erwartete Anteil der Genorte mit herkunftsgleichen Allelen steigt. Bei der Paarung von verwandten Tieren (Inzucht) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass Vater und Mutter eine Kopie des gleichen Allels eines gemeinsamen Vorfahrens an die Nachkommen vererben, die dann an diesem Genort herkunftsgleich sind. In einer Population wird der erwartete Anteil von Genorten, der durch die steigende Inzucht homozygot geworden ist, durch den Inzuchtkoeffizienten nach WRIGHT (1921) ausgedrückt. Die Homozygotiezunahme in der Population ist zumeist mit Leistungseinbußen in Form von Inzuchtdepressionen vor allem im Bereich Fitness und Reproduktion der Tiere verbunden (IRGANG 2001). Der sogenannte  $F_{IS}$ - Wert misst die Abnahme der Heterozygotität in Individuen einer Subpopulation durch nicht zufällige Paarung (z.B. Inzucht). „I“ steht hier für Individuum und „S“ für Subpopulation. Der  $F_{IS}$  –Wert misst das Verhältnis von Allelen zwischen Individuen der gleichen Subpopulation (BALLOUX

& LUGON-MOULIN 2002). Ein positiver Wert für  $F_{IS}$  bedeutet verringerte Heterozygotität (Inzucht), ein negativer Wert erhöhte Heterozygotität (Auskreuzen). Die genetische Grundlage der Verschlechterung durch Inzucht ist einmal die vermehrte Expression rezessiver, unvorteilhafter Gene bei verringerter Heterozygotenrate und der häufig beobachteten Überlegenheit Heterozygoter auch gegenüber Homozygoter mit dominanten Allelen, was als Heterosis-Effekt bezeichnet wird (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 1987).

Eine Voraussage der Auswirkungen verringerter genetischer Variation ist allerdings nicht möglich, da die negativen Auswirkungen von Inzucht auch von lokalen Standortbedingungen abhängig sind (DUDASH 1990).

Der  $F_{IS}$ -Koeffizient kann jedoch auch dazu verwendet werden, um festzustellen, ob die gesammelten Tiere einer Stichprobe zu einer oder mehreren Subpopulationen gehören. In diesem Fall werden jedoch andere mögliche Erklärungen wie verschiedene Fortpflanzungsmodi oder einer möglichen Sozialstruktur vernachlässigt, die zu Inzucht führen können (BALLOUX & LUGON-MOULIN 2002).

Inzucht-Koeffizient  $F_{IS}$  (WEIR 1990)

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_I}{H_s}$$

$H_I$  = Heterozygotität in einer Gruppe ingezüchteter Individuen (Subpopulation)  
 $H_s$  = erwartete Heterozygotität in einer zufallsgepaarten Subpopulation (S)

### 8.5 Ähnlichkeitsmaße

Die Bandsharingrate (BSR) ist ein Ähnlichkeitsindex, der die Grundlage vieler populationsgenetischer Arbeiten darstellt. Diese Methode stellt im Gegensatz zu anderen Ähnlichkeitsindices, die Bedeutung gemeinsamer Banden im Vergleich zu polymorphen Banden in den Vordergrund. Die BSR neigt zur Überschätzung der Homozygotie in Populationen (KANTANEN et al. 1995).

Bandsharingrate (NEI & LI 1979)

$$BSR = \frac{2 \cdot n_{xy}}{n_x + n_y}$$

$n_{xy}$ : Anzahl gemeinsamer Banden der Individuen x und y  
 $n_x$ : Anzahl der Banden bei Individuum x  
 $n_y$ : Anzahl der Banden bei Individuum y

Die Bandsharingraten wurden für alle untersuchten Stichproben errechnet. Die Bandsharingrate für eine Stichprobe ergibt sich aus dem Mittelwert der, in diesem Fall, 171 Einzelwerte der paarweisen Vergleiche aller Individuen einer Stichprobe.

Darüber hinaus wurde auch die Bandsharingrate aus dem paarweisen Vergleich aller Stichproben ermittelt. Unterscheidet sich die Bandsharingrate zwischen zwei Standorten signifikant von den Bandsharingraten der beiden Einzelstichproben, wird dieses als Hinweis auf getrennte, genetisch voneinander abgrenzbare, Subpopulationen gewertet. Der Signifikanztest wurde mit dem Mann-Whitney-Test (U-Test) durchgeführt. Die Voraussetzung für diesen Test, die gleiche Verteilungsform, ist bei den berechneten Stichproben erfüllt.

### **8.6 Genetische Distanzen**

Genetische Distanzen drücken genetische Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten zwischen Individuen oder Populationen aus. Distanzmaße sind daher Indikatoren für die Unähnlichkeit zwischen Populationen. Die Distanz ist das Gegenteil der Ähnlichkeit ( $\text{Distanz} = 1 - \text{Ähnlichkeit}$ ). Sie ist das Ergebnis von Evolution und daher die Konsequenz der Wirkung verschiedener Evolutionsfaktoren, wie z.B. Mutation, Selektion, Zufallsdrift, Migration und umweltstochastischen Einflüssen.

Diese genetische Distanzen müssen von Distanzmaßen unterschieden werden, wie sie in Chromosomen – Untersuchungen Verwendung finden. Hier werden Abstände zwischen genetischen Markern auf den Chromosomen gemessen und in „map units“ angegeben.

Wenn molekulare Marker in genügender Dichte vorhanden sind, ist ein Großteil des Genoms darstellbar, wodurch die Schätzung der Distanz zwischen Genotypen sehr genau wird. Zur Berechnung der genetischen Distanz wird für jeden Marker das Vorhandensein bestimmter Banden tabellarisch binär dargestellt. Die paarweisen Distanzen zwischen Genotypen werden dann auf Grund bestimmter Distanzmaße (unterschiedlich je nach Markertyp) ermittelt.

Die Genetische-Distanz nach NEI (1972) ist unter Annahme des IAM-Modells formuliert worden. Sie wurde für die Mikrosatellitendaten mit Hilfe des Programms POPGENE berechnet.

### Genetische Distanz (NEI 1972)

$$D_s = -\log\left(\frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}\right)$$

$J_x$ : Zahl der Allele in Population x

$J_y$ : Zahl der Allele in Population y

$J_{xy}$ : Zahl der Population x und y gemeinsamen Allele

### **8.7 Test auf "Isolation by distance"**

Der statistische Zusammenhang zwischen geografischer und genetischer Distanz wurde mit Hilfe des Mantel-Tests abgesichert (Mantel 1967). Der Mantel-Test eignet sich besonders für ökologische und genetische Daten, da er, um gesicherte Aussagen machen zu können, nicht unabhängige und normalverteilte Daten benötigt. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Computer-Programms MANTEL-VERSION 2 (LIEDLHOFF 1999) durchgeführt.

### **8.8 Clusteranalyse**

Die Clusteranalyse wurde mit dem Programm STATISTICA (Version 5) durchgeführt. Es wurde der in populationsgenetischen Untersuchungen häufig verwendete UPGMA-Algorithmus (unweighted pair-group method using arithmetic averages) verwendet (SNEATH & SOKAL 1973).

In der Clusteranalyse wird versucht, mit Hilfe dieses Algorithmus` relativ homogene Gruppen zu identifizieren und diese in separate Cluster einzuordnen. Dabei wird zwischen den zu beurteilenden Objekten paarweise die Ähnlichkeit dieser Objekte gemessen. Danach werden in einem zweiten Schritt mit Hilfe dieser Ähnlichkeiten Gruppen gebildet, wobei der Abstand zwischen Objekten innerhalb einer Gruppe stets kleiner ist als zwischen den Gruppen (URBAN et al. 1992). Die Ergebnisse der einzelnen Fusionsschritte wurden anschließend als Dendrogramm dargestellt.

### **8.9 Hauptkomponentenanalyse**

Die Hauptkomponentenanalyse (HKA) oder Principal Component Analysis (PCA), wird zur multivariaten Analyse der Verteilung genetischer Variation eingesetzt. Durch eine Reduktion der Information vieler, mehr oder weniger miteinander korrelierter Variablen (z.B. RAPD-Marker), auf einige wenige unabhängige Hauptkomponenten kann ein Großteil der im Datensatz enthaltenen Variation graphisch dargestellt werden (MANLY 1994). Die Hauptkomponenten beschreiben somit verschiedene Dimensionen des zugrundeliegenden Datensatzes. Die HKA basiert direkt auf der 0/1 Matrix der RAPD-Fingerprints (siehe Anhang) und lässt gegebenenfalls einen Trend in der Datenstruktur erkennen (SKROCH et al. 1993, NESBITT et al. 1995).

Die Durchführung der Hauptkomponentenanalyse erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS.

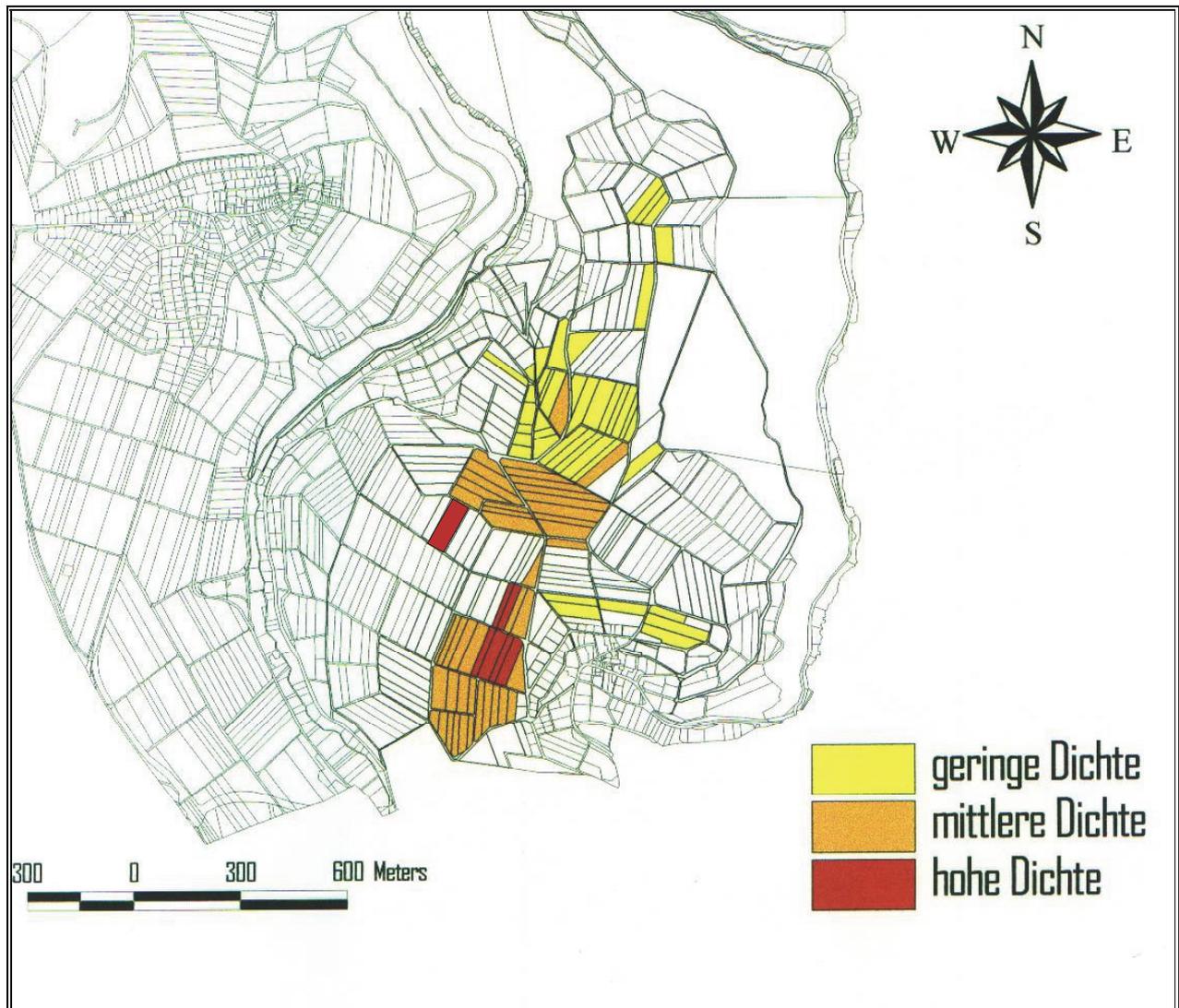
### **8.10 Diskriminanzanalyse**

Ziel der Diskriminanzanalyse ist die maximale Trennung von zwei oder mehreren Gruppen mehrdimensionaler Daten mit Hilfe von einer oder mehreren Diskriminanzfunktionen und das Aufdecken darin enthaltener Falschzuordnungen, wodurch die Möglichkeit zu einer Optimierung der Trennung der Gruppen gegeben ist (LOZÁN 1998). Die Durchführung der Diskriminanzanalyse erfolgte ebenfalls mit dem Statistik-Programm SPSS.

## 9. Ergebnisse

### 9.1 Dichteschätzung von *Arion lusitanicus*

Die parzellenweise Erfassung der Individuendichte ergab im Untersuchungsgebiet Herl auf 44 Parzellen einen Nachweis von *Arion lusitanicus*. Drei Parzellen wiesen hohe Dichten auf, 18 zeigten eine mittlere Dichte und auf den restlichen 23 Parzellen konnten nur geringe Individuendichten festgestellt werden. Bemerkenswerterweise waren alle drei Schläge mit hohen *Arion lusitanicus* Dichten ökologisch bewirtschaftete Flächen.



Karte 9: Dichte von *Arion lusitanicus* im Untersuchungsgebiet Herl

Tabelle 8: *Arion lusitanicus*- Dichte an den Untersuchungsstandorten, Flächengröße und Höhe ü. NN

Flächenbezeichnung	Populationsdichte	Flächengröße in m <sup>2</sup>	m über N.N.
Herl-Konv1	mittel	3500	460
Herl-Konv2	mittel	2400	450
Herl-Konv3	mittel	3800	450
Herl-Konv4	gering	9200	415
Herl-Bio1	mittel	4100	450
Herl-Bio2	hoch	12100	455
Herl-Bio3	hoch	7500	460
Herl-Bio4	hoch	8000	465
Herl-Brache	mittel	1800	450
Herl-Wiese	mittel	5500	470
Wahlen	mittel	14800	330
Belm	mittel	700	85

## 9.2 RAPD-PCR

Die Abbildung 9 zeigt eine beispielhafte Darstellung eines Agarosegels der Population „Konv1“ mit dem Primer Roth 270-5. Hier kann man die deutlich unterschiedlichen Amplifikationsmuster der einzelnen Individuen erkennen. Keines der untersuchten Individuen zeigte mit einem zweiten Individuum ein identisches Muster. Die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit wird mit Ähnlichkeitsmaßen wie z.B. der Bandsharingrate (BSR) oder Distanzmaßen angegeben.

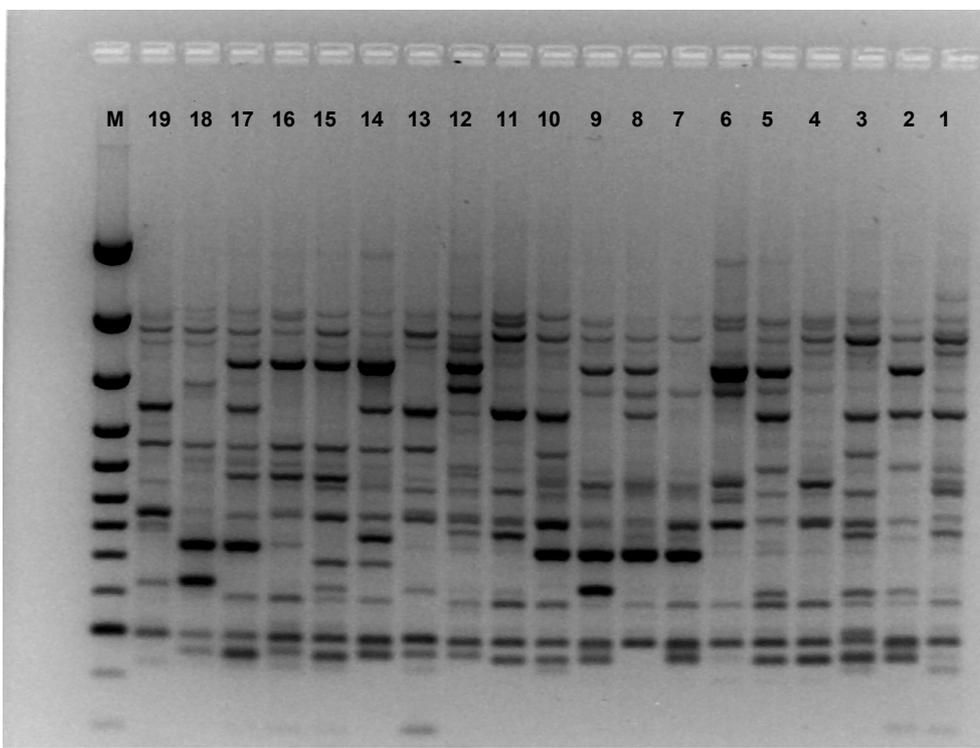


Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung eines Agarose-Gels zur Auswertung des RAPD-Primers Roth 270-5 des Standortes „Konv1“

### 9.2.1 Polymorphiegrad

Die vier ausgewählten Primer ergaben insgesamt 94 Bandenpositionen (RAPD-Marker). Die Primer Roth 270-5 und Roth 380-3 hatten, bei Betrachtung aller untersuchten Populationen, jeweils eine monomorphe Bande. Das bedeutet, das DNA-Fragment wurde bei allen untersuchten Individuen nachgewiesen (vgl. Tabelle 10). Bei den 26 Bandenpositionen des Primer 270-5 waren demnach 25 bzw. 96 % der Banden polymorph, von den 19 Bandenpositionen des Primers 380-3 waren 18 bzw. 95 % polymorph. Die beiden anderen Primer 480-4 und Arion lus. mit jeweils 25 bzw. 24 Bandenpositionen waren vollständig polymorph.

Dieser hohe Polymorphiegrad war neben der guten Auswertbarkeit und guten Reproduzierbarkeit ausschlaggebend für die Auswahl der vier Primer.

Ein über alle Stichproben monomorpher Marker war ein Fragment des Primers Roth-270-5 mit einer Fragmentlänge von ca. 520 Basenpaaren. Das zweite monomorphe Fragment hatte eine Länge von ca. 820 Basenpaaren und wurde mit dem Primer Roth-380-3 amplifiziert.

Tabelle 9: Auswertebereich, Zahl der RAPD-Marker (Banden im Agarosegel), Anzahl polymorpher Banden und Polymorphiegrad der verwendeten Primer

Primer	Auswertebereich in bp	Bandenanzahl.	polymorphe Banden	%
<b>270-5</b>	460-1860	26	25	96,2
<b>380-3</b>	530-1840	19	18	94,7
<b>480-4</b>	510-1860	25	25	100,0
<b>Arion lus.</b>	380-1940	24	24	100,0

Betrachtet man die einzelnen Populationen getrennt, waren insgesamt 28 Bandenpositionen bei mindestens einer Stichprobe monomorph. Die Zahl monomorpher Banden variierte dabei zwischen den untersuchten Standorten von sechs in der Fläche „Konv2“ bis 20 in der Fläche „Konv4“. Die Zahl der monomorphen Banden, bzw. ihr Anteil an der Gesamtzahl der Bandenpositionen in einer Population können einen ersten Einblick in die genetische Variabilität der untersuchten Individuen auf den Flächen liefern. Die höchsten Werte der relativen Häufigkeit monomorpher Banden waren auf den Flächen „Konv4“ mit 23,8 % und „Belm“ mit 19,4 % zu beobachten. Alle anderen Standorte zeigten Werte von 8 % - 16 %.

Die Gesamtzahl der DNA-Fragmente bzw. Bandenpositionen, die in einer Stichprobe amplifiziert wurden, variierte dabei zwischen 67 Fragmenten in der Stichprobe „Belm“ und 83 in der Stichprobe „Bio 2“.

Tabelle 10: Übersicht über monomorphe RAPD-Marker (Primerbezeichnung/Länge des Fragments in bp, Summe der monomorphen Banden, %=relative Häufigkeit monomorpher Banden an der Gesamtzahl der RAPD-Marker, n= Zahl der RAPD-Marker der Population)

<b>RAPD-Marker</b>	<b>Konv. 1</b>	<b>Konv. 2</b>	<b>Konv. 3</b>	<b>Konv. 4</b>	<b>Bio 1</b>	<b>Bio 2</b>	<b>Bio 3</b>	<b>Bio 4</b>	<b>Brache</b>	<b>Wiese</b>	<b>Wahlen</b>	<b>Belm</b>
270-5/500								X				
270-5-520	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
270-5/870	X		X	X		X	X	X	X	X		
270-5/1020				X								
270-5/1860		X		X	X	X	X	X				X
380-3/530	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X
380-3/655	X	X		X		X	X		X		X	X
380-3/830	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
380-3/900			X	X	X		X	X				X
380-3/970				X		X						
380-3/1190					X	X			X			X
380-3/1360				X								
380-3/1520			X	X						X		
380-3/1840							X					
480-4/510				X						X		
480-4/640	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
480-4/785								X			X	
480-4/1000			X	X			X	X			X	X
480-4/1115			X	X		X	X	X	X	X	X	X
480-4/1440			X						X			
480-4/1650			X	X	X	X					X	X
480-4/1700	X								X			
480-4/1860	X											X
Arion lus./590		X										
Arion lus./950				X		X						
Arion lus./1070	X		X	X		X	X	X	X	X	X	
Arion lus./1400				X				X				
Arion lus./1940	X		X	X		X	X	X		X	X	X
<b>Summe</b>	10	6	13	20	7	14	13	13	11	10	11	13
<b>%</b>	13,4	8,0	16,8	23,8	9,0	16,8	16,5	16,3	13,5	12,2	14,5	19,4
<b>n</b>	82	76	77	82	77	83	79	79	80	81	76	67

Im Vergleich der drei untersuchten Regionen konnte kein sogenannter „diagnostischer Marker“ oder „privates Allel“ gefunden werden. Ein diagnostischer Marker zeichnet sich dadurch aus, dass er bei allen Individuen des einen Standortes gefunden wird, während er allen Individuen eines anderen Standortes fehlt.

Wie aus Tabelle 10 zu ersehen ist, unterscheiden sich die einzelnen Flächen hinsichtlich ihres Polymorphiegrades. Ob es Unterschiede zwischen den beiden Flächenbewirtschaftungssystemen gibt, wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft. Hierzu wurden die vier Bioflächen und die vier konventionellen Flächen zu Gruppen zusammengefasst. Der U-Test ergab keinen signifikanten Zusammenhang

zwischen Flächennutzung und Polymorphiegrad ( $p=0,885$ ) und Zahl der RAPD-Marker ( $p=0,686$ ).

### 9.2.2 Bandsharingrate (BSR)

Die Bandsharingrate ist ein Ähnlichkeitsmaß, das den Grad an Übereinstimmung zweier Amplifikationsmuster darstellt.

Es gab in den analysierten Stichproben keine zwei Individuen, die identische Muster aufwiesen. Die Bandsharingraten der paarweisen Vergleiche aller Individuen lagen zwischen 0,377 bei zwei Individuen von „Herl-Wiese“ und „Wahlen“ und 0,917 bei jeweils einem Individuum innerhalb der Standorte „Konv1“, „Konv2“, „Konv4“, „Bio1“, „Bio2“ und „Bio3“. Das bedeutet, dass die beiden Individuen, die die geringste Ähnlichkeit aufwiesen, zu ca. 38 % identische Amplifikationsmuster zeigten und die beiden Tiere mit der höchsten BSR zu ca. 91 % identisch waren.

Die Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Bandsharingraten der paarweisen Vergleiche aller Individuen, dargestellt in zehn Gruppen von  $> 0,80$  bis 0,39-0,35.

Hier zeigt sich, dass die meisten Werte in der Bandsharing-Gruppe von 0,69 bis 0,65 lagen, gefolgt von der Gruppe 0,64 bis 0,60 und 0,74 bis 0,70. Extremwerte von  $> 0,80$  und  $< 0,50$  kamen erwartungsgemäß nur in geringen Zahlen vor.

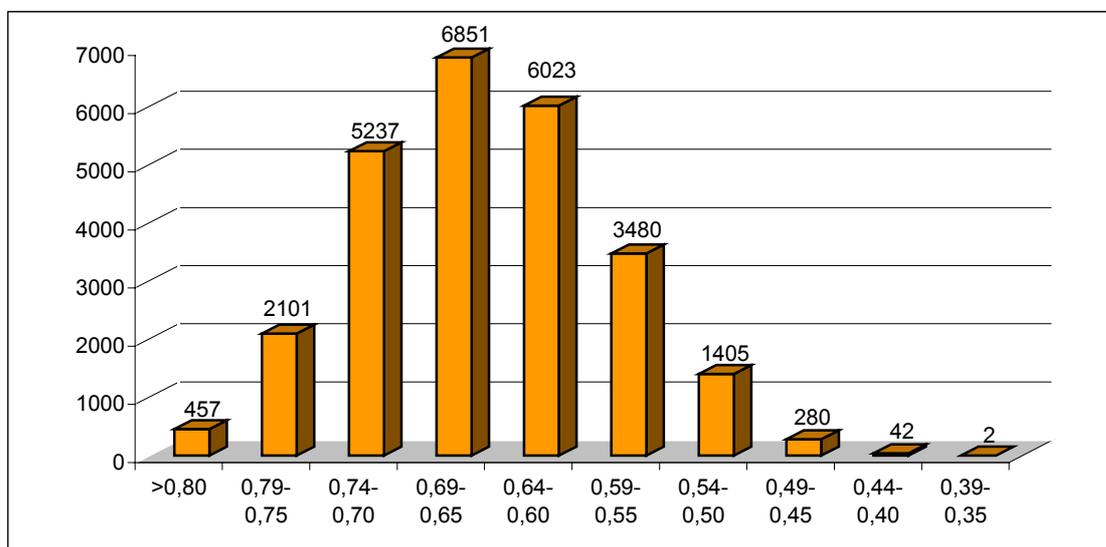


Abbildung 10: Verteilung der paarweisen BSR aller Individuen auf 10 Gruppen von  $> 0,80$  bis 0,39-0,35

Die in Abbildung 11 dargestellte relative Häufigkeit der BSR an der Gesamtzahl der berechneten BSR jeder Kategorie, zeigt die jeweils unterschiedlichen Schwerpunkte der drei Kategorien „innerhalb der Flächen“, „zwischen den Flächen“ und „zwischen den Regionen“. Die relativen Werte beziehen sich in der Kategorie „innerhalb

Flächen“ auf 2052 BSR, in der Kategorie zwischen Regionen auf 7581 BSR, und in der Kategorie „zwischen Standorten“ (in Herl) auf 16245 BSR.

In der Gruppe „innerhalb Flächen“ lag der Schwerpunkt der Werte im Bereich von 0,74 bis 0,70, in der Gruppe „zwischen den Flächen“ bei 0,69 bis 0,65 und in der Gruppe „zwischen Regionen“ lag das Maximum der Werte bei 0,65 bis 0,60.

Die Werte der einzelnen Gruppen waren normalverteilt (KS-Test,  $p < 0,001$  in den Kategorien „innerhalb Flächen“ und „zwischen Regionen“,  $p = 0,007$  in der Kategorie „zwischen Flächen“).

Der Unterschied der BSR der drei Gruppen ist signifikant (Tuckey-Test,  $p < 0,001$ ). Dieser Unterschied blieb auch nach einer Bonferroni-Korrektur signifikant.

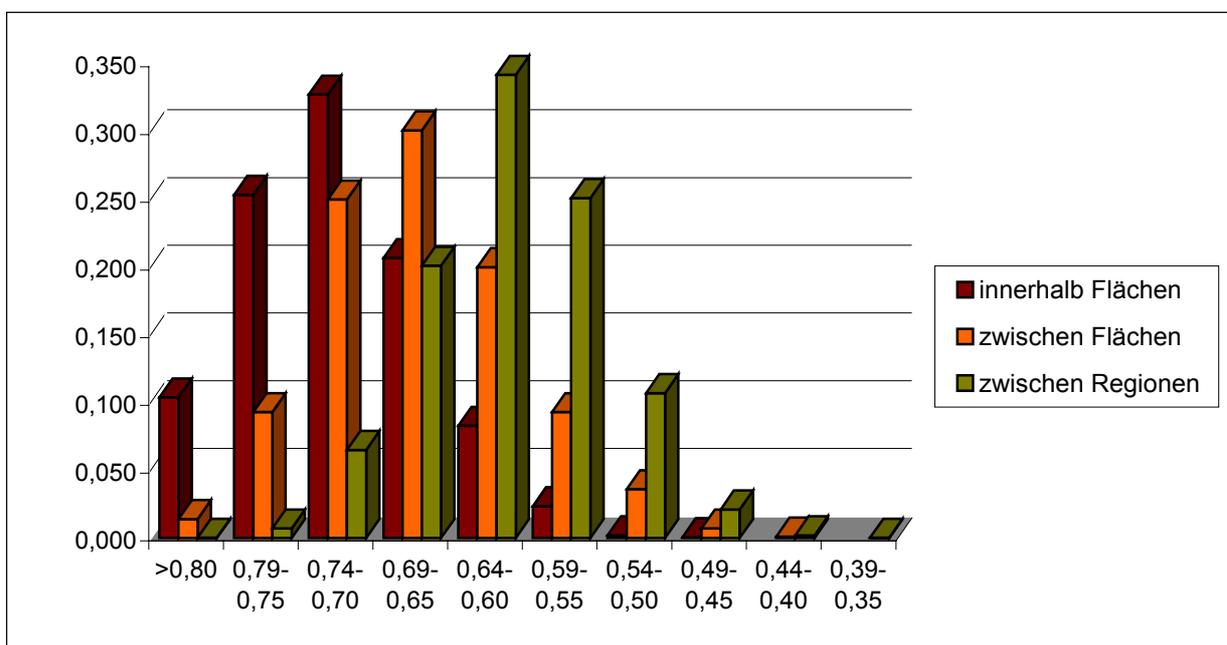


Abbildung 11: Verteilung der Bandsharingraten „innerhalb der Standorte in Herl, zwischen den Flächen und zwischen den Regionen

Die Tabelle 11 (Seite 66) gibt die Mittelwerte aller paarweisen Vergleiche der Individuen der verschiedenen Stichproben an (Diagonale) und die mittlere Bandsharingrate zwischen allen Individuen der verschiedenen Stichproben. Die paarweisen Vergleiche aller Individuen einer Stichprobe ergaben 171 Einzelwerte, beim Vergleich zweier Stichproben wurde der Mittelwert aus jeweils 361 Bandsharingwerten errechnet.

Die Unterschiede der BSR innerhalb der Stichproben wurden mit den BSR zwischen Stichproben mittels Mann-Whitney-Test (U-Test) auf Signifikanz überprüft. Der Signifikanztest soll einen Hinweis darauf geben, ob sich zwei Stichproben hinsichtlich ihrer Bandsharingrate signifikant voneinander unterscheiden.

Die Mittelwerte der Bandsharingraten liegen zwischen 0,665 auf der Parzelle „Konv2“ und 0,784 auf der Fläche „Konv4“ (vgl. Tab. 11). Die hohe Bandsharingrate auf der

Fläche „Konv 4“ wird formelbedingt durch den hohen Anteil monomorpher Banden von 24,3 % hervorgerufen (vgl. Tabelle 10), im Vergleich dazu trägt der geringe Anteil monomorpher Banden in der Stichprobe „Konv2“ von 6,9 % zu der geringen Bandsharingrate bei.

Der paarweise Vergleich der Bandsharingraten zwischen den Standorten zeigt größtenteils geringere Werte als die Einzelstandorte.

Die Bandsharingrate zwischen zwei Populationen wurde mit dem U-Test auf Unterschiede getestet. Bei den meisten Stichproben ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Bandsharingrate zwischen zwei Standorten und den einzelnen BSR innerhalb der Populationen. Es handelt sich dann um zwei genetisch voneinander unterscheidbare Gruppen von Individuen (Populationen). Nur sieben BSR - Berechnungen zwischen Populationen führten zu nicht signifikanten Unterschieden. Der Standort „Konv4“ zeigte mit den Standorten „Konv1“, „Konv3“, „Bio2“, „Bio3“ und „Bio4“ keine signifikanten Unterschiede. Ebenfalls nicht signifikant waren die Unterschiede der BSR zwischen „Wiese“ und „Bio4“ und „Wiese“ und „Bio3“.

Tab. 11: Bandsharingraten innerhalb (Diagonale) und zwischen Standorten  
Signifikanztest:

U-Test (\*\*\*= $p < 0,001$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*= $p < 0,05$ , n.s.=nicht signifikant)

BSR	Konv. 1	Konv. 2	Konv. 3	Konv. 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen	Belm
Konv. 1	0,710±0,052	***		n.s.	***	***	***	***	***	*	***	***
Konv. 2	0,586±0,065	<b>0,665±0,054</b>	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Konv. 3	0,686±0,047	0,616±0,064	<b>0,736±0,045</b>	n.s.	***	***	***	***	***	***	***	***
Konv. 4	0,713±0,048	0,622±0,060	0,733±0,048	<b>0,784±0,042</b>	**	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	*	***
Bio 1	0,660±0,051	0,633±0,057	0,672±0,052	0,693±0,055	<b>0,708±0,056</b>	***	***	***	***	***	***	***
Bio 2	0,684±0,049	0,615±0,064	0,709±0,042	0,730±0,042	0,680±0,052	<b>0,735±0,040</b>	**	***	***	***	***	***
Bio 3	0,686±0,047	0,608±0,065	0,725±0,045	0,732±0,047	0,675±0,057	0,715±0,042	<b>0,729±0,040</b>	*	***	n.s.	***	***
Bio 4	0,685±0,046	0,624±0,058	0,720±0,046	0,745±0,046	0,637±0,059	0,706±0,043	0,717±0,043	<b>0,747±0,043</b>	***	n.s.	*	***
Brache	0,668±0,049	0,589±0,057	0,645±0,049	0,660±0,051	0,632±0,057	0,649±0,055	0,638±0,046	0,638±0,046	<b>0,718±0,058</b>	***	***	***
Wiese	0,674±0,052	0,583±0,067	0,683±0,047	0,706±0,047	0,637±0,059	0,663±0,050	0,685±0,047	0,685±0,047	0,643±0,046	<b>0,685±0,051</b>	***	***
Wahlen	0,614±0,057	0,593±0,059	0,624±0,056	0,637±0,053	0,623±0,065	0,614±0,057	0,617±0,057	0,654±0,048	0,600±0,053	0,608±0,061	<b>0,721±0,062</b>	***
Belm	0,613±0,047	0,586±0,058	0,624±0,052	0,644±0,050	0,631±0,056	0,632±0,048	0,637±0,051	0,626±0,053	0,562±0,043	0,610±0,059	0,570±0,049	0,758±0,067

### 9.2.3 Genetische Diversität

Die Genetische Diversität wurde nach verschiedenen Methoden (vgl. Kapitel 8.1) berechnet und zum Vergleich nach Rangstufen geordnet. Bei RAPD-Analysen haben sich die Diversitätsindices nach LYNCH & MILLIGAN (1994) und ZHIVOTOVSKI (1999) mittlerweile etabliert, da sie speziell dem dominanten Charakter der Marker Rechnung tragen.

In der Tabelle 12 sind die verschiedenen Berechnungsmethoden vergleichend dargestellt. Von der Größenordnung liegen die genetischen Diversitäten aller Berechnungsmethoden in einem ähnlichen Bereich, zwischen ca. 0,170-0,290.

Die Abfolge der Rangstufen soll die Unterschiede der Methoden verdeutlichen. Die beiden Verfahren nach ZHIVOTOVSKI (1999) und LYNCH & MILLIGAN (1994) zeigen grundsätzlich ähnliche Ergebnisse. Die Rangfolge der einzelnen Untersuchungsflächen ist nur bei den beiden Flächen mit den höchsten Diversitätswerten vertauscht („Konv 1“ und „Wiese“). Die Quadratwurzel-Methode (BERNSTEIN 1930) zeigt bei den Flächen geringer und hoher Diversität ebenfalls gute Übereinstimmungen mit den beiden vorherigen Methoden. Auch mit der Methode „Fragment-Frequency“ kommt man zu leicht abweichenden Ergebnissen.

Tabelle 12. Vergleich der genetischen Diversitäten und deren Rangfolge nach verschiedenen Berechnungsmethoden.

	Hj-Frag.-Freq.	Rang	Hj-square-root	Rang	Hj - Zhivotovski	Rang	Hj - L & M	Rang
Konv 1	0,263	2	0,254	1	0,288	1	0,281	2
Konv 2	0,231	6	0,211	8	0,235	11	0,232	10
Konv 3	0,227	7	0,215	7	0,251	6	0,240	6
Konv 4	0,205	11	0,195	11	0,237	10	0,222	11
Bio 1	0,246	3	0,242	3	0,269	4	0,259	4
Bio 2	0,227	7	0,208	9	0,246	8	0,237	8
Bio 3	0,227	7	0,207	10	0,244	9	0,234	9
Bio 4	0,243	4	0,242	3	0,278	3	0,263	3
Brache	0,236	5	0,221	5	0,254	5	0,246	5
Wiese	0,274	1	0,250	2	0,286	2	0,282	1
Wahlen	0,229	10	0,216	6	0,249	7	0,240	6
Belm	0,169	12	0,160	12	0,189	12	0,180	12

Die Abbildung 12 zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen Geländehöhe (m ü. NN) und genetischer Diversität (LYNCH & MILLIGAN 1994). Die Regressionsanalyse ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen beiden Variablen ( $p=0,029$ ,  $R^2=0,466$ ). Dieser Zusammenhang erklärt ca. 50 % der Varianz des Datensatzes. Immerhin beträgt der Höhenunterschied im Untersuchungsgebiet Herl zwischen „Wiese“ (470 m ü. NN) und „Konv4“ (415 m ü. NN) 55 Meter.

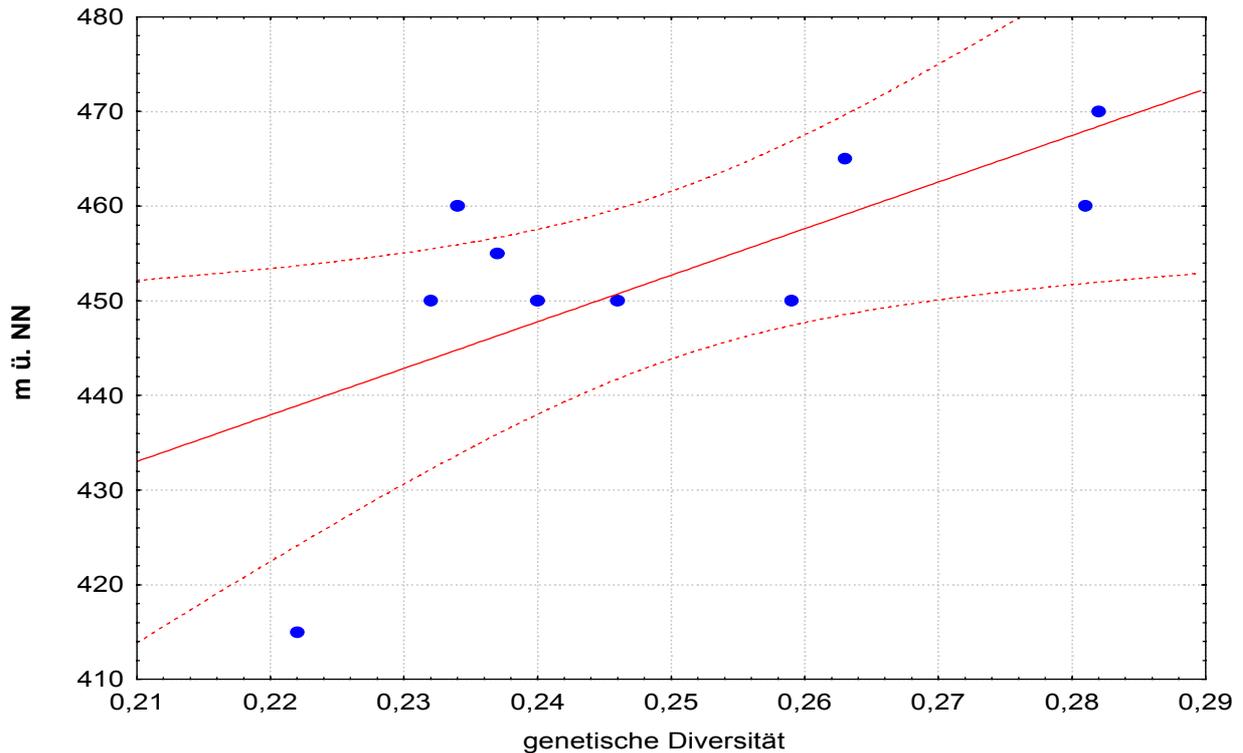


Abbildung 12: Regressionsanalyse: genetische Diversität vs. Geländehöhe (m ü.NN) aller Herler Populationen

### 9.2.4 Genetische Distanzen

Die Berechnung der genetischen Distanzen wurde mit der Methode nach der LYNCH & MILLIGAN (1994) mit dem Programm AFLP-SURV (VEKEMANS 2001) durchgeführt. Das Programm hat den Vorteil, dass man Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, soweit bekannt, mit berücksichtigen kann. Da zusätzlich zur RAPD-Analyse zwei Mikrosatellitenloci untersucht wurden und sich dort eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zeigte, konnte diese in die Berechnungen der genetischen Distanzen mit einfließen (vgl. Tabelle 13).

In Herl liegen die genetischen Distanzen zwischen 0,006 und 0,111, zwischen Wahlen und den anderen Standorten bei 0,078 bis 0,120 und zwischen Belm und den restlichen Flächen bei 0,073 bis 0,137. Zwischen den drei Regionen sind die genetischen Distanzen zwar im Mittel höher als zwischen den Standorten in Herl, man erkennt jedoch, dass einige Distanzen innerhalb von Herl in der Größenordnung der Werte zwischen den Regionen liegen. Die Flächen „Konv2“ und „Brache“ zeigen z.T. große Distanzen zu den anderen Flächen in Herl.

Die genetischen Distanzen zwischen Herl und Wahlen und zwischen Herl und Belm unterscheiden sich signifikant voneinander (U-Test,  $p < 0,001$ ).

Tabelle 13: Genetische Distanz (LYNCH &amp; MILLIGAN 1994) bei Abweichung vom HWG

	Konv. 1	Konv. 2	Konv. 3	Konv. 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen	Belm
<b>Konv. 1</b>												
<b>Konv. 2</b>	0,085											
<b>Konv. 3</b>	0,031	0,077										
<b>Konv. 4</b>	0,040	0,111	0,028									
<b>Bio 1</b>	0,047	0,045	0,049	0,064								
<b>Bio 2</b>	0,035	0,066	0,023	0,031	0,039							
<b>Bio 3</b>	0,029	0,078	0,006	0,029	0,043	0,012						
<b>Bio 4</b>	0,050	0,091	0,023	0,019	0,052	0,034	0,026					
<b>Brache</b>	0,036	0,084	0,071	0,102	0,076	0,068	0,069	0,098				
<b>Wiese</b>	0,019	0,073	0,021	0,035	0,061	0,041	0,020	0,034	0,051			
<b>Wahlen</b>	0,092	0,078	0,090	0,120	0,084	0,100	0,097	0,087	0,098	0,082		
<b>Belm</b>	0,090	0,082	0,090	0,113	0,073	0,088	0,081	0,111	0,137	0,083	0,123	

Eine UPGMA-Clusteranalyse auf Basis der genetischen Distanzen soll die Strukturierung des Datensatzes verdeutlichen (Abbildung 13). Betrachtet man zunächst einmal die drei Untersuchungsgebiete, wird deutlich, dass „Belm“ und „Wahlen“ stark von den Flächen in Herl differenziert sind. Drei Standorte in Herl („Konv2“, „Bio1“ und „Brache“) zeigten ebenfalls hohe Distanzen zu den restlichen Untersuchungsflächen in Herl.

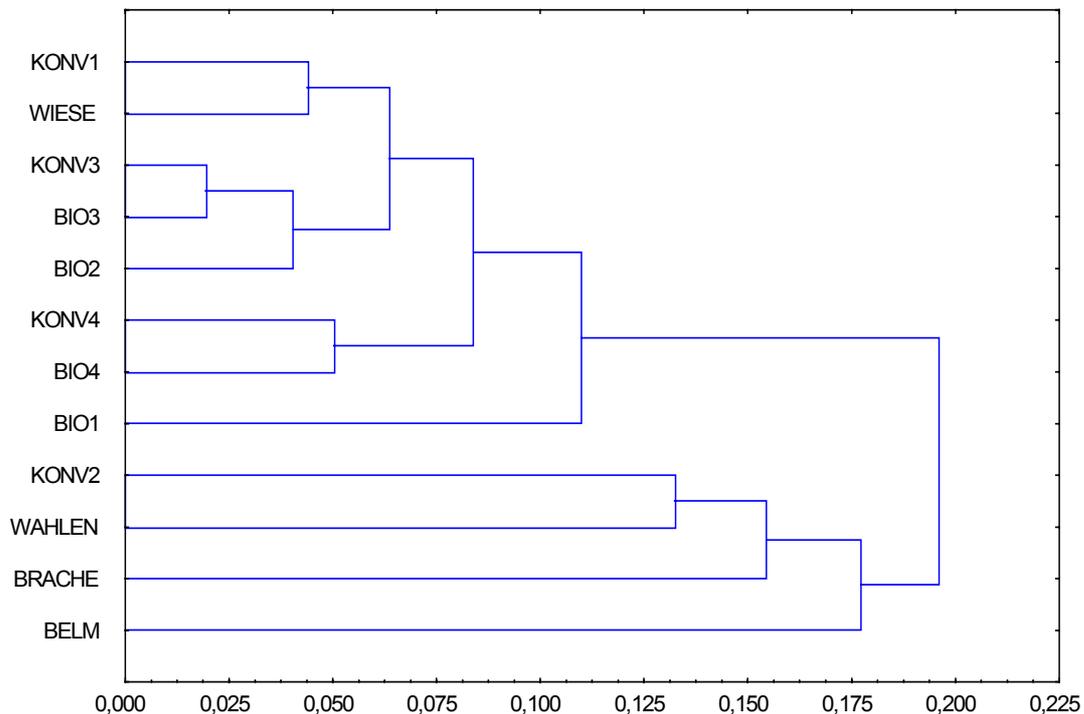


Abbildung 13: UPGMA –Clusterdiagramm, basierend auf den LYNCH &amp; MILLIGAN –Distanzen bei Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (skaliert auf euklidische Distanzen)

### 9.2.5 Populationsunterteilung und Populationsstrukturierung

Wie in Kapitel 8.3 beschrieben, hängt die Populationsstrukturierung entscheidend vom Genfluss zwischen Subpopulationen ab. Ist der Genfluss „viel kleiner als 1“, gelten zwei Populationen als getrennt. Dieses drückt sich dann dementsprechend in einer großen Populationsstrukturierung aus.

Der  $\Phi_{ST}$  –Wert ist ein Maß für die Populationsstrukturierung und gibt die Unterschiede der erwarteten Heterozygotie zwischen einer Subpopulation und der Gesamtpopulation an.

Anhand der Tabelle 14 sieht man, dass alle Herler Standorte keinen Genfluss zu den Referenzgebieten Wahlen und Belm zeigen, was sich dementsprechend in hohen  $\Phi_{ST}$ –Werten ausdrückt.

Differenzierter sieht es bei Betrachtung der Standorte in Herl aus. Hier gibt es zwischen vielen Standorten geringen Genfluss zwischen  $N_e m=1$  und  $N_e m=2$ .

Durch besonders geringen Genfluss zu den übrigen Standorten fallen die beiden Standorte „Brache“ und „Konv2“ auf. Während „Konv2“ zu keinem anderen Standort Genfluss aufweist, findet beim Standort „Brache“ nur mit „Konv1“ leichter Genfluss statt ( $N_e m=1,57$ ).

Den höchsten Genfluss findet mit  $N_e m=9,36$  zwischen den Flächen „Konv3“ und „Bio3“ statt. Diese Flächen liegen zwar nah zusammen, in direkter Nachbarschaft liegt jedoch die Fläche „Bio2“. Immerhin zeigt auch sie zu „Konv3“ mit  $N_e m=3,98$  einen überdurchschnittlich hohen Genfluss.

Tabelle 14:  $\Phi_{ST}$  (unterhalb) und Genfluss ( $N_e m$ , oberhalb der Diagonale)

$\Phi_{ST}$	Konv.1	Konv.2	Konv.3	Konv.4	Bio1	Bio2	Bio3	Bio4	Brache	Wiese	Wahlen	Belm
Konv.1		0,74	1,93	1,86	1,49	1,83	2,15	1,53	1,57	3,207	0,71	0,57
Konv.2	0,251		0,84	0,60	0,42	0,91	0,83	0,82	0,73	0,87	0,74	0,57
Konv.3	0,116	0,228		2,17	1,39	2,49	9,36	2,99	0,83	2,66	0,65	0,52
Konv.4	0,118	0,292	0,103		1,15	1,96	2,33	2,76	0,66	2,17	0,52	0,44
Bio1	0,143	0,150	0,152	0,178		1,68	1,63	1,59	0,89	1,27	0,77	0,67
Bio2	0,120	0,216	0,091	0,113	0,129		3,98	1,81	0,88	1,54	0,59	0,56
Bio3	0,104	0,232	0,026	0,097	0,133	0,059		2,95	0,81	3,42	0,64	0,62
Bio4	0,140	0,234	0,077	0,083	0,136	0,121	0,078		0,69	2,15	0,73	0,49
Brache	0,137	0,255	0,230	0,273	0,219	0,220	0,235	0,264		1,29	0,58	0,37
Wiese	0,071	0,222	0,086	0,103	0,164	0,139	0,068	0,104	0,162		0,79	0,65
Wahlen	0,261	0,252	0,277	0,322	0,243	0,295	0,280	0,254	0,298	0,239		0,38
Belm	0,305	0,304	0,324	0,361	0,270	0,307	0,289	0,336	0,398	0,277	0,392	

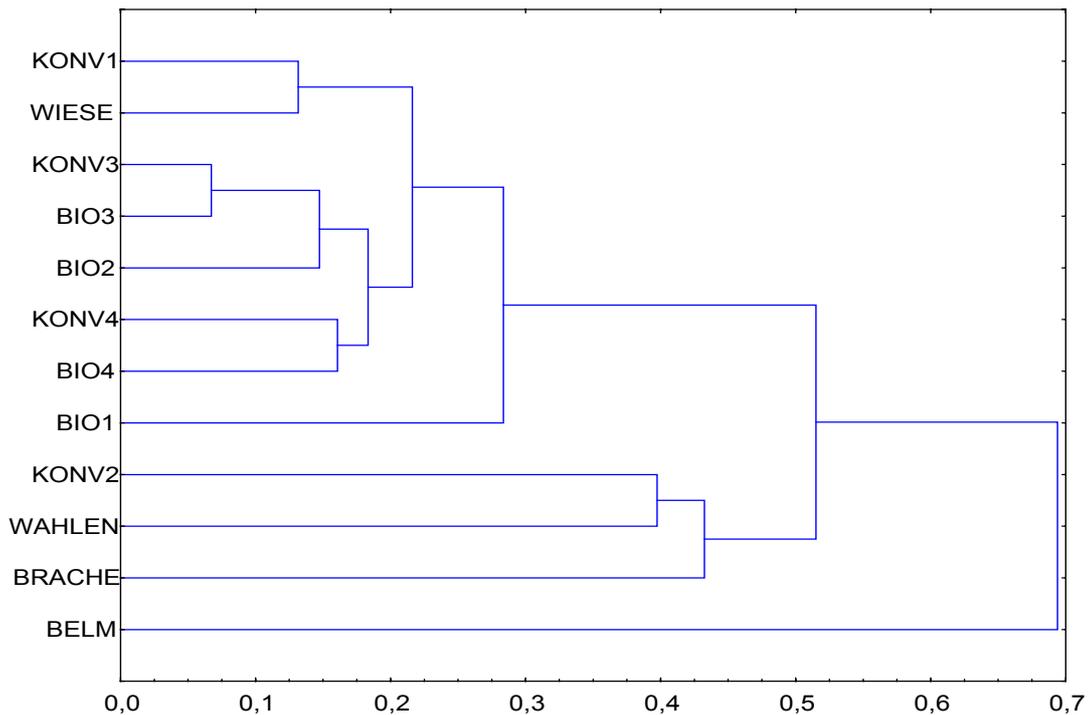


Abbildung 14: UPGMA-Clusterdiagramm, basierend auf der  $\Phi$ -Statistik (EXCOFFIER et al. 1992)

Das Dendrogramm der UPGMA-Clusteranalyse auf Basis der  $\Phi_{ST}$ -Werte zeigt im Vergleich zum Dendrogramm der genetischen Distanzen (Abbildung 13) eine stärkere Trennung des Untersuchungsstandortes Belm zu den restlichen Untersuchungsstandorten.

Wahlen zeigt auch hier eine starke Differenzierung zu den Herler Flächen, jedoch eine wesentlich geringere als dies bei „Belm“ der Fall ist.

Die anderen Aussagen decken sich mit denen der genetischen Distanzen. „Brache“, „Konv2“ und „Bio1“ zeigen hier ebenfalls eine stärkere Differenzierung zu den restlichen Flächen in Herl.

Die Abbildung 15 zeigt, wie die, aufgrund ihrer Populationsstrukturierung, über die paarweisen  $\Phi_{ST}$ -Werte zu Clustern zusammengefassten Standorte in Herl, geografisch assoziiert sind. Da bei dieser Berechnung die Regionen Wahlen und Belm nicht mit eingegangen sind, unterscheidet sich das Ergebnis etwas von dem Dendrogramm aller Standorte (Abbildung 14).

Deutlichster Unterschied zu der Clusterung aller drei Regionen ist, dass „Konv4“ hier nicht mit „Bio4“ in ein Cluster gesetzt wird, sondern zumindest optisch etwas isolierter dasteht.

Die drei am südlichen Rand des Untersuchungsgebietes gelegenen Standorte zeigen wiederum eine relativ hohe Differenzierung zu den anderen Standorten in Herl. Nur der Standort „Konv1“, der ebenfalls in diesem Teil des Untersuchungsgebietes liegt, zeigt eine geringere Differenzierung zu den übrigen Herler Untersuchungsstandorten. Einen hohen Genfluss bzw. eine besonders geringe Differenzierung weist „Konv1“ zum Standort „Wiese“ auf.

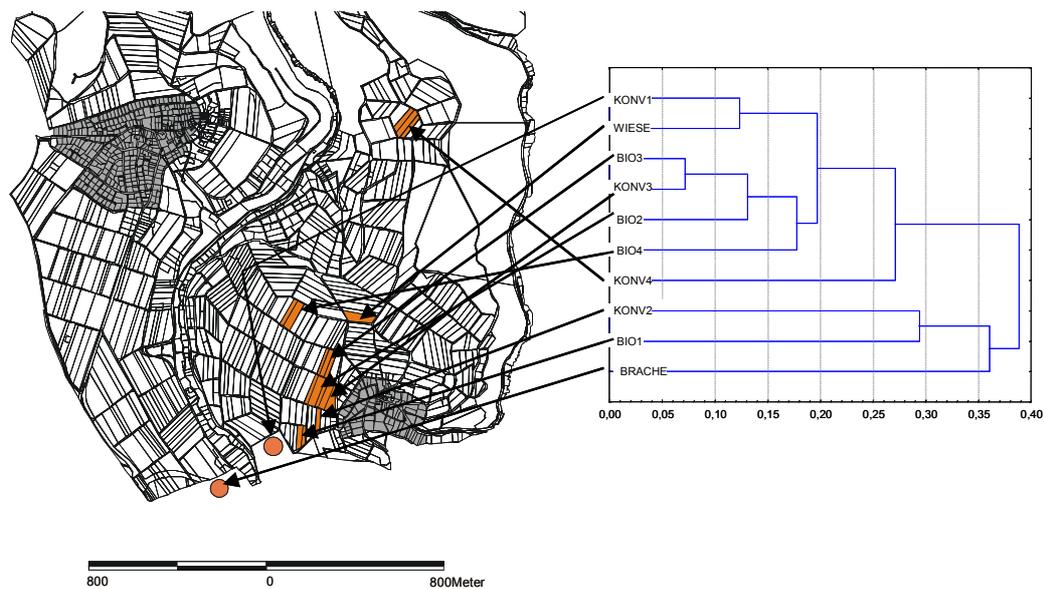


Abbildung 15. Räumliche Assoziation der auf Basis der  $\Phi_{ST}$ -Werte geclusterten Standorte (UPGMA-Dendrogramm)

Mit dem Programm WIN-AMOVA (EXCOFFIER et al. 1992) kann die Populationsstruktur als hierarchische Verteilung der molekularen Varianz zwischen den Populationen und innerhalb der Populationen bzw. Regionen aufgeschlüsselt werden. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse der AMOVA (Analysis of Molecular Variance) für die drei Regionen.

Innerhalb von Herl wurden zehn verschiedene Stichproben genommen. In Herl lag mit ca. 84 % ein großer Teil der molekularen Varianz innerhalb der Stichproben (bzw. Populationen), während nur ca. 16 % zwischen den Populationen zu finden waren. Im Vergleich der Regionen Herl und Belm liegen mehr als 20 % der Varianz zwischen den Populationen, zwischen Herl und Wahlen sind es ebenfalls ca. 20 %, während es zwischen Belm und Wahlen fast 40 % sind. Alle Werte sind hochsignifikant.

Tabelle 15: Verteilung der molekularen Varianz auf verschiedenen hierarchischen Ebenen. Als Grundlage der AMOVA (EXCOFFIER et al. 1992; HUFF et al. 1993) wurden euklidische Distanzen verwendet. Alle Analysen sind auf dem 1 %-Niveau signifikant, %Varianz=Varianzanteil,  $\Phi_{ST}$ -Statistik (EXCOFFIER et al. 1992) FG= Freiheitsgrade

Amova	Varianzkomponente	% Varianz	$\Phi_{ST}$	FG	<i>P</i>
Herl	zwischen Populationen	15,80	0,158	9	< 0,001
	innerhalb Populationen	84,20		180	
Herl und Belm	zwischen Populationen	21,26	0,213	1	< 0,001
	innerhalb Populationen	78,74		207	
Herl und Wahlen	zwischen Populationen	19,43	0,194	1	< 0,001
	innerhalb Populationen	80,57		207	
Belm und Wahlen	zwischen Populationen	39,23	0,392	1	< 0,001
	innerhalb Populationen	60,77		36	
Herl, Belm und Wahlen	zwischen Gruppen	14,66		2	< 0,001
	zwischen Populationen				
	innerhalb Gruppen	13,89		9	
	innerhalb Populationen	71,46		216	

$$\Phi_{ST} \quad \mathbf{0,285}$$

$$\Phi_{SC} \quad \mathbf{0,163}$$

$$\Phi_{CT} \quad \mathbf{0,147}$$

### 9.2.6 Test auf „Isolation by distance“

Der folgende Teil der Auswertung sollte überprüfen, inwieweit die beobachteten genetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Standorten auf „Isolation by distance“ zurückzuführen sind. Bei dem „isolation by distance“-Modell vergrößert sich die genetische Distanz mit zunehmenden geografischen Distanzen. Die Tabelle 16 zeigt die geografischen Distanzen zwischen den Untersuchungsstandorten. In Herl liegen diese Flächen von ca. 75 m bis zu 1850 m voneinander entfernt.

Der statistische Zusammenhang der Variablen „genetische Distanz“ und „geografische Distanz“ wurde mit einer Regressionsanalyse (STATISTICA V. 5) getestet.

Tabelle 16. Geografische Distanzen zwischen den Untersuchungsflächen in km

	Konv. 1	Konv. 2	Konv. 3	Konv. 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen	Belm
<b>Konv. 1</b>												
<b>Konv. 2</b>	0,200											
<b>Konv. 3</b>	0,300	0,100										
<b>Konv. 4</b>	1,550	1,375	1,300									
<b>Bio 1</b>	0,100	0,100	0,225	1,500								
<b>Bio 2</b>	0,325	0,150	0,075	1,250	0,250							
<b>Bio 3</b>	0,040	0,275	0,200	1,125	0,375	0,150						
<b>Bio 4</b>	0,650	0,525	0,475	1,000	0,600	0,400	0,275					
<b>Brache</b>	0,325	0,525	0,625	1,850	0,425	0,625	0,750	0,875				
<b>Wiese</b>	0,725	0,525	0,425	0,875	0,650	0,400	0,275	0,325	1,025			
<b>Wahlen</b>	33,400	33,100	33,500	35,000	33,000	33,300	33,500	33,600	33,600	33,800		
<b>Belm</b>	350,000	350,000	350,000	350,000	350,000	350,000	350,000	350,000	350,000	350,000	380,000	

Bei Betrachtung der zehn Untersuchungsflächen ergaben sich 51 genetische Distanzen als abhängige Variable, die mit den entsprechenden geografischen Distanzen (unabhängige Variable) getestet wurden.

Wie aus der Abbildung 16 zu entnehmen ist, besteht statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Variablen „genetische Distanz“ und „geografische Distanz“. Es besteht zumindest der positive Trend, dass die genetischen Distanzen mit zunehmender Entfernung ansteigen. Insgesamt ist die Streuung der Daten jedoch sehr groß.

Der Mantel-Test wurde mit den Distanzwerten nach LYNCH & MILLIGAN (1994) und Hardy-Weinberg-Abweichung berechnet. Demzufolge besteht für die Populationen in Herl kein signifikanter Zusammenhang zwischen genetischer Distanz und geographischer Distanz ( $p=0,209$ ,  $R^2=0,07$ ). Die Berechnungen wurden jeweils mit 1000 Permutationen durchgeführt.

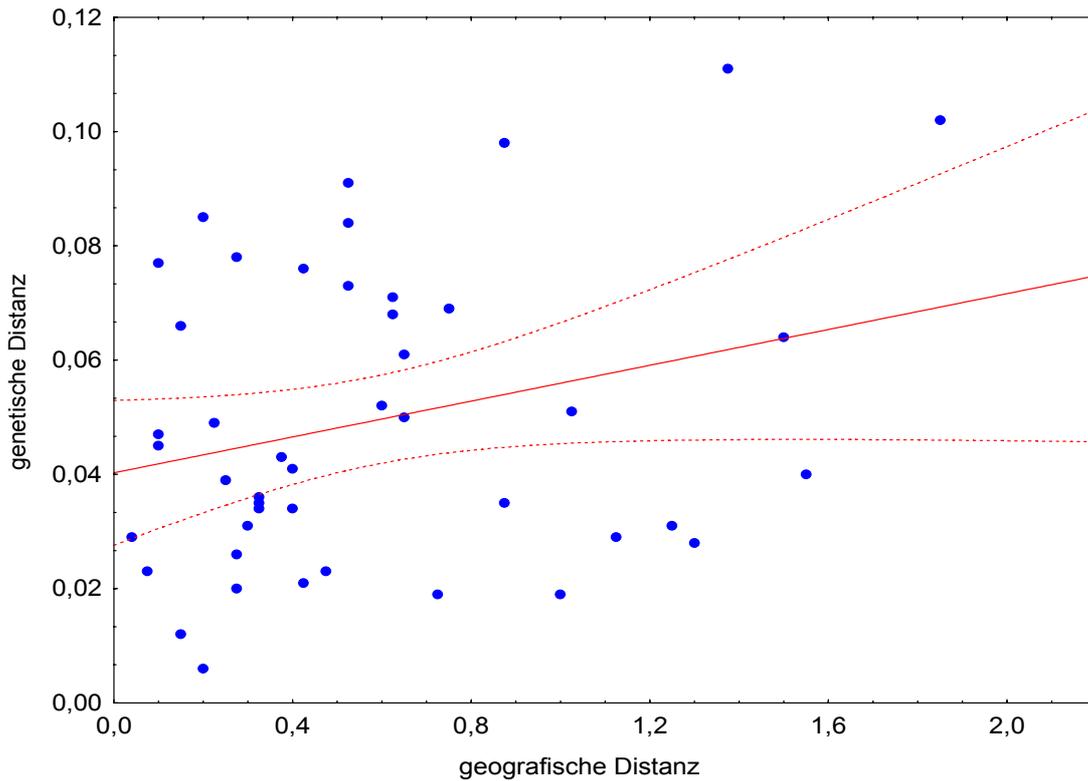


Abbildung 16. „Isolation by distance“ Regressionsanalyse aller Untersuchungsstandorte in Herl auf Basis der genetischen Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) und Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Während bei der Analyse aller Populationen in Herl kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden konnte, scheint es bei ausschließlicher Berücksichtigung der biologischen Flächen durchaus einen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,031$ ,  $R^2= 0,722$ ) zwischen geografischer und genetischer Distanz zu geben (Abbildung 17).

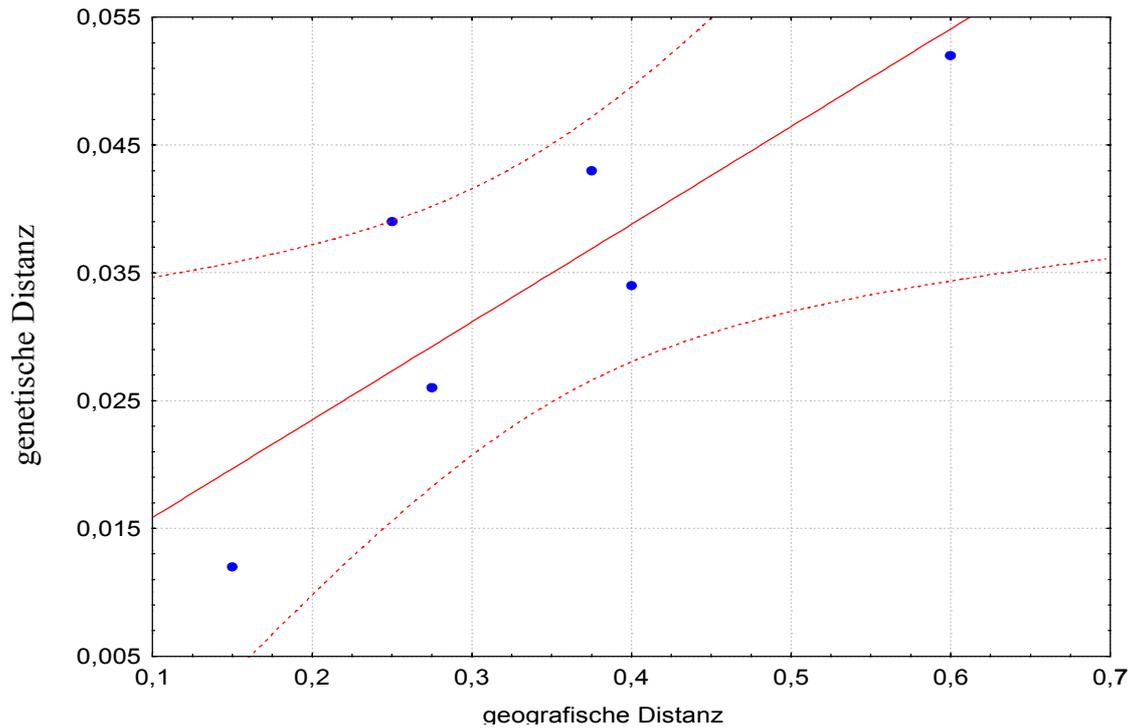


Abbildung 17. Isolation by distance Regressionsanalyse der biologisch bewirtschafteten Untersuchungsstandorte in Herl auf Basis der genetischen Distanzen nach LYNCH & MILLIGAN (1994) und Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Einen ebenfalls statistisch signifikanten Zusammenhang erhält man, wenn nur die Distanzen der Fläche „Konv2“ (U-Test,  $p=0,011$ ,  $R^2=0,619$ ) und „Konv 4“ zu den anderen Flächen in Herl betrachtet werden (U-Test,  $p= 0,051$ ,  $R^2=0,439$ ). Nach Bonferroni-Korrektur ist dieses Ergebnis allerdings nicht mehr signifikant.

Werden nur die konventionellen Flächen getestet, ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang, die genetische Distanz nimmt sogar leicht mit zunehmender geografischer Distanz ab ( $p=0,814$ ,  $R^2= 0,015$ ).

Tabelle 17: Vergleich der Höhe des Genflusses und geografischer Distanz beider Bewirtschaftungssysteme

	Genfluss	geografische Distanz (km)		Genfluss	geografische Distanz (km)
Konv1/ Konv2	0,740	0,200	Bio1/ Bio2	1,680	0,250
Konv1/ Konv3	1,930	0,300	Bio1/ Bio3	1,630	0,375
Konv1/ Konv4	1,860	1,550	Bio1/ Bio4	1,590	0,600
Konv2/ Konv3	0,840	0,100	Bio2/ Bio3	3,980	0,150
Konv2/ Konv4	0,600	1,375	Bio2/ Bio4	1,810	0,400
Konv3/ Konv4	2,170	1,300	Bio3/ Bio4	2,950	0,275
Mittelwert	1,357	0,804	Mittelwert	2,273	0,342
Standardabw.	0,702	0,670	Standardabw.	0,982	0,155

Betrachtet man die Genflussraten nach Bewirtschaftungssystemen getrennt, fällt auf, dass mit 1,35 Migranten pro Generation der Genfluss zwischen den konventionell bewirtschafteten Flächen wesentlich geringer ausfällt, als zwischen den biologisch bewirtschafteten Flächen ( $N_{em}=2,27$ ).

### 9.2.7 Hauptkomponentenanalyse

Mit einer der Diskriminanzanalyse vorangestellten Hauptkomponentenanalyse wurde der Datensatz von 94 Variablen auf 34 Variablen reduziert, die einen Eigenwert von  $>1$  aufwiesen. Die Faktorwerte wurden zur weiteren Verwendung in der Diskriminanzanalyse als Variable abgespeichert.

### 9.2.8 Diskriminanzanalyse

Eine Diskriminanzanalyse der Faktorwerte der Hauptkomponentenanalyse zeigte eine isolierte Stellung der Untersuchungsstandorte Wahlen (Nr.11) und Belm (Nr.12) (siehe Abbildung 18). Ebenfalls isoliert von den restlichen Standorten in Herl, liegt der Standort „Konv2“. Die Individuen des Standortes „Brache“ liegen in der grafischen Darstellung der Diskriminanzanalyse randlich der meisten Herler Individuen, jedoch viel näher an diesen, als die Tiere der Fläche „Konv2“. Die erste Funktion erklärte 32,2 % und die zweite Funktion 21,0 % der Varianz.

Die Jackknife-Analyse ergab, dass bei den Standorten „Konv2“, „Bio1“, „Brache“, „Wahlen“ und „Belm“ alle der ursprünglich gruppierten Fälle korrekt klassifiziert wurden.

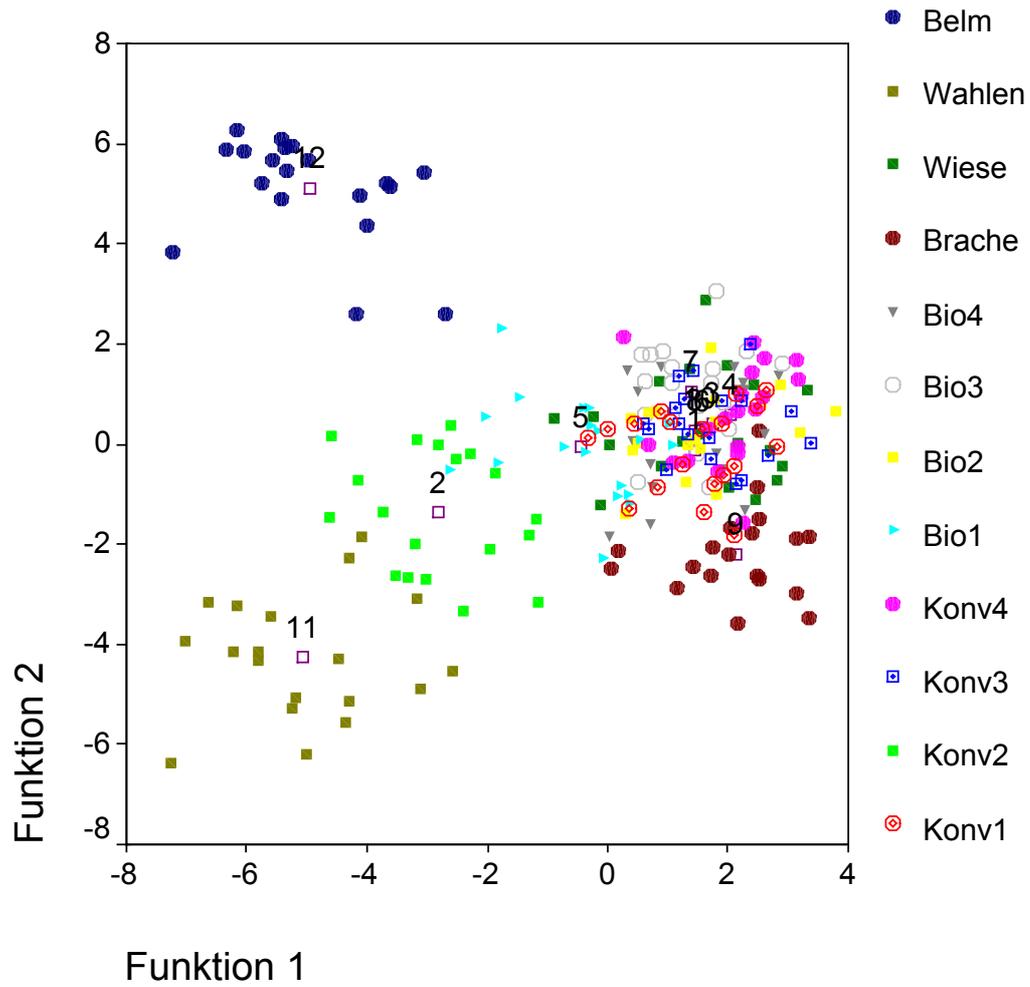


Abbildung 18: Kanonische Diskriminanzfunktion aller untersuchten Standorte, basierend auf den Faktorwerten der Faktorenanalyse

Entzerrt man die Diskriminanzanalyse der Herler Standorte, in dem nur die vier biologisch und vier konventionell bewirtschafteten Flächen herausgenommen werden, erkennt man, dass von diesen acht analysierten Flächen in Herl, drei gut von den restlichen Standorten getrennt werden können. Dieses sind die Flächen „Konv1“, „Konv2“ und „Bio1“.

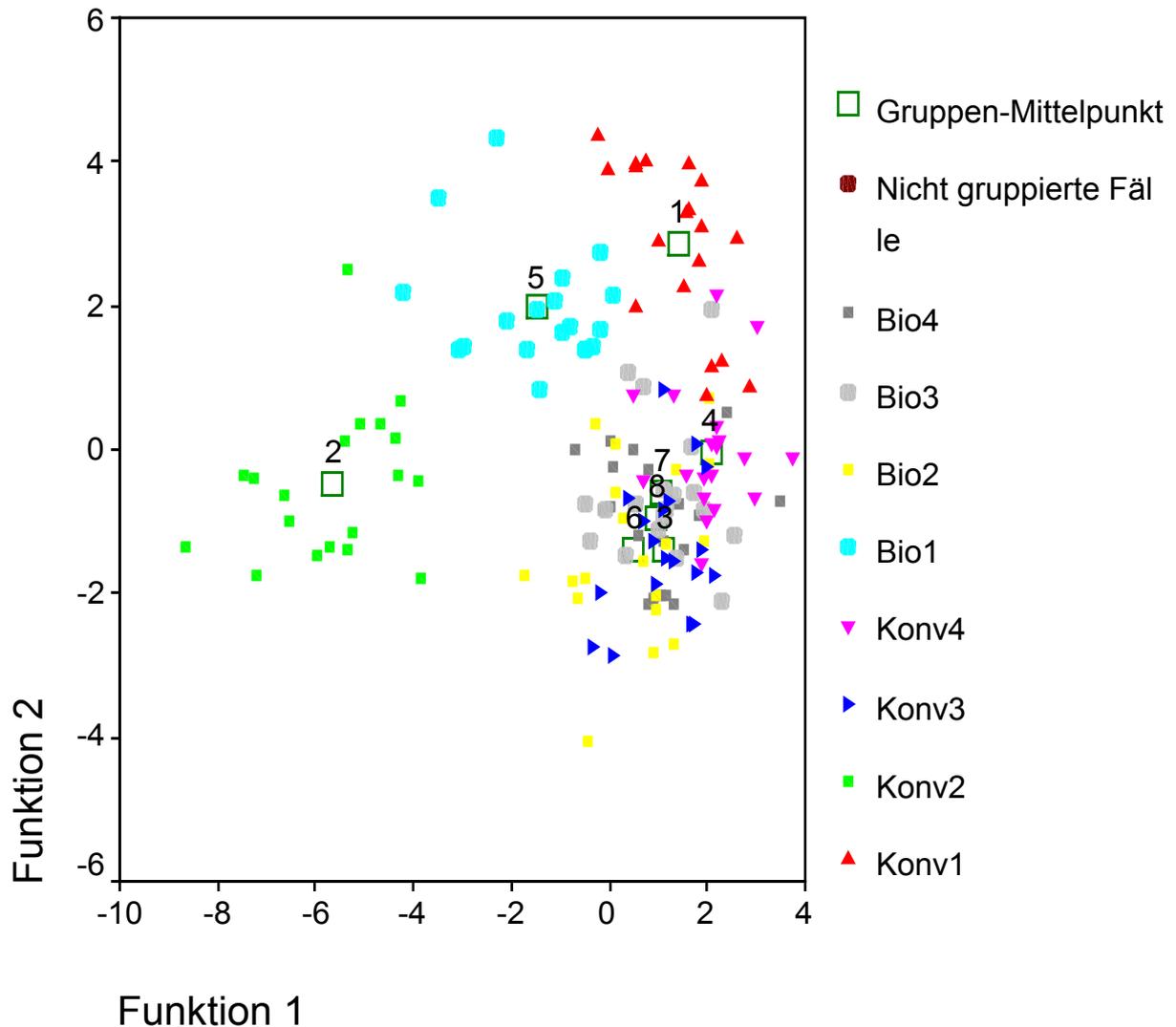


Abbildung 19: Kanonische Diskriminanzfunktion der biologisch und konventionell bewirtschafteten Flächen, basierend auf den Faktorwerten der Faktorenanalyse

## 9.3 Mikrosatellitenanalyse

### 9.3.1 Auswertung des Mikrosatellitenlocus Arin 1

Eines der beiden untersuchten Mikrosatellitenloci war das Primerpaar Arin1 (BROOKES et al. 2001). Das Agarosegel zeigte allerdings verschiedene Primeranlagerungen. Da die Allele bei *Arion intermedius* im Bereich von 105 -117 Basenpaaren lagen, wurde diesem Bereich bei der anschließenden Kapillarelektrophorese besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Die Kapillarelektrophorese ist zur Detektion von Polymorphismen kleiner Fragmente mit geringen Längenunterschieden notwendig, da die verwendete Agarose eine zu geringe Trennschärfe besitzt.

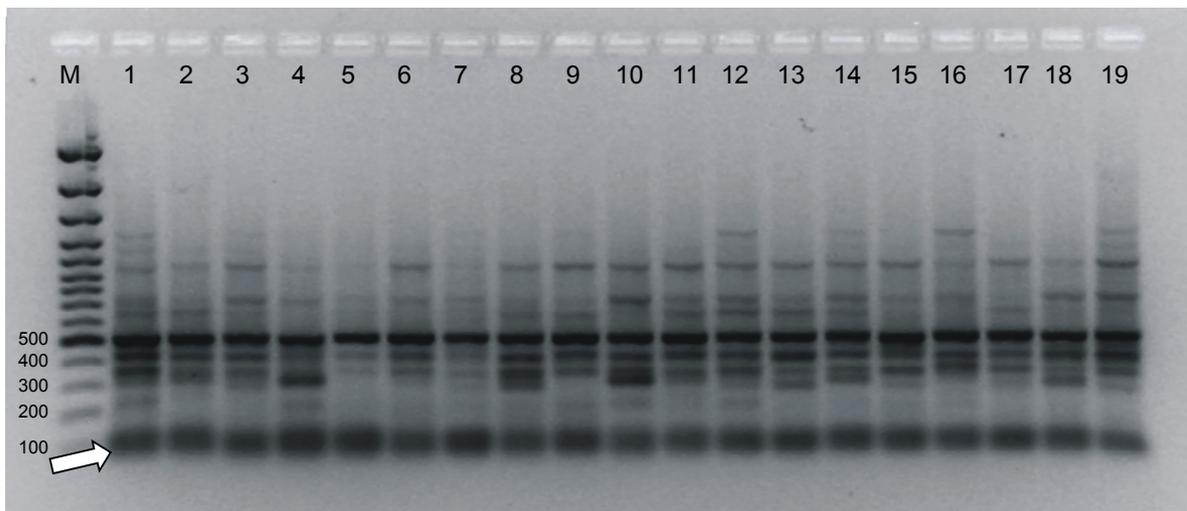


Abbildung 20: Agarosegel der Amplifikationsprodukte des Primer Arin1 (invertierte Darstellung). Der weiße Pfeil kennzeichnet das kapillarelektrophoretisch ausgewertete Fragment. Die anderen Fragmente zeigten keine auswertbaren Polymorphismen.

Die kapillarelektrophoretische Analyse zeigte zwei Allele mit einer Basenlänge von 101 und 103 Basen. Die untersuchten *Arion lusitanicus* Individuen zeigen also hinsichtlich der Allelgröße geringe Unterschiede zu den Allelen von *Arion intermedius*. Es konnten, anders als bei *Arion intermedius* (BROOKES et al. 2001), deutlich heterozygote und homozygote Individuen unterschieden werden.

Das Elektropherogramm (Abbildung 21) zeigt deutliche Peaks, die die Mikrosatelliten-Allele darstellen. Vor diesen Mikrosatelliten-Peaks sind wesentlich kleinere Peaks zu erkennen, die als „Stotterbanden“ oder „Schattenbanden“ bezeichnet werden. Die „Stotterbanden“ weisen denselben Abstand zueinander auf, wie die eigentlichen Mikrosatelliten-Allele. Das bedeutet, dass bei heterozygoten Individuen auch zwei Stotterbanden auftreten. Diese Banden entstehen durch

Replikationsfehler während der PCR und sind charakteristisch für Mikrosatelliten. Die Größenberechnung der Fragmente erfolgt über interne Standards, die hier als rote Peaks zu erkennen sind. Die übrigen im Agarose-Gel erkennbaren Fragmente zeigten in der Kapillarelektrophorese keine auswertbaren Polymorphismen.

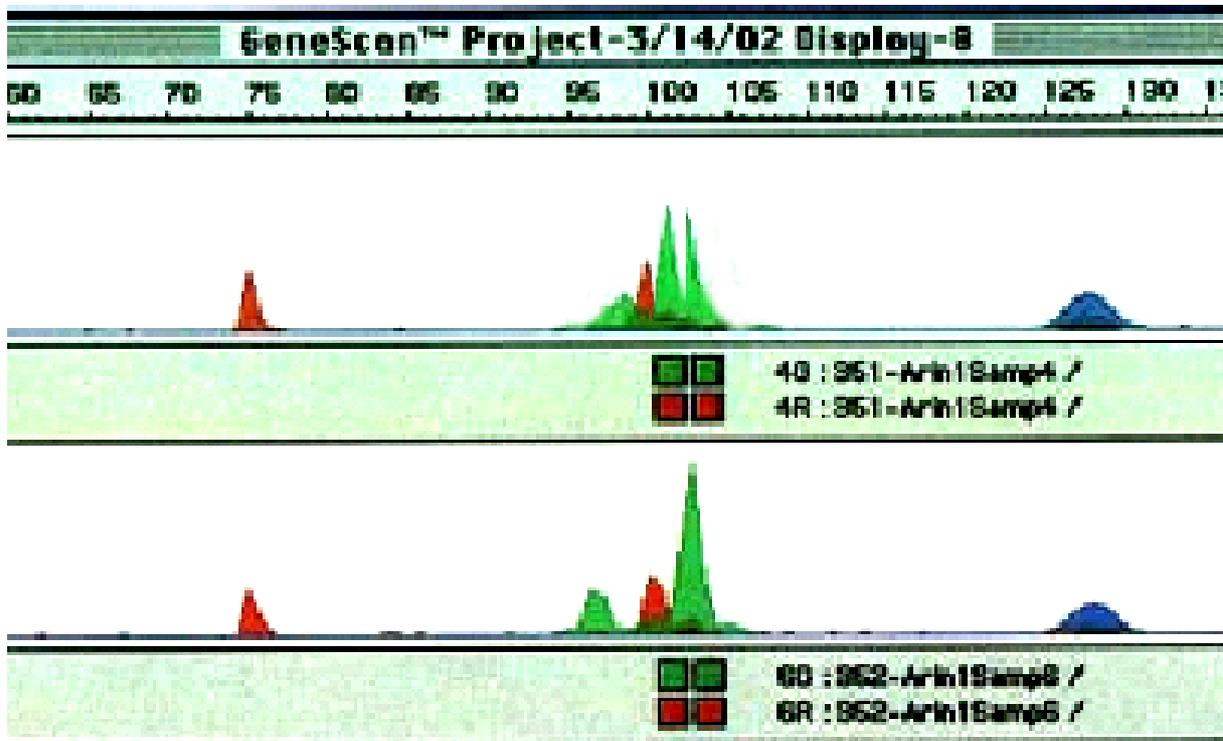


Abbildung 21: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms des Primers Arin1. Die hohen grünen Peaks zeigen die eigentlichen Mikrosatellitenallele, die kleineren links daneben liegenden Peaks sind die sogenannten „Schattenbanden“. Als rote Peaks ist der interne Längenstandard (500 bp ROX) zu erkennen

Die Tabelle 18 stellt die populationsgenetischen Parameter Genotypenverteilung, beobachtete ( $H_O$ ) und erwartete Heterozygotie ( $H_E$ ) (NEI 1973), Inzuchtkoeffizient ( $F_{IS}$ ) und den Shannon-Information-Index ( $H_S$ ) (LEWONTIN 1972) dar.

Bei fast allen Untersuchungsflächen sind 30 Individuen in die Berechnungen eingegangen. Ausnahmen sind die Standorte „Bio3“ und „Bio4“, bei denen jeweils ein Individuum keine Amplifikationsprodukte zeigte und der Standort Wahlen, wo insgesamt drei Individuen kein Ergebnis zeigten.

Die beobachtete Heterozygotie liegt in Herl zwischen 0,172 auf der Fläche „Bio3“ und 0,448 auf der Fläche „Wiese“ und die erwartete Heterozygotie nimmt Werte zwischen 0,277 („Konv1“) und 0,499 („Bio2“) ein.

In Wahlen ist die beobachtete Heterozygotie mit 0,185 relativ gering. Die erwartete Heterozygotie beträgt hier 0,401.

Belm nimmt aufgrund seiner beobachteten Heterozygotie von 0,000 und einer erwarteten Heterozygotie von nur 0,144 eine Sonderstellung ein.

Aus dem Vergleich der beobachteten und der erwarteten Heterozygotie ergibt sich der Inzuchtkoeffizient  $F_{IS}$ , der in Herl zwischen 0,081 auf dem Standort „Wiese“ und 0,620 auf der Fläche „Bio3“ liegt.

Wahlen hat mit 0,552 einen hohen  $F_{IS}$  - Wert. Da in Belm kein heterozygotisches Individuum gefunden wurde, liegt der  $F_{IS}$  - Wert bei 1,000.

Die Berechnung der  $F_{IS}$ -werte (nach WEIR & COCKERHAM 1984) erfolgte, wie die Hardy-Weinberg-Tests, mit dem Programm „GENEPOP ON THE WEB“.

Der Shannon – Information – Index (LEWONTIN 1972) ist ein Diversitätsindex und wurde mit dem Programm POPGENE (YEH et al. 1997) berechnet. Er liegt in Herl zwischen 0,456 auf der Fläche „Konv1“ und 0,692 auf der Fläche „Bio2“.

Die meisten Standorte in Herl zeigen relativ ähnliche Werte. Auch Wahlen passt mit einer Gen - Diversität von 0,590 in diese Größenordnung. Belm fällt hier wiederum mit einer besonders geringen genetischen Diversität von 0,146 heraus.

Insgesamt zeigen die genetischen Diversitäten die gleiche Rangfolge wie die erwarteten Heterozygotiewerte, die auch als Maßzahl für genetische Diversität benutzt werden kann. Generell ergab sich hinsichtlich der genetischen Diversität kein signifikanter Unterschied zwischen den Bewirtschaftungsformen (U-Test,  $p = 0,686$ ).

Tabelle 18: Populationsgenetische Parameter des Locus Arin1 (n= Stichprobengröße, AA und BB sind die homozygoten Genotypen, AB ist der heterozygote Genotyp,  $H_0$  = erwartete Heterozygotie,  $H_E$  = erwartete Heterozygotie unter Hardy-Weinberg-Gleichgewicht,  $F_{IS}$  = Inzuchtkoeffizient,  $p$  = Wahrscheinlichkeit, dass Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegt,  $H_S$  = Shannon - Diversitätsindex).

Arin 1	n	AA	BB	AB	$H_0$	$H_E$	$F_{IS}$ (W&C)	p	$H_S$
Konv 1	30	22	2	6	0,200	0,277	0,296	0,154	0,456
Konv 2	30	12	7	11	0,366	0,486	0,262	0,141	0,679
Konv 3	30	12	8	10	0,333	0,491	0,336	0,067	0,684
Konv 4	30	11	7	12	0,400	0,491	0,202	0,228	0,684
Bio 1	30	15	9	6	0,200	0,480	0,594	0,001	0,673
Bio 2	30	12	11	7	0,233	0,499	0,545	0,003	0,692
Bio 3	29	17	7	5	0,172	0,440	0,620	0,001	0,632
Bio 4	29	10	8	11	0,379	0,497	0,254	0,156	0,690
Brache	30	19	5	6	0,200	0,391	0,501	0,011	0,579
Wiese	30	11	5	13	0,448	0,478	0,081	0,478	0,671
Wahlen	27	17	5	5	0,185	0,401	0,552	0,008	0,590
Belm	30	29	1	0	0,000	0,144	1,000	0,017	0,146

Die Tests auf Prüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts wurden als U-Test mit der „Markov chain“ Methode durchgeführt (GUO & THOMSON 1992, dememorization number=10000, number of batches= 1000, iterations per batch= 10000).

Die Tests ergaben, dass sich keine der Stichproben im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet.

Die Ergebnisse zeigten für den Primer Arin1  $F_{IS}$ - Werte zwischen 0,081 auf der Fläche „Wiese“ und 1,0 in Belm.

Drei der vier Bioflächen hatten deutlich höhere  $F_{IS}$  -Werte als die konventionellen Flächen. Der Durchschnitt der  $F_{IS}$ -Werte auf den Bioflächen betrug 0,503 während der Mittelwert der  $F_{IS}$ -Werte der konventionellen Flächen bei nur 0,274 lag. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (U-Test,  $p=0,149$ ).

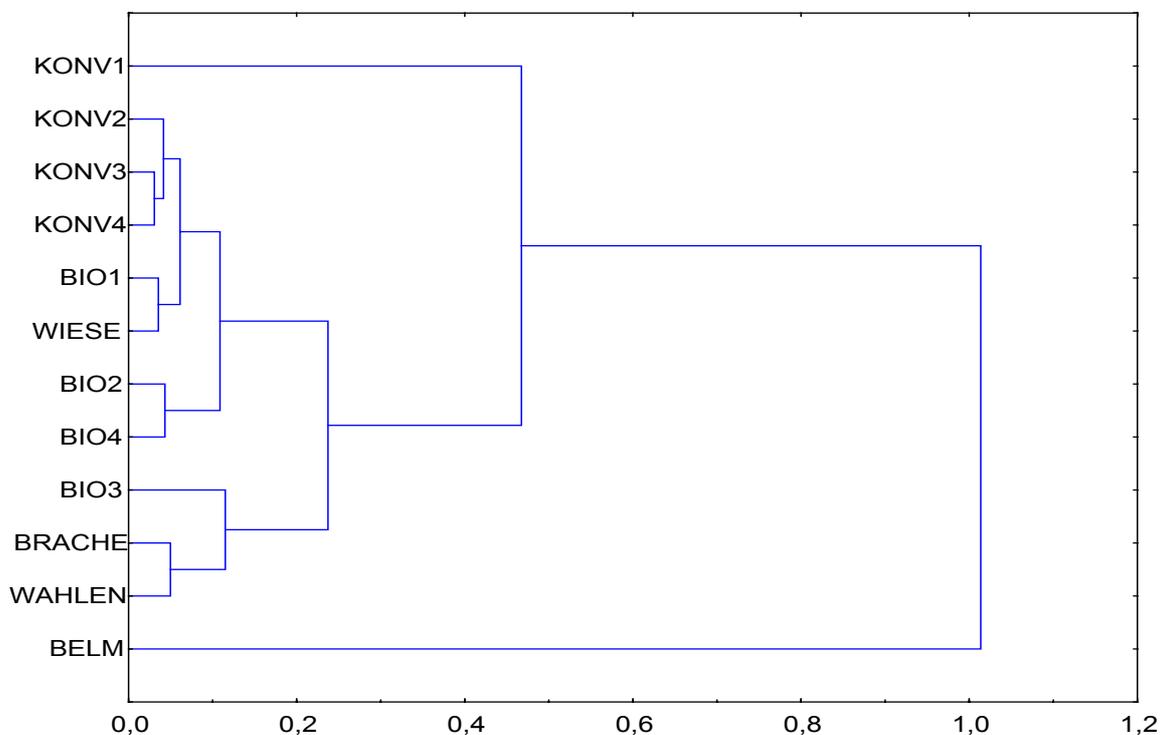
Die Tabelle 19 stellt die paarweisen  $F_{ST}$ -Werte aller Standorte dar. An den Daten wird deutlich, dass der Standort Belm relativ stark von den Herler Populationen differenziert ist. Nur der Standort „Konv1“ in Herl zeigte eine weniger große Differenzierung zu Belm. Insgesamt hatte „Konv1“ im Vergleich zu den anderen Standorten in Herl mit 0,043-0,138 relativ hohe  $F_{ST}$  - Werte. Alle anderen Standorte in Herl zeigten an diesem Locus keine nennenswerte Populationsstrukturierung.

Interessanterweise lässt sich der Standort Wahlen an Hand des Locus Arin1 nicht von den anderen Flächen abgrenzen.

Tabelle 19: Paarweise  $F_{ST}$ -Werte aller Standorte für den Locus Arin1

Arin1- $F_{ST}$	Konv. 1	Konv. 2	Konv. 3	Konv. 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen	Belm
<b>Konv. 1</b>												
<b>Konv. 2</b>	0,122											
<b>Konv. 3</b>	0,137	-0,022										
<b>Konv. 4</b>	0,138	-0,020	-0,022									
<b>Bio 1</b>	0,103	-0,024	-0,023	-0,022								
<b>Bio 2</b>	0,185	-0,015	-0,020	-0,018	-0,013							
<b>Bio 3</b>	0,043	-0,008	-0,002	0,000	-0,016	0,023						
<b>Bio 4</b>	0,170	-0,017	-0,020	-0,019	-0,016	-0,024	0,015					
<b>Brache</b>	0,006	0,027	0,037	0,038	0,014	0,072	-0,018	0,060				
<b>Wiese</b>	0,106	-0,019	-0,018	-0,017	-0,023	-0,007	-0,013	-0,011	0,016			
<b>Wahlen</b>	0,010	0,018	0,027	0,028	0,005	0,060	-0,023	0,049	-0,027	0,008		
<b>Belm</b>	0,072	0,333	0,350	0,352	0,312	0,402	0,236	0,389	0,171	0,316	0,188	

Zur Veranschaulichung wurden die Ergebnisse anhand eines Dendrogramms grafisch dargestellt (Abbildung 22). Das hier dargestellte UPGMA-Diagramm beruht auf einer Clusteranalyse, die auf euklidischen Distanzen basiert. Hier wird nochmals die starke Populationsunterteilung der Herler Population zu der Population in Belm sichtbar. Auch der Standort „Konv1“ in Herl zeigte zu den anderen Standorten in Herl eine deutliche Trennung. Die anderen Populationsunterteilungen waren sehr gering.

Abbildung 22: Clusterdiagramm der  $F_{ST}$ -Werte des Locus Arin1

### 9.3.2 Auswertung des Mikrosatellitenlocus HA-7

Der Mikrosatellitenlocus HA-7 konnte im Gegensatz zu Arin1 im Agarosegel aufgetrennt werden, da die drei detektierbaren Allele eine Länge von ca. 600-800 bp zeigten und die Unterschiede zwischen den DNA-Fragmenten ausreichend groß waren (vgl. Abbildung 23). Die Auftrennung der Fragmente mittels Kapillarelektrophorese ergab allerdings keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Auf der Abbildung sind, wie schon bei der Beschreibung der Ergebnisse des Locus Arin1 erwähnt, die sogenannten Schattenbanden gut zu erkennen. Als Allel wurden nur die Fragmente gewertet, die eine ausreichende Intensität zeigten. Bei Heterozygoten mussten beide Allele eine ähnliche Bandenstärke aufweisen.

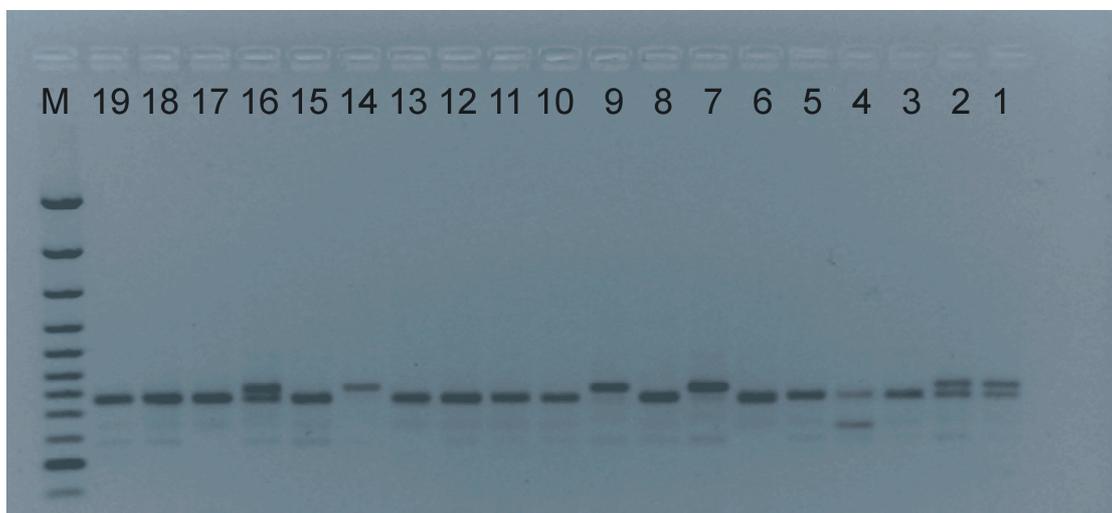


Abbildung 23.: Beispielhafte Darstellung eines Agarose-Gels zur Auswertung des Mikrosatellitenprimers HA-7 des Standortes „Konv.4“

Die Tabelle 20 zeigt die populationsgenetischen Parameter Genotypenverteilung, beobachtete und erwartete Heterozygotität ( $NEI$  1973), Inzuchtkoeffizient ( $F_{IS}$ ) und den Shannon- Information- Index (LEWONTIN 1972).

Genauso wie bei dem Locus Arin1, sind nicht auf allen Standorten 30 Individuen ausgewertet worden, da einige Individuen auch nach mehrmaligen Wiederholungen kein Amplifikationsprodukt zeigten. Bei den Standorten „Konv2“ und „Belm“ zeigten jeweils vier Individuen kein auswertbares Allel, bei „Konv3“ und „Wiese“ jeweils ein Tier und bei „Bio2“ und „Wahlen“ jeweils zwei, „Bio2“ drei und von der Teilpopulation „Brache“ waren es sogar acht Individuen. Insgesamt war der Locus HA-7 bei 25 Individuen nicht auswertbar.

Tabelle 20: Populationsgenetische Parameter des Locus HA-7 (n= Stichprobengröße, AA und BB sind die homozygoten Genotypen, AB ist der heterozygote Genotyp,  $H_o$  =erwartete Heterozygotie,  $H_E$  =erwartete Heterozygotie unter Hardy-Weinberg-Gleichgewicht,  $F_{IS}$  =Inzuchtkoeffizient (nach WEIR & COCKERHAM),  $p$  =Wahrscheinlichkeit, dass Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegt,  $H_S$  = Shannon -Diversitätsindex).

	n	AA	AB	BB	AC	BC	CC	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$ (W&C)	HWG p	$H_S$
<b>Konv. 1</b>	30		1	20		8	1	0,300	0,305	0,015	0,673	0,532
<b>Konv. 2</b>	26		4	17		3	2	0,269	0,354	0,212	0,288	0,654
<b>Konv. 3</b>	29			21	2	5	1	0,241	0,318	0,291	0,164	0,575
<b>Konv. 4</b>	30		1	15		6	8	0,233	0,485	0,439	0,020	0,734
<b>Bio 1</b>	28	1	1	20		5	1	0,214	0,306	0,289	0,175	0,578
<b>Bio 2</b>	27		1	19	1	6		0,296	0,287	-0,003	0,638	0,538
<b>Bio 3</b>	30			19	2	9		0,366	0,351	-0,025	0,746	0,615
<b>Bio 4</b>	30	2	1	17	1	8	1	0,333	0,442	0,277	0,137	0,780
<b>Brache</b>	22			15		6	1	0,272	0,297	0,106	0,538	0,474
<b>Wiese</b>	29			20		7	2	0,241	0,307	0,231	0,238	0,485
<b>Wahlen</b>	28		2	1	4	8	13	0,500	0,482	-0,084	0,837	0,832
<b>Belm</b>	26	1		22			3	0,000	0,269	1,000	0,000	0,515

Bei der Betrachtung der sechs Genotypen fällt auf, dass der Genotyp „BB“, also homozygote Individuen, die am Locus HA-7 auf beiden homologen Chromosomen das gleiche Allel „B“ aufweisen, mit einer Genotypenfrequenz von ca. 50-70% der dominierende Genotyp in Herl und Belm ist. In Belm besitzt der Genotyp „BB“ sogar eine Frequenz von ca. 85 %.

In Wahlen zeigt sich ein vollkommen anderes Bild. Hier ist der Genotyp „BB“ mit nur einem Individuum vertreten (4%), während der Genotyp „CC“ mit ca. 50 % dominierend ist.

Die beobachtete Heterozygotie liegt in Herl zwischen 0,214 und 0,366. In Wahlen liegt die beobachtete Heterozygotie mit 0,500 deutlich höher und die Population in Belm hat, wie beim Locus Arin 1 auch, eine beobachtete Heterozygotie von 0,000.

Im Vergleich zur erwarteten Heterozygotie zeigen die Standorte „Bio2“, „Bio3“ und „Wahlen“ sogar einen geringen Heterozygotenüberschuss.

Die genetische Diversität (Shannon-Information-Index, LEWONTIN 1972) variiert in Herl von 0,474 auf dem Standort „Brache“ und 0,780 am Standort „Bio4“. Wahlen zeigt mit 0,832 eine relativ hohe Diversität und auch die Population in Belm liegt mit 0,515 zwar im unteren Bereich, fällt jedoch nicht deutlich heraus.

Die Tabelle 21 zeigt die paarweisen  $F_{ST}$ -Werte aller Populationen. Wie schon beim Locus Arin1 fallen hier die geringen  $F_{ST}$ -Werte zwischen den Teilpopulationen in Herl auf. Viele Werte gehen sogar in den negativen Bereich. Anders als beim Locus Arin1

ist beim Locus HA-7 keine Populationsunterteilung zwischen Herl und Belm zu beobachten. Dagegen zeigt Wahlen eine sehr starke Populationsunterteilung zu den Populationen Herl und Belm.

Tabelle 21: Paarweise  $F_{ST}$ -Werte aller Standorte des Locus HA-7

HA7- $F_{ST}$	Konv, 1	Konv, 2	Konv, 3	Konv, 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen
<b>Konv, 1</b>											
<b>Konv, 2</b>	-0,018										
<b>Konv, 3</b>	-0,019	-0,018									
<b>Konv, 4</b>	0,007	-0,011	0,011								
<b>Bio 1</b>	-0,020	-0,020	-0,023	0,007							
<b>Bio 2</b>	-0,018	-0,020	-0,021	0,004	-0,021						
<b>Bio 3</b>	-0,016	-0,020	-0,017	-0,002	-0,018	-0,017					
<b>Bio 4</b>	0,008	-0,009	0,013	-0,023	0,008	0,006	0,000				
<b>Brache</b>	-0,021	-0,022	-0,025	0,002	-0,025	-0,023	-0,020	0,004			
<b>Wiese</b>	-0,019	-0,021	-0,021	0,001	-0,022	-0,021	-0,019	0,003	-0,024		
<b>Wahlen</b>	0,503	0,462	0,516	0,367	0,507	0,499	0,480	0,368	0,500	0,493	
<b>Belm</b>	-0,023	-0,020	-0,029	0,018	-0,029	-0,025	-0,018	0,020	-0,031	-0,025	0,537

Abbildung 24 verdeutlicht die geringe Differenzierung anhand geringer euklidischer Distanzen zwischen den Standorten in Herl und der Population Belm.

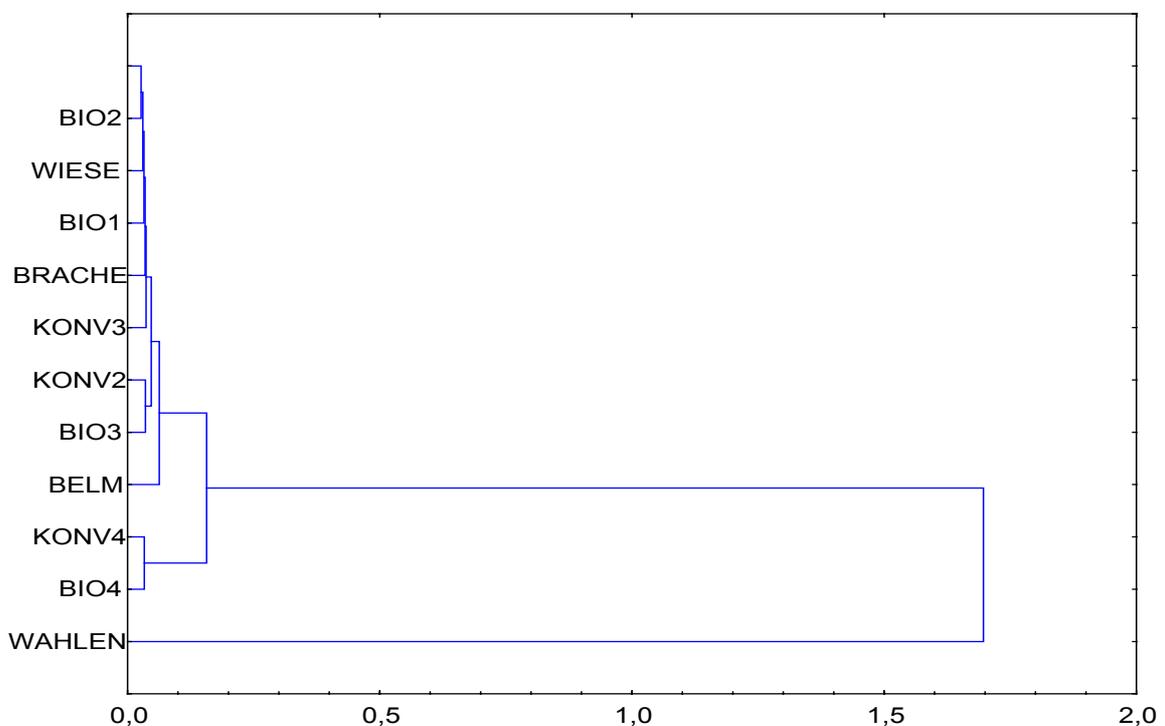


Abbildung 24: Clusterdiagramm der  $F_{ST}$ -Werte für den Locus HA-7

Bei der Analyse der Agarose-Gele konnten drei Allele unterschieden werden. Allel A hatte eine Länge von ca. 650 bp, Allel B von ca. 790 bp und Allel C von ca. 850 bp. Die Angaben können methodenbedingt nur als ungefähre Länge angegeben werden und lassen insofern keine Vermutung über die Art des Repeat zu.

### **9.3.3 Ergebnisse beider Loci**

Wie schon in den beiden vorangegangenen Kapiteln dargestellt wurde, zeigt der Locus Arin1 eine deutliche Populationsunterteilung zwischen Belm und den Regionen Wahlen und Herl, während der Locus HA-7 eine deutliche Populationsunterteilung zwischen Wahlen und den Regionen Herl und Belm zeigt. Beide Loci zusammengenommen reichen also aus, um die drei Regionen deutlich voneinander zu trennen.

Die Ergebnisse der beiden Loci im Vergleich der Parameter beobachtete und erwartete Heterozygotie, Inzuchtkoeffizient und genetischer Diversität zeigen jeweils unterschiedliche Ränge innerhalb der untersuchten Standorte, so dass kein eindeutiger Trend zu erkennen ist. Die Tabelle 22 zeigt die gemittelten Werte beider Loci.

Die beobachtete Heterozygotie variiert in Herl zwischen 0,207 auf der Fläche „Bio1“ und 0,356 auf der Fläche „Bio4“.

Die genetische Diversität, gemittelt über beide Loci liegt in Herl zwischen 0,491 auf der Fläche „Konv1“ und 0,735 in der Teilpopulation „Bio4“. Es fällt auf, dass die ackerbaulich genutzten Flächen relativ hohe Diversitäten zeigen (0,629–0,735), während die Brachfläche, die „Wiese“ und „Konv1“ deutlich geringere Werte zeigen („Konv1“ war lange Zeit Brachfläche und wurde 2001 erstmals wieder ackerbaulich genutzt, U-Test,  $p=0,017$ ).

Tabelle 22: Populationsgenetische Parameter der Loci Arin1 und HA-7,  $H_0$ =beobachtete Heterozygotie, Stabw. = Standardabweichung,  $H_E$  = erwartete Heterozygotie,  $p$ = Wahrscheinlichkeit, dass Populationen im HW-Gleichgewicht liegen,  $H_S$ = Shannon-Diversität.

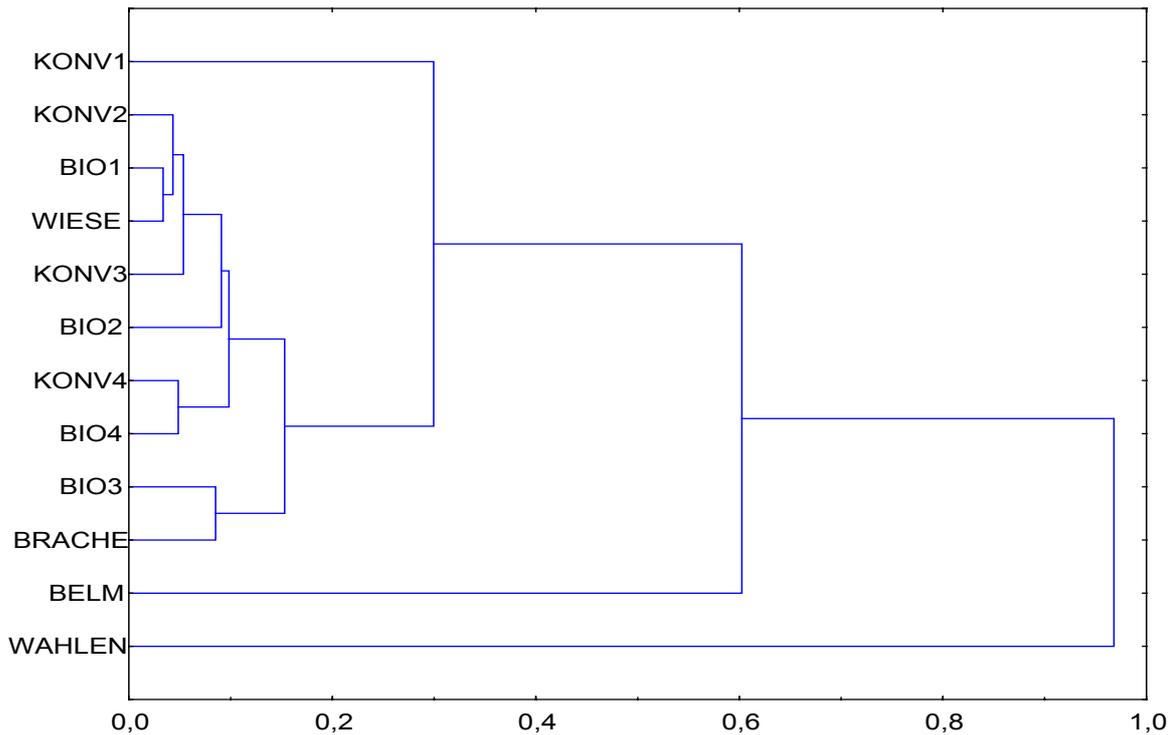
<b>Arin1/HA7</b>	<b><math>H_0</math></b>	<b>Stabw..</b>	<b><math>H_E</math></b>	<b>Stabw..</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b>Stabw.</b>	<b><math>p</math></b>	<b><math>H_S</math></b>	<b>Stabw.</b>
<b>Konv. 1</b>	0,250	0,070	0,291	0,019	0,156	0,199	0,124	0,491	0,057
<b>Konv. 2</b>	0,317	0,068	0,420	0,093	0,237	0,035	0,055	0,667	0,017
<b>Konv. 3</b>	0,287	0,060	0,406	0,122	0,314	0,032	0,014	0,629	0,076
<b>Konv. 4</b>	0,316	0,117	0,488	0,004	0,321	0,168	0,008	0,709	0,030
<b>Bio 1</b>	0,207	0,010	0,393	0,122	0,442	0,216	0,007	0,625	0,067
<b>Bio 2</b>	0,264	0,044	0,393	0,150	0,274	0,383	0,013	0,615	0,108
<b>Bio 3</b>	0,269	0,137	0,396	0,062	0,298	0,456	0,013	0,624	0,011
<b>Bio 4</b>	0,356	0,032	0,470	0,038	0,266	0,016	0,029	0,735	0,063
<b>Brache</b>	0,236	0,051	0,344	0,060	0,304	0,279	0,015	0,579	0,474
<b>Wiese</b>	0,344	0,146	0,393	0,121	0,156	0,106	0,148	0,578	0,134
<b>Wahlen</b>	0,342	0,222	0,441	0,057	0,234	0,450	0,068	0,711	0,179
<b>Belm</b>	0,000	0,000	0,166	0,144	1,000	0,000	0,000	0,331	0,261

Die  $F_{IS}$ -Werte, gemittelt über beide Loci, ergeben zwischen den beiden Bewirtschaftungsformen keine signifikanten Unterschiede (U-Test,  $p=0,686$ ).

Die  $F_{ST}$ -Werte beider Loci zeigen, den Ergebnissen der einzelnen Loci entsprechend, nur eine geringe Populationsstrukturierung innerhalb von Herl, die drei Regionen werden jedoch gut voneinander getrennt. Der Standort „Konv1“ steht innerhalb von Herl relativ isoliert, vor allem durch die Ergebnisse des Locus Arin1. Am Locus HA-7 wird keine Differenzierung zu den anderen Standorten in Herl erkennbar.

Tabelle 23: Paarweise  $F_{ST}$ -Werte aller Standorte berechnet auf Basis beider Mikrosatellitenloci

<b><math>F_{ST}</math></b>	<b>Konv. 1</b>	<b>Konv. 2</b>	<b>Konv. 3</b>	<b>Konv. 4</b>	<b>Bio 1</b>	<b>Bio 2</b>	<b>Bio 3</b>	<b>Bio 4</b>	<b>Brache</b>	<b>Wiese</b>	<b>Wahlen</b>
<b>Konv. 1</b>											
<b>Konv. 2</b>	0,064										
<b>Konv. 3</b>	0,076	-0,020									
<b>Konv. 4</b>	0,080	-0,016	-0,008								
<b>Bio 1</b>	0,053	-0,022	-0,023	-0,010							
<b>Bio 2</b>	0,108	-0,017	-0,020	-0,009	-0,016						
<b>Bio 3</b>	0,017	-0,013	-0,008	-0,001	-0,017	0,007					
<b>Bio 4</b>	0,100	-0,013	-0,006	-0,021	-0,006	-0,011	0,008				
<b>Brache</b>	-0,007	0,007	0,013	0,022	-0,002	0,036	-0,019	0,036			
<b>Wiese</b>	0,054	-0,020	-0,019	-0,009	-0,023	-0,013	-0,015	-0,005	0,000		
<b>Wahlen</b>	0,334	0,277	0,315	0,220	0,304	0,312	0,283	0,228	0,305	0,296	
<b>Belm</b>	0,015	0,187	0,204	0,202	0,174	0,245	0,117	0,229	0,071	0,174	0,435

Abbildung 25: Clusterdiagramm der  $F_{ST}$ -Werte für beide Loci

Die  $F_{ST}$ -Werte können ebenso wie die  $\Phi_{ST}$ -Werte der RAPD-Analyse in Genfluss umgerechnet werden (SLATKIN & BARTON 1989).

Zwischen vielen Flächen ist kein Genfluss feststellbar. Einige Flächen zeigen dagegen einen relativ hohen Genfluss, wie die Flächen „Bio2“ und „Bio3“ und die Flächen „Bio3 und „Bio4“. Wenn es einen durch Bewirtschaftung eingeschränkten Genfluss geben sollte, müsste der Genfluss innerhalb der Bewirtschaftungssysteme höher sein als zwischen den konventionellen und biologischen Flächen. Im Mittel ist der Genfluss innerhalb der Bewirtschaftungssysteme mit  $6,33 \pm 12,67$  zwar wesentlich höher, als zwischen den Bewirtschaftungssystemen mit  $1,45 \pm 3,69$ . Die hohen Standardabweichungen zeigen jedoch, dass die Werte sehr unterschiedlich hoch sind. Der hohe Genfluss innerhalb der Bewirtschaftungssysteme wird demnach nur von den beiden genannten Werten zwischen „Bio3“ und „Bio4“ und „Bio2“ und „Bio3“ geprägt. Demzufolge sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant (U-Test,  $p=0,371$ ).

Tabelle 24:  $N_e m$ -Werte zwischen den Untersuchungsflächen auf Basis der Mikrosatellitendaten beider Loci

$N_e m$	Konv. 1	Konv. 2	Konv. 3	Konv. 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen
<b>Konv. 1</b>											
<b>Konv. 2</b>	3,656										
<b>Konv. 3</b>	3,039	0,000									
<b>Konv. 4</b>	2,875	0,000	0,000								
<b>Bio 1</b>	4,467	0,000	0,000	0,000							
<b>Bio 2</b>	2,065	0,000	0,000	0,000	0,000						
<b>Bio 3</b>	14,456	0,000	0,000	0,000	0,000	35,464					
<b>Bio 4</b>	2,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	31,000				
<b>Brache</b>	0,000	35,464	18,981	11,114	0,000	6,694	0,000	6,694			
<b>Wiese</b>	4,380	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
<b>Wahlen</b>	0,499	0,653	0,544	0,886	0,572	0,551	0,633	0,846	0,570	0,595	
<b>Belm</b>	16,417	1,087	0,975	0,988	1,187	0,770	1,887	0,842	3,271	1,187	0,325

Die mit dem Computerprogramm POPGENE (YEH et al. 1997) berechneten genetischen Distanzen nach Nei (1972) zeigen eine große Bandbreite der Werte. Sie reichen von 0,001 zwischen den Standorten „Bio1“ und „Konv2“ und „Bio1“ und „Konv3“ und 0,401 zwischen dem Herler Standort „Bio2“ und Wahlen.

Die genetischen Distanzen innerhalb von Herl liegen zwischen 0,001 und 0,082 zwischen den Standorten „Konv1“ und „Konv4“, zwei geografisch relativ weit auseinander liegenden Standorten. Damit liegen alle genetischen Distanzen innerhalb von Herl erwartungsgemäß unter denen zwischen den Regionen Herl-Belm und Herl-Wahlen und in einem relativ eng begrenzten Bereich. Die geringsten genetischen Distanzen zwischen Herl und Wahlen waren mit 0,159 immerhin beinahe doppelt so hoch, wie die höchsten genetischen Distanzen innerhalb von Herl.

Die meisten genetischen Distanzen zwischen den Standorten in Herl und Wahlen lagen jedoch zwischen 0,300 und 0,400.

Die Belmer Tiere zeigen zur Region Herl deutlich geringere Werte als Wahlen zu Herl. Die höchste genetische Distanz zeigt die Belmer Schneckenpopulation zu Wahlen mit 0,340 und die geringste Distanz zu dem Herler Standort „Konv1“ (0,010).

Die genetischen Distanzen (NEI 1972) wurden zur besseren Anschaulichkeit als Clusterdiagramm dargestellt (Abbildung 26). Dargestellt sind hier nicht die Rohdaten sondern euklidische Distanzen. Aufgrund der höheren genetischen Distanzen

Tabelle 25.: Nei's genetische Distanzen, POPGENE (NEI 1972)

	Konv, 1	Konv, 2	Konv, 3	Konv, 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen
<b>Konv, 1</b>											
<b>Konv, 2</b>	0,047										
<b>Konv, 3</b>	0,053	0,001									
<b>Konv, 4</b>	0,082	0,039	0,035								
<b>Bio 1</b>	0,041	0,001	0,002	0,044							
<b>Bio 2</b>	0,077	0,005	0,003	0,046	0,006						
<b>Bio 3</b>	0,017	0,008	0,010	0,035	0,007	0,023					
<b>Bio 4</b>	0,072	0,005	0,005	0,025	0,009	0,007	0,019				
<b>Brache</b>	0,007	0,020	0,022	0,050	0,016	0,039	0,003	0,037			
<b>Wiese</b>	0,038	0,004	0,002	0,029	0,003	0,009	0,005	0,010	0,013		
<b>Wahlen</b>	0,294	0,345	0,350	0,159	0,361	0,403	0,286	0,302	0,293	0,317	
<b>Belm</b>	0,010	0,096	0,106	0,148	0,086	0,139	0,052	0,133	0,032	0,087	0,340

zwischen Herl-Wahlen und Herl-Belm und der relativ geringen Distanz zwischen Belm und Wahlen clustern die beiden Regionen zusammen, mit einem deutlichen Abstand zu den Herler Standorten. Betrachtet man nur die zehn untersuchten Standorte in Herl fällt der Standort „Konv4“ deutlich heraus, die anderen Standorte clustern in zwei weiteren Blöcken deutlich enger zusammen. Betrachtet man die genetischen Distanzen des Standortes „Konv4“ (Tabelle 23) sieht man, dass alle genetischen Distanzen zwischen 0,025 und 0,082 liegen, was für den Bereich Herl relativ hohe Werte sind. Ein Blick auf Karte 2 macht deutlich, dass es sich bei dem Standort „Konv4“ auch geografisch um einen abgelegenen und isoliert liegenden Standort handelt.

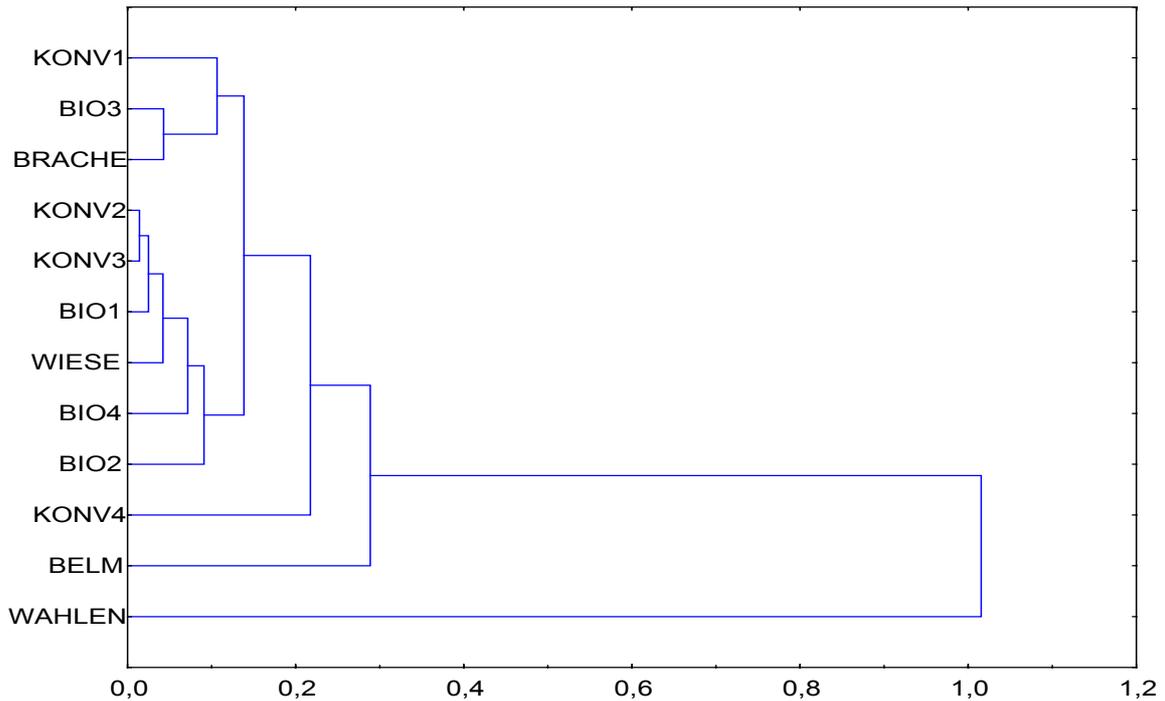


Abbildung 26: Dendrogramm der genetischen Distanzen (Nei) für beide Mikrosatellitenloci

### 9.3.4 Test auf „Isolation by distance“

Wie schon für die RAPD-Daten, wurde auch mit den Mikrosatellitendaten eine Regressionsanalyse durchgeführt, um zu testen, wie groß der Einfluss der geografischen Distanz auf die genetische Distanz ist. Trotz der geringen Populationsunterteilung wird ein signifikanter Zusammenhang zwischen genetischer und geografischer Distanz in Herl deutlich (Mantel-Test:  $p < 0,001$ ). Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,233$  kann allerdings nur ein geringer Teil der Varianz mit „Isolation by distance“ erklärt werden.

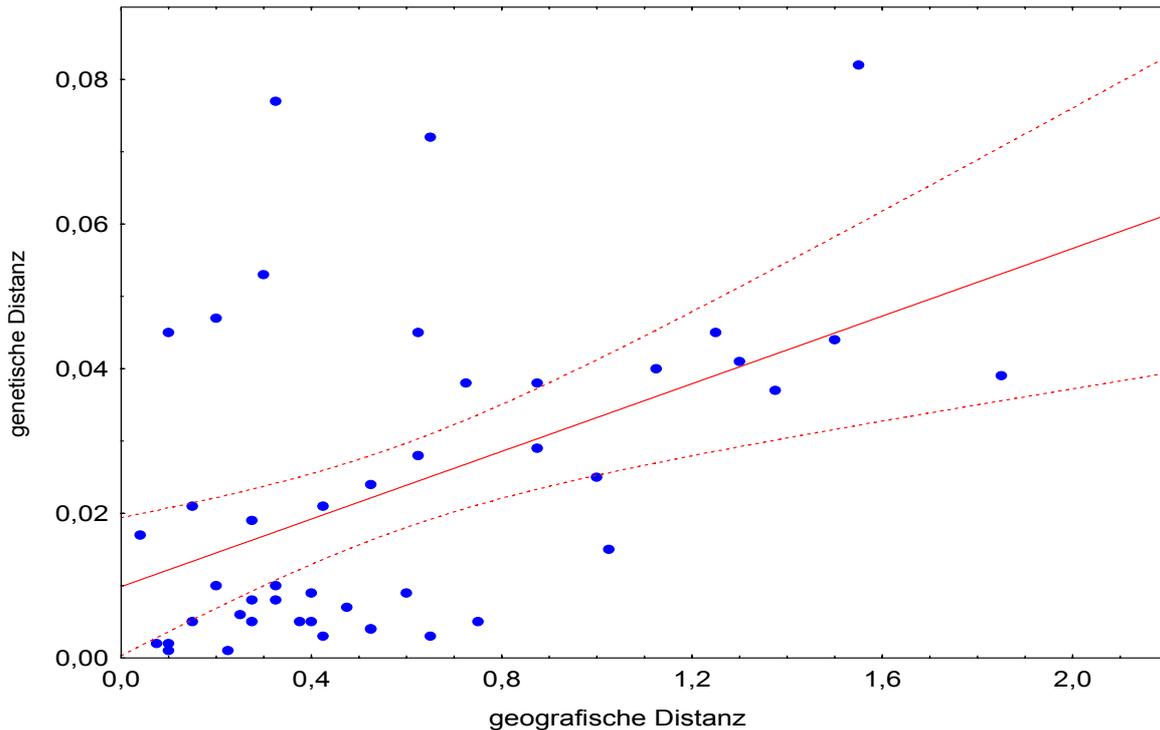


Abbildung 27: Regressionsanalyse zwischen geografischer Distanz und genetischer Distanz der Populationen in Herl nach NEI (1972) beider Mikrosatellitenloci (Mantel-Test:  $p < 0,001$ ,  $R^2 = 0,233$ )

Die Streubreite der genetischen Distanzen zwischen Herl und Wahlen ist zwar relativ hoch, die Werte sind jedoch alle höher als die genetischen Distanzen zwischen den Herler Teilpopulationen. Die Werte zwischen den Teilpopulationen in Herl liegen zwischen 0,001 und 0,082, während die genetischen Distanzen zwischen den Regionen Herl und Wahlen zwischen 0,159 und 0,403 liegen.

### 9.3.5 Hierarchische Populationsstruktur mit AMOVA

Die Verteilung der molekularen Varianz auf verschiedenen hierarchischen Ebenen wurde mit dem Softwareprogramm Arlequin (SCHNEIDER et al. 1992) durchgeführt.

Es wird hier nochmals die geringe Populationsunterteilung in Herl deutlich ( $F_{ST} = 0,015$ ). Das bedeutet, dass mit 98,5% ein Großteil der molekularen Varianz innerhalb der Populationen von Herl zu finden ist und nur ein geringer Teil (1,5 %) zwischen den einzelnen Standorten.

Zwischen den Regionen Herl und Belm sind schon ca. 13 % der Varianz auf Unterschiede zwischen den Regionen zurückzuführen, zwischen Herl und Wahlen sind es ca. 24 % und zwischen Belm und Wahlen immerhin fast 40 %. Obwohl Herl und Wahlen geografisch wesentlich näher liegen, ist die Populationsunterteilung zwischen Herl und Wahlen größer als zwischen Herl und Belm. Alle Werte sind dabei hoch signifikant.

Tabelle 26: Verteilung der molekularen Varianz auf verschiedenen hierarchischen Ebenen

AMOVA (Arin1+HA-7)	Varianzkomponente	% Varianz	F <sub>ST</sub>	P
Herl	zwischen Populationen	1,55	0,015	0,017
	innerhalb Population	98,45		
Herl und Belm	zwischen Populationen	13,25	0,132	<0,001
	innerhalb Population	86,75		
Herl und Wahlen	zwischen Populationen	24,11	0,241	<0,001
	innerhalb Population	75,89		
Belm und Wahlen	zwischen Populationen	39,49	0,394	<0,001
	innerhalb Population	60,51		

### 9.3.6 Ergebnisse der Sequenzanalyse des Locus Arin1

Durch eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte konnte die Sequenz der Mikrosatellitenregion Arin1 ermittelt werden. Der Mikrosatellitenrepeat besteht aus einer GA-Wiederholungssequenz, der bei dem 101 bp langen Allel aus sieben Wiederholungen und bei dem 103 bp langen Fragment aus acht Wiederholungen besteht (Abbildung 28 und 29).

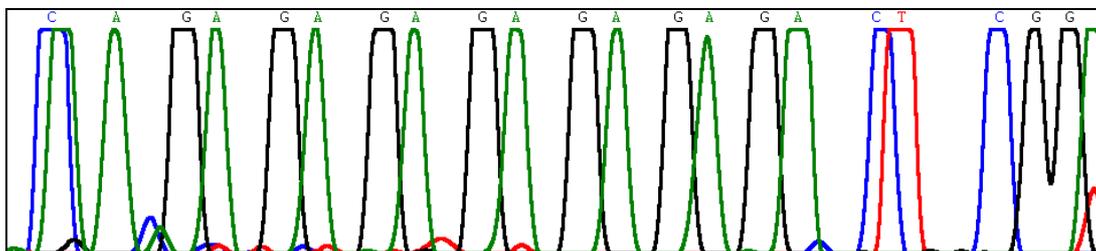


Abbildung 28: Elektropherogramm der Mikrosatellitenregion Arin 1

#### Partielle Sequenz Arin 1 R (5' - 3')

```

1 TCATCAGTCTAGGCGGGGAACGCAA GA GA GA GA GA GA GA
40 CTCGGATCCATATATNAATGACGGACACCGCTTGCT

```

Abbildung 29: Partielle Sequenz eines Mikrosatelliten-Allels von Primer Arin1

### **9.3.7 Mikrosatelliten-Genotypen**

Der Genotyp umfasst die Gesamtheit des genetischen Materials, das im Phänotyp seine Ausprägung findet. Bei der Auswertung der beiden Mikrosatellitenprimer wurden fünf Allele ausgewertet. Der Locus „HA-7“ wies drei Allele auf, die mit der Allelbezeichnung A, B und C ausgewertet wurden, der Locus „Arin1“ ging in die Auswertung mit der Allelbezeichnung D und E ein. Die verschiedenen Allelkombinationen ergaben 16 mögliche Genotypen, die auch alle in den untersuchten Individuen gefunden wurden, die Häufigkeit der Genotypen hatte jedoch eine große Spanne zwischen 33% und 0,03%. Es wurden nicht alle Genotypen in allen drei Regionen gefunden. In der Region Herl wurden alle 16 Genotypen gefunden, was sicher auch daran liegt, dass hier mit 300 untersuchten Individuen die mit Abstand größte Stichprobe vorlag.

Im Gebiet Wahlen im Nordsaarland wurden nur insgesamt neun Genotypen vorgefunden, was auch bei 30 untersuchten Individuen und in Anbetracht der Seltenheit einiger Genotypen nicht ungewöhnlich ist.

Dennoch ist hier das Fehlen des Genotypes „BBDD“ in Wahlen auffällig, da dieser Genotyp im Gesamtdatensatz der häufigste Genotyp mit einer Häufigkeit von 33 % ist, und in der Stichprobe Belm sogar mit über 80 % vorkommt.

In Belm konnten 26 Individuen mit beiden Mikrosatelliten-Loci ausgewertet werden, bei vier Individuen konnte der Locus HA-7 nicht ausgewertet werden. Auffallend ist hier, dass alle 26 Individuen nur vier von 16 Genotypen zugeordnet werden konnten und, wie oben schon erwähnt, der Genotyp „BBDD“ einen Anteil von über 80 % in der Population ausmachte. Die untersuchten Belmer Individuen waren alle homozygot.

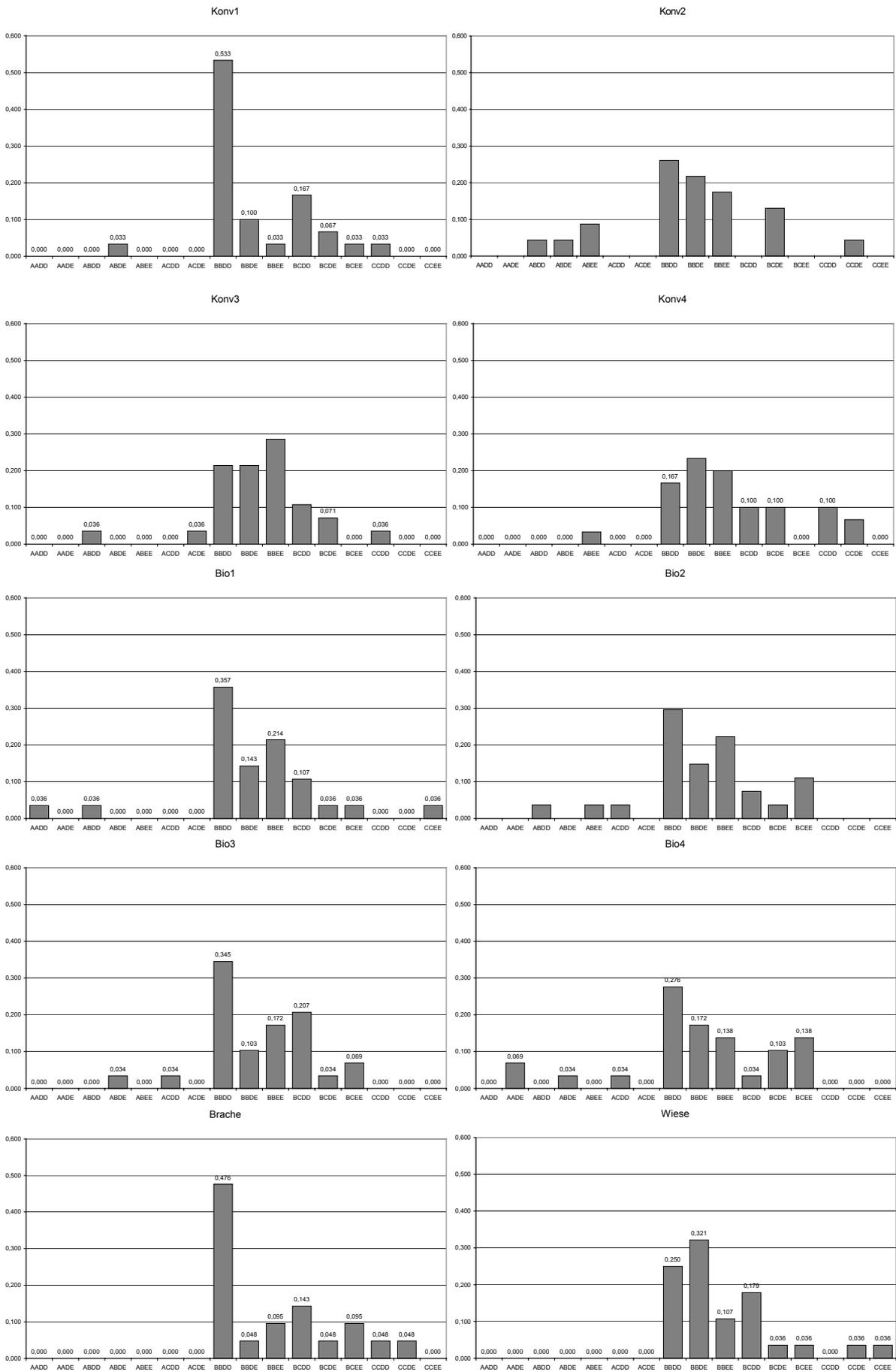


Abbildung 30 Genotypenverteilung auf den Standorten in Herl

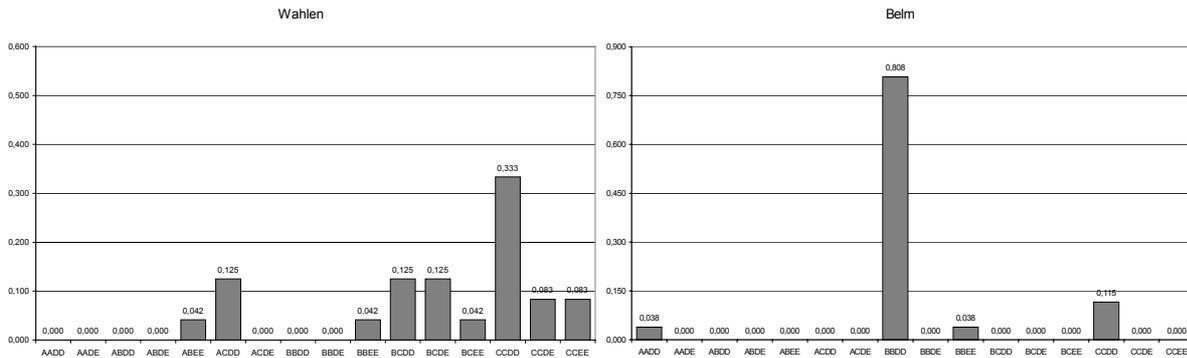


Abbildung 31: Genotypenverteilung auf den Standorten in Wahlen und Belm

Tabelle 27: Genotypenverteilung

	AADD	AADE	ABDD	ABDE	ABEE	ACDD	ACDE	BBDD	BBDE	BBEE	BCDD	BCDE	BCEE	CCDD	CCDE	CCEE	Summe
<b>Konv1</b>				1				16	3	1	5	2	1	1			8
<b>Konv2</b>			1	1	2			6	5	4		3			1		8
<b>Konv3</b>			1			1		6	6	8	3	2		1			8
<b>Konv4</b>					1			5	7	6	3	3		3	2		8
<b>Bio1</b>	1		1					10	4	6	3	1	1			1	9
<b>Bio2</b>			1		1	1		8	4	6	2	1	3				9
<b>Bio3</b>				1		1		10	3	5	6	1	2				8
<b>Bio4</b>		2		1		1		8	5	4	1	3	4				9
<b>Brache</b>								10	1	2	3	1	2	1	1		8
<b>Wiese</b>								7	9	3	5	1	1		1	1	8
<b>Wahlen</b>					1	3				1	3	3	1	8	2	2	9
<b>Belm</b>	1							21		1				3			4
<b>Herlsumme</b>	2	2	4	4	5	6	1	107	47	47	34	21	15	17	7	4	

In Herl wurden 273 Individuen den 16 Genotypen zugeordnet. Von den 27 fehlenden Individuen konnten 18 nicht am Locus HA-7 untersucht werden, acht nicht am Locus Arin1 und ein Individuum konnte an beiden Mikrosatelliten-Loci nicht analysiert werden. Innerhalb von Herl wurden zehn verschiedene Untersuchungsflächen beprobt. Vier Genotypen (BBDD, BBDE, BBEE, BCDE) konnten auf allen Teilflächen gefunden werden. Der seltenste Genotyp „ACDE“ wurde nur bei einem Individuum von 273 auf der Fläche „Konv3“ gefunden und ein anderer Genotyp (AADD), der in Herl ebenfalls nur einmal vorkam, befand sich auf der Fläche „Bio1“.

Die Bioflächen haben eine signifikant höhere Zahl von Genotypen als die restlichen Flächen in Herl (U-Test,  $p=0,016$ ), auch wenn der Unterschied nur gering ausfällt.

Betrachtet man nur den Genotyp „BBDD“, der eine hohe Variabilität innerhalb von Herl (und auch in den Regionen Wahlen und Belm) aufweist, zeigt sich tendenziell ein Süd-Nord-Gefälle (Tabelle 27 und Abbildung 32).



Abbildung 32: Klinale Abnahme der Genotypenhäufigkeit (BBDD) von Süd nach Nord

## 10. Diskussion

### 10.1 Populationsgenetische Studien mit Schnecken

Ein Problem, das sich bei der Analyse von *Arion lusitanicus* mit Mikrosatellitenmarkern ergab, waren die bislang noch nicht vorhandenen Primer. Eine Möglichkeit, die häufig angewendet wird, um dieses Problem zu umgehen, ist die „Kreuzamplifizierung“ oder „Cross-Species-Amplification“ (LEVIN et al. 1995, PANG et al. 1999, YANG et al. 1999, JORDANA et al. 1999). Hier werden Primer, die für nahe verwandte Arten entwickelt worden sind, für die zu untersuchende Art verwendet.

Die Chancen zu einem Ergebnis zu kommen, ist umso größer, je näher die Art, für die die Primer entwickelt worden sind, mit der untersuchten Art verwandt ist.

Schnecken standen bisher nicht im Mittelpunkt des Interesses der Populationsgenetik. Die meisten Untersuchungen wurden bisher meist an besonders schützenswerten Taxa durchgeführt (Stichwort: conservation genetics), um z.B. Auswirkungen von Habitatzerstörungen zu untersuchen.

Unter den relativ wenigen genetischen Arbeiten, die mit Schnecken durchgeführt worden sind, sind viele Allozymstudien. Erst in den letzten fünf Jahren findet sich eine größere Zahl von Arbeiten, die sich mit Mikrosatelliten befassen.

Viele dieser Arbeiten beschäftigen sich mit Süßwasserarten wie *Melanoides tuberculata* (SAMADI et al. 1998, 1999), *Biomphalaria pfeifferi* (CHARBONNEL et al. 2000), *Biomphalaria glabrata* (MAVÁREZ et al. 2000, 2002), *Lihasia spec.* (RUSSEL et al. 2003), *Physa acuta* (SOURROUILLE 2001), *Bulinus forskalii* (GOW et al. 2001) und *Potamopyrgus antipodarum* (WEETMAN et al. 2001), um nur einige zu nennen.

Aber auch von den für diese Untersuchung interessanteren Landschnecken sind in den letzten Jahren einige Mikrosatellitenarbeiten verfasst worden (ohne Anspruch auf Vollständigkeit). Zu erwähnen sind hier die Arbeiten von WIRTH (2000) über *Helicella itala*, GUILLER et al. (2000) und ARNAUD et al. (2001) über *Helix aspersa*, WATANABE & CHIBA (2001) über *Euhadra quaesita*, LOCHER & BAUR (2001) über *Arianta arbustorum* und von BRENDEN et al. (2002) über *Achatinella mustelina*.

Die erste Mikrosatellitenarbeit, die über die Gattung *Arion* veröffentlicht wurde, ist die Arbeit von BROOKES et al. (2001) über *Arion intermedius* und *Deroceras reticulatum*, in der für beide Arten jeweils sechs Mikrosatellitenprimer entwickelt wurden.

## **10.2 Stichprobengröße**

Wird eine große Anzahl von Allelen untersucht, sollte eine große Anzahl von Individuen untersucht werden, um ein genaues Ergebnis hinsichtlich der Allelfrequenzverteilung in einer Population zu erhalten. RUZZANTE (1998) hat in einer Untersuchung festgestellt, dass der Schätzfehler bei einer Stichprobe von 50 Individuen minimiert werden kann.

In vielen Populationsgenetischen Arbeiten ist es oft nicht möglich, derart hohe Individuenzahlen pro untersuchter Population zu besammeln, da es sich bei vielen Studien um besonders schützenswerte und oft auch seltene Arten handelt. Generell ist es jedoch sinnvoll, auf jeder untersuchten Fläche annähernd die gleiche Stichprobengröße zu besammeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden in der Mikrosatellitenanalyse 30 Individuen und in der RAPD-Analyse 19 Individuen pro Stichprobe analysiert. Da in dieser Studie, aufgrund der Tatsache, dass es noch keine bekannten Mikrosatellitenprimer gab, nur fünf Allele untersucht werden konnten, ist die Stichprobengröße als ausreichend anzusehen. Ursprünglich sollten auch in der RAPD- Analyse 30 Individuen getestet werden, allerdings wurden für den ersten Durchgang jeweils die besten Isolate verwendet. Beim zweiten Durchgang mit den restlichen Proben zeigte sich jedoch, dass die Proben nicht eine vergleichbar hohe Qualität der RAPD- Muster zeigten und damit mit den anderen Proben der Stichprobe nicht vollständig vergleichbar waren.

In diesem Zusammenhang muss noch einmal auf die Schwierigkeiten bei der DNA-Isolierung eingegangen werden. Schneckengewebe enthält relativ hohe Konzentrationen von Mucosacchariden, die im Schneckenschleim enthalten sind. Der Schleim kann zwar äußerlich entfernt werden, ist jedoch auch in den Gewebezellen vorhanden. Diese und andere Verunreinigungen können die Anlagerung der Primer erschweren und so das Ergebnis verfälschen. Es zeigte sich jedoch ebenfalls, dass die Proben, die zuvor keine zufriedenstellenden Ergebnisse in der RAPD- Analyse zeigten, dennoch mit der Mikrosatellitenanalyse ausgewertet werden konnten.

### **10.3 Diskussion RAPD-Analyse**

#### **10.3.1 Einfluss von Auswertefehlern und Reproduzierbarkeit von RAPD-Daten**

SKROCH UND NIEHUIS haben 1995 den Einfluss von Auswertefehlern und die Reproduzierbarkeit von RAPD- Daten analysiert und sind dabei zu dem Schluss gekommen, dass der Auswertefehler bei ca. 2 % und die Reproduzierbarkeit bei 76 % lag. Die Unterschiede in den Distanzberechnungen zeigte, dass der Einfluss der Stichprobennahme sechs mal größer war, als der Auswertefehler. Die Stärke der Ethidiumbromidfärbung hatte dabei keinen Einfluss auf die Distanz-Matrices. Um die Auswertefehler zu minimieren wird oft die Wiederholung der Ergebnisse empfohlen (LAMBOY 1994), obwohl auch häufig nicht replizierte Ergebnisse veröffentlicht werden (DOS SANTOS et al. 1994, BEEBE 1995, NIENHUIS et al. 1995).

ARUNA et al. (1993) z.B. haben nur intensiv gefärbte Banden mit in die Auswertung einbezogen, da diese meistens am besten reproduzierbar seien. Dieses wird auch von SKROCH & NIEHUIS (1995) bestätigt. In der oben erwähnten Untersuchung fanden sie bei den deutlich sichtbaren, „fetten“ Banden eine Reproduzierbarkeit von 96% und bei den feinen, undeutlichen Banden nur 60%. Andere Autoren wie z.B. KRESOVICH et al. (1992), YANG & QUIROS (1993) und NOVY et al. (1994) wiederum haben Banden ausgeschlossen, die nicht vollständig replizierbar waren. Als Banden werden hier generell komigrierende RAPD-Fragmente bezeichnet, die von demselben RAPD- Primer amplifiziert wurden (SKROCH & NIEHUIS 1995).

In der vorliegenden Studie wurden alle Banden in die Auswertung einbezogen, die in zwei Wiederholungen reproduziert werden konnten. In den meisten Stichproben waren das ca. 95 %. Das bedeutet, dass hier eine sehr gute Reproduzierbarkeit gewährleistet war, wobei allerdings ebenfalls festgestellt werden konnte, dass die schwachen Banden eine geringere Reproduzierbarkeit aufwiesen als die stark gefärbten Banden. Die Bandenintensität war nach unten nicht begrenzt, es wurden alle Fragmente gewertet, die als solche deutlich von Verfärbungen und Verunreinigungen des Untergrundes zu unterscheiden waren.

#### **10.3.2 Populationsstrukturierung und genetische Diversität auf Basis der RAPD-Daten**

Grundsätzlich wird die genetische Variation selektionsneutraler Loci, wie RAPD-Marker und Mikrosatelliten, von Genfluss, Gendrift, Migration, Extinktion und Rekolonisationsprozessen, Mutation und dem Paarungsverhalten beeinflusst (VIARD et al. 1997).

Es wird ein  $N_e m$ -Wert (Genfluss) von über vier als ausreichend angesehen, die genetische Drift auszugleichen (WRIGHT 1931, SCHMIDLING & HIPKINS 1998). Diesen Zustand nennt man Migrations- Drift- Gleichgewicht (KIMURA 1983). Dieses ist ein sehr allgemeiner Wert, der sicherlich differenzierter betrachtet werden muss, da genetische Drift unterschiedlich hohe Ausmaße annehmen kann und somit ein höherer Genfluss erforderlich ist, um das Migrations -Drift-Gleichgewicht aufrecht zu erhalten.

Genfluss muss auch immer im Verhältnis zur Populationsgröße gesehen werden. Da Genfluss als „Migranten pro Generation“ definiert wird, muss es natürlich einen Unterschied geben, ob z.B. vier Migranten in eine Population von 1000 oder 10000 Individuen einwandern.

Die Bandsharingrate als Ähnlichkeitsmaß ergab zwischen Belm und Herl, zwischen Wahlen und Herl und zwischen Belm und Wahlen signifikante Unterschiede aber auch zwischen den meisten Standorten innerhalb von Herl zeigte der Mann-Whitney-U-Test signifikante Unterschiede, was auf eine Differenzierung sowohl zwischen den drei Regionen als auch innerhalb von Herl hinweist.

Lediglich zwei Standorte zeigten zu anderen Flächen in Herl keine signifikanten Unterschiede. Dieses war einerseits die Fläche „Konv4“, die zu „Konv1“, „Konv3“, „Bio2“, „Bio3“ und „Bio4“ keine signifikanten Unterschiede zeigte und andererseits die Fläche „Wiese“, die zu „Bio3“ und „Bio4“ keine Unterschiede zeigte.

Drei Erklärungen erscheinen in diesem Zusammenhang plausibel. Da zum einen genetische Drift die Ähnlichkeit zwischen Flächen verringert und im Gegenzug dazu Genfluss die Ähnlichkeit erhöht, bzw. die Auswirkungen der genetischen Drift wieder aufhebt, wäre es möglich, dass an den genannten Standorten die genetische Drift so gering ist, dass sie in der kurzen Zeit der Trennung keine genetischen Unterschiede herbeiführen konnte. Andererseits könnte auch die Zeit der Trennung dieser Populationen zu kurz für eine Populationsunterteilung gewesen sein. Dieses könnte der Fall sein, wenn diese Flächen erst kurze Zeit zuvor besiedelt worden sind.

Eine dritte denkbare Erklärung könnte aber auch sein, dass Genfluss zwischen diesen Flächen besteht, der eine Differenzierung verhindert bzw. verzögert.

Im Falle der Fläche „Konv4“ erscheint die Besiedlungstheorie am plausibelsten, da die Fläche am Rand des Untersuchungsgebietes eine „Vorpostenstellung“ einnimmt. Dass die Flächen, zu denen „Konv4“ keine signifikanten Unterschiede zeigte, über das gesamte Untersuchungsgebiet verstreut liegen, macht jedoch eine eigenständige Besiedlung unwahrscheinlich, da in diesem Fall eine größere Ähnlichkeit mit den nahe gelegenen Flächen zu erwarten gewesen wäre. In diesem Zusammenhang wäre die Verschleppung durch landwirtschaftliche Geräte und Fahrzeuge denkbar.

Eine Besiedlung von verschiedenen Besiedlungsquellen mit jeweils wenigen Individuen würde auch die Beobachtung erklären, dass „Konv4“ eine hohe Zahl von

RAPD- Fragmenten aufweist aber ebenfalls einen sehr hohen Anteil monomorpher Banden besitzt. Diese Allelfixierung kann z.B. durch „Gründereffekte“ verursacht worden sein.

Die Ähnlichkeit des Standortes „Wiese“ mit den Flächen „Bio3“ und „Bio4“ kann am plausibelsten mit „Nachbarschaftseffekten“ erklärt werden. Obwohl kein generelles „Isolation by distance“ nachgewiesen wurde, zeigen einige Flächen zu ihren Nachbarflächen Genfluss. Dieses zeigt, dass Migration der Tiere zwischen benachbarten Flächen durchaus eine Rolle spielen kann.

Vergleicht man die Ergebnisse der  $\Phi$ -Statistik und der daraus abgeleiteten Genflussberechnung mit den Resultaten der Bandsharingratenberechnung, ergaben sich bei der Interpretation der besonderen Stellung der Fläche „Konv4“ keine Unterschiede. Die oben genannten Standorte, die hinsichtlich der BSR keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, zeigten bei Betrachtung des Genflusses zu „Konv4“ höhere Werte, als andere Flächen. Da allerdings die Genflussraten zwischen 1,86 und 3,42 liegen und demnach ebenfalls als gering zu bewerten sind, ist die kurze Zeit der Differenzierung hier möglicherweise ausschlaggebend.

Der geringe Genfluss zwischen dem Standort „Brache“ und den anderen Standorten in Herl, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die „Brache“ keine landwirtschaftlich genutzte Fläche ist, also auch kein Verkehr landwirtschaftlicher Fahrzeuge zwischen den Flächen existiert und zum anderen durch die Tatsache, dass die „Brache“ räumlich am Rande des Untersuchungsgebietes liegt.

Die Tatsache, dass zwischen „Konv2“ und den anderen Untersuchungsflächen kaum Genfluss besteht und dementsprechend eine deutliche Populationsunterteilung zu beobachten ist, ist schon schwieriger zu interpretieren, zumal „Konv2“ inmitten anderer Untersuchungsflächen liegt. Eine mögliche Erklärung kann hier sein, dass diese Fläche erst vor kurzem neu besiedelt wurde (Gründereffekt) bzw. einen starken genetischen Flaschenhals (bottleneck) aufgrund eines starken Populationseinbruchs durchgemacht hat. Ebenfalls in Betracht gezogen werden muss die Möglichkeit, dass Herl durch verschiedene voneinander unabhängige Kolonisierungsprozesse besiedelt wurde.

Die Ergebnisse der Diskriminanzanalyse zeigen, dass die am Südrand des Untersuchungsgebietes gelegenen Standorte („Brache“, „Konv1“, „Bio1“ und „Konv2“) stärker von den übrigen Standorten differenziert sind. Hier kann die etwas abgelegene Lage Ausschlag gebend sein, da hier weniger Genfluss (aktiv oder passiv) zwischen den Standorten besteht. Bei den Standorten „Brache“ und „Konv1“ kann auch die Zeit des Brachliegens die (passive) Ausbreitung der Tiere reduziert haben.

### 10.3.3 „Isolation by distance“

Die Regressionsanalyse der Herler Standorte zwischen der geografischen und der genetischen Distanz zeigte keinen signifikanten Zusammenhang, jedoch einen deutlich positiven Trend, nach dem die genetische Distanz sich bei Zunahme der geografischen Distanz erhöht.

Werden nur die biologisch bewirtschafteten Flächen betrachtet, zeigte sich sogar ein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,05$ ). Bei ausschließlicher Betrachtung der konventionell bewirtschafteten Flächen ergab sich dagegen kein statistischer Zusammenhang.

Dieser Unterschied zwischen den beiden Bewirtschaftungssystemen kann unter Umständen auf den höheren Genfluss zurückzuführen sein oder aber auf eine verringerte genetische Drift, aufgrund höherer Populationsdichten und besserer Nahrungsgrundlage der Tiere. Der höhere Genfluss kann einerseits auf die, im Vergleich zu den konventionellen Flächen, geringere geografische Distanz zwischen den Bioflächen zurückzuführen sein (bei aktiver Verbreitung) oder aufgrund von Verschleppung höher sein, da die Bioflächen im Gegensatz zu den konventionellen Flächen mit dem Pflug bearbeitet werden.

### 10.3.4 Einfluss der Flächennutzung

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es, den Einfluss von Flächennutzung auf *Arion lusitanicus*-Populationen mit Hilfe molekulargenetischer Methoden zu untersuchen.

Die untersuchten populationsgenetischen Parameter waren genetische Variabilität, die durch Polymorphiegrad, Bandsharingrate als Ähnlichkeitsmaß und genetische Diversität und Heterozygotie charakterisiert wird und der Grad der Differenzierung von Populationen, der durch genetische Distanzen und Maße zur Populationsstrukturierung beschrieben werden kann.

Die Unterschiede der ermittelten Werte zweier Gruppen von Untersuchungsstandorten (vier biologisch und vier konventionell bewirtschaftete Flächen) wurden mit Hilfe statistischer Tests auf Signifikanz überprüft. Die genetische Variabilität ergab bei allen analysierten Parametern keine signifikanten Unterschiede. Der Polymorphiegrad der RAPD-Marker variierte in allen untersuchten Stichproben zwischen 92% und 76%. Zwischen den biologischen und den konventionellen Flächen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden (U-Test,  $p=0,885$ ). Auch die Zahl der RAPD-Marker in einer Population kann als Variabilitätsmaß herangezogen werden. Die Zahl der RAPD-Marker lag in Herl zwischen 77 und 83, zeigte aber zwischen den

konventionell und biologisch bewirtschafteten Flächen keine signifikanten Unterschiede (U-Test,  $p=0,686$ ).

Die Bandsharingrate als Ähnlichkeitsmaß ergab ebenfalls zwischen beiden Bewirtschaftungsgruppen keine Unterschiede (U-Test,  $p=1,00$ ).

Dasselbe trifft für die genetische Diversität der RAPD -Analyse (LYNCH & MILLIGAN 1994) zu. Die Werte lagen in den beiden Gruppen zwischen 0,222 und 0,281. Der U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden getesteten Gruppen ( $p=0,680$ ). Es gab auch keine Korrelation zwischen der Bewirtschaftungsintensität, in Form der Zahl der Bearbeitungsschritte pro Fläche, und der genetischen Diversität nach LYNCH UND MILLIGAN (ANOVA,  $p=0,138$ ).

Interessanterweise gab es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Geländehöhe (m ü. NN) und der genetischen Diversität. ( $p=0,029$ ,  $R^2=0,466$ ). Dieser Zusammenhang erklärt ca. 50 % der Varianz des Datensatzes. Immerhin beträgt der Höhenunterschied im Untersuchungsgebiet Herl zwischen „Wiese“ (470 m ü. NN) und „Konv4“ (415 m ü. NN) 55 Meter. Ob es sich hierbei tatsächlich um einen funktionellen Zusammenhang handelt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Möglich wäre die Erklärung, dass das Mikroklima auf den höher gelegenen Flächen etwas kühler und feuchter ist als auf den tiefer gelegenen Flächen und es dadurch zu weniger großen Schwankungen der Populationsgröße kommt. Die Bodenfeuchte wird allerdings am wenigsten von der Geländehöhe überbeeinflusst. Hier kommen eher Faktoren wie Hangneigung, Exposition und Bodenart zum Tragen. Aber dennoch sind es gerade mikroklimatische Faktoren, die besonders bei wechselwarmen und feuchtigkeitsliebenden Organismen in entscheidendem Maße Mortalität und Fertilität beeinflussen können.

Hinsichtlich der genetischen Distanzen wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gefunden. Der Vergleich der genetischen Distanzen zwischen den vier Bioflächen unterschied sich nicht signifikant von den genetischen Distanzen zwischen den vier konventionellen Flächen (U-Test,  $p=0,240$ ). Die genetischen Distanzen zwischen den konventionellen und biologisch bewirtschafteten Flächen unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant von denen zwischen den Bioflächen (U-Test,  $p=0,590$ ) bzw. zwischen denen der konventionellen Flächen (U-Test,  $p=0,261$ ). Auch hinsichtlich des Genflusses kann kein signifikanter Unterschied zwischen den biologischen und den konventionellen Flächen beobachtet werden. Die Schwankungen der Werte sind zu groß und die Zahl der Flächen mit vier in jeder Gruppe gering. Der Mittelwert der Genflussraten zwischen den konventionellen Flächen liegt mit  $N_e m=1,35$  unter dem Mittelwert der Genflussraten zwischen den biologisch bewirtschafteten Flächen ( $N_e m=2,27$ ). Dennoch müssen die Genflussraten zwischen allen Flächen innerhalb der Gruppen als gering angesehen werden. Der

Genfluss reicht zwischen keiner der Flächen aus, um die genetische Drift auszugleichen.

Die einzige hohe Genflussrate mit  $N_e m = 9,36$  findet sich zwischen „Konv3“ und „Bio3“, also zwischen den beiden Bewirtschaftungssystemen. Dieser hohe Genfluss kommt wahrscheinlich aufgrund der geografischen Nähe beider Flächen zustande. Ein durch Flächennutzung unterbundener oder verringerter Genfluss kann demnach nicht festgestellt werden. Die Diskriminanzanalyse auf Basis der Faktorwerte der Hauptkomponentenanalyse zeigt, dass die Flächen „Bio2“, „Bio3“, „Bio4“, „Konv3“ und „Konv4“ eine relativ geringe Differenzierung aufweisen und anhand der Diskriminanzfunktion nicht voneinander getrennt werden können (vgl. Abbildung 19). Dieses Ergebnis stimmt mit den  $\Phi_{ST}$ -Werten überein (Tabelle 14).

## **10.4 Diskussion Mikrosatellitenanalyse**

### **10.4.1 Populationsstrukturierung und genetische Diversität auf Basis der Mikrosatelliten- Daten**

Die untersuchten Mikrosatellitenloci waren polymorph aber nicht besonders variabel. Am Locus „Arin1“ wurden zwei Allele nachgewiesen (101 bp und 103 bp) und am Locus „HA-7“ wurden drei Allele detektiert, deren genaue Länge aufgrund der Auswertung im Agarose- bzw. Polyacrylamidgel nicht genau angegeben werden kann. Die Größe betrug ca. 650 bp, 790 und 850 bp.

Die Variabilität von Mikrosatelliten hängt in erster Linie von der Länge des Repeatabschnittes ab (WEBER 1990). Während der exakte Repeatabschnitt des Primerpaares HA-7 nicht genau bekannt ist, konnte durch die Sequenzierung des Mikrosatellitenlocus Arin-1 ein Repeatabschnitt von sieben bzw. acht Dinukleotiden nachgewiesen werden. Dieses ist im Vergleich vieler anderer bekannter Mikrosatellitenrepeats sehr kurz und wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass sogar in drei verschiedenen Regionen nur zwei Allele nachgewiesen werden konnten. Aber auch die Art des Repeatabschnittes spielt eine Rolle, wie in Kapitel 6.3.2 schon dargestellt worden ist. Dazu kommt auch die Abhängigkeit von der Körpertemperatur der untersuchten Organismen. Poikilotherme Organismen haben oftmals eine langsamere Mutationsgeschwindigkeit.

Im Vergleich zur Studie von BROOKES et al. (2001) über *Arion intermedius*, für die der verwendete Primer entwickelt wurde, waren die Allele geringfügig kürzer. Bei *Arion intermedius* wurden zwei Allele zwischen 105 und 117 bp gefunden. Die getesteten Individuen der Art *Arion intermedius* waren alle homozygot, was auf Selbstbefruchtung in den untersuchten Populationen hinweist. Einige Arten der Gattung Arion, z.B. die Arten des Subgenus Carinarion, *Arion fasciatus*, *A.*

*circumscriptus* und *A. silvaticus* pflanzen sich hauptsächlich uniparental durch Selbstbefruchtung (Autogamie) fort (McCRACKEN & SELANDER 1980, FOLZ et al. 1982). Aber auch Parthenogenese (Automixis) kann nicht ausgeschlossen werden (RUNHAM 1993).

Die Art *Arion intermedius* z.B. ist eine solche Art, die sich hauptsächlich durch Selbstbefruchtung vermehrt. Die Art besteht daher aus mehreren homozygoten Linien, denen auch jegliche Art von Paarungsverhalten und die Ausbildung von Spermatophoren fehlt (SELANDER & OCHMAN 1983, BACKELJAU & DE BRUYN 1990, 1991). Spermatophoren werden nur während der Paarung gebildet.

FOLZ et al. konnten schon 1982 durch Allozymelektrophorese nachweisen, dass *Arion lusitanicus* sich durch Auskreuzen fortpflanzt. Es gab in der genannten Arbeit keine Hinweise, dass sich *Arion lusitanicus* durch Selbstbefruchtung fortpflanzt. Der Heterozygotiegrad lag bei  $H_0=0,082$ . Die untersuchten Populationen befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

In der vorliegenden Arbeit befand sich keine der untersuchten Populationen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, obwohl manche Populationen nur geringe Differenzen zwischen der beobachteten Heterozygotie ( $H_0$ ) und der erwarteten Heterozygotie ( $H_E$ ) zeigten. Der Unterschied zwischen  $H_0$  und  $H_E$  angegeben als  $F_{IS}$ -Wert lag z.B. auf der Fläche „Wiese“ am Locus Arin1 bei nur 0,081.

Die drei Allele des Locus HA-7 hatten hinsichtlich der Größe keine Ähnlichkeit mit den Allelen, die bei der Art *Helix aspersa* nachgewiesen worden sind (GUILLER et al. 2000). Die großen Unterschiede zwischen den Allelen von *Arion lusitanicus* und *Helix aspersa* kommen durch die geringe Verwandtschaft zwischen beiden Tierarten zustande. Dennoch zeigten die Primer Anlagerungsstellen und amplifizierten einen deutlich codominanten Marker. Aufgrund der geringen Variabilität im Vergleich zu den Allelen der Art *Helix aspersa* ist anzunehmen, dass die Längenunterschiede nicht aufgrund von Wiederholungssequenzen der Repeateinheit zustande gekommen sind, sondern vielmehr durch Einbindung wenig variabler DNA-Sequenzen.

Am Locus HA-7 zeigten vier Populationen relativ geringe  $F_{IS}$ -Werte und hatten damit nur geringe Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Diese Populationen waren „Konv1“, „Bio2“, „Bio3“ und „Wahlen“. Die drei zuletzt genannten hatten sogar negative  $F_{IS}$ -Werte, was zeigte, dass die Stichproben einen Heterozygotenüberschuss aufwiesen.

Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht können verschiedene Ursachen haben. Ein Heterozygotendefizit kann z.B. durch das Existieren von nicht detektierten Allelen hervorgerufen werden (LUNDY et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigten einige Proben kein Amplifikationsmuster. Beim Mikrosatellitenlocus HA-7 waren es immerhin 24 Proben (6,6 %), bei Arin 1 waren es nur fünf Proben (1,3%). Es besteht bei diesen Proben die Möglichkeit, dass es sich hier um Homozygote eines nicht detektierbaren Allels handelt. Dieses kann z.B. durch Mutation der Primerbindungsstelle hervorgerufen werden.

Null-Allel-Frequenzen von 15 % werden häufig gefunden, auch Frequenzen bis zu 25 % sind nicht ungewöhnlich (JARNE & LAGODA 1996). In der vorliegenden Arbeit ist die Null- Allel- Frequenz demnach relativ gering. Dennoch muss hier der Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht differenziert betrachtet werden. Das beobachtete Heterozygotendefizit muss nicht bedeuten, dass sich die Population nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Dieses kann durch die Anwesenheit von Null-Allelen hervorgerufen werden. Die Ursache für dieses Hardy-Weinberg-Ungleichgewicht muss demzufolge nicht durch das Paarungsverhalten der Tiere verursacht werden. Inzucht durch Selbstbefruchtung kann anhand dieser Daten nicht nachgewiesen werden. Es ist wahrscheinlich, dass sich *Arion lusitanicus* hauptsächlich durch geschlechtliche Vermehrung reproduziert.

Fixations-Indices, die auf dem SMM basieren (z.B.  $R_{ST}$ ), zeigen generell höhere Werte, als die IAM-basierten Schätzwerte, da die meisten Mikrosatelliten schrittweise mutieren (DI RIENZO et al. 1994, GOLDSTEIN & POLLOCK 1997). Dennoch hat auch das IAM-Modell in Populationen eine Berechtigung, die sich erst vor kurzer Zeit getrennt haben und in denen die genetische Differenzierung vor allem durch genetische Drift und nicht durch Mutationen hervorgerufen wird (LUNDY et al. 1999).

Da die exakte Sequenzwiederholung und die genaue Länge des Repeatabschnittes bei dem Mikrosatellitenlocus HA-7 nicht bekannt war, konnte der  $R_{ST}$ - Koeffizient nicht berechnet werden. Alternativ dazu wurde der  $F_{ST}$ - Index berechnet. Aufgrund der Tatsache, dass sich die untersuchten Teilpopulationen erst in den vergangenen 20 Jahren von vermutlich einer oder wenigen Flächen ausgebreitet haben, ist davon auszugehen, dass nicht Mutation als Differenzierungsmechanismus im Vordergrund steht, sondern Gendrift als umweltstochastischer Einfluss. Dass Mutation an den untersuchten Loci keinen relevanten Einfluss hat, zeigt auch die geringe Anzahl von Mikrosatelliten- Allelen.

Die Mikrosatellitenanalyse zeigt innerhalb von Herl eine nur geringe Populationsstrukturierung. Am Locus „Arin1“ war nur zwischen der Fläche „Konv1“ und vielen anderen Flächen in Herl eine mittlere bis große Populationsstrukturierung zu erkennen. Zum nahe gelegenen Standort „Brache“ zeigte „Konv1“ die geringste Populationsstrukturierung (demnach den höchsten Genfluss), was auch die RAPD-Analyse bestätigte. Die Brache zeigte noch eine große Populationsdifferenzierung zu

den Flächen „Bio2“ und „Bio4“, alle anderen Standorte wiesen keine oder nur eine geringe Populationsstrukturierung (durch hohen Genfluss) auf.

Der Locus „HA-7“ zeigte im Gegensatz dazu innerhalb von Herl und zwischen Belm und Herl eine sehr geringe Populationsstrukturierung. Andererseits wird an diesem Locus eine sehr hohe Populationsstrukturierung zwischen Herl und Wahlen und Belm und Wahlen deutlich.

Die Tatsache, dass die drei Regionen, bei Betrachtung der beiden Loci, eine sehr hohe Populationsstrukturierung aufweisen und innerhalb von Herl eine sehr geringe (mit Ausnahme des Standortes „Konv1“) deutet darauf hin, dass einerseits die genetische „Ausstattung“ einer Population durch die Populationsgründung bei Einwanderung bzw. Einschleppung in ein Gebiet einen Einfluss hat, bzw. das Genfluss zwischen den einzelnen Teilpopulationen (in Herl) eine stärkere Differenzierung in der kurzen Zeit seit der Einschleppung (ca. 20 Jahre) verhindert hat. Die genetische Drift war jedenfalls nicht ausreichend, um innerhalb von Herl eine ähnlich hohe Differenzierung zu erreichen wie zwischen Herl und Wahlen, und zwischen Herl und Belm.

#### **10.4.2 Gründereffekt und genetischer Flaschenhals**

Viele Invertebraten haben in ihrer Entwicklung Phasen, in denen es schnell durch starke Mortalität während der Überwinterung zu geringen Populationsgrößen kommen kann. Diese Populationsschwankungen bewirken genetische Flaschenhälse, bei der nur wenige Individuen überleben und zum Aufbau der nächsten Generation beitragen. Das gleiche Phänomen tritt auf, wenn wenige Individuen eine neue Population gründen (founder effect). Prinzipiell können für die Schneckenpopulationen beide Faktoren bedeutsam sein.

Da es sich um eine invasive Art handelt, die erst vor ca. 20 Jahren in das Gebiet gelangt ist, bestand die ursprüngliche Gründerpopulation aus einer begrenzten Zahl von Individuen. Spekulationen über die Zahl der Tiere, die verschleppt worden sind, sind sicher schwer anzustellen, da es sich aber um ökologischen Gemüseanbau im gewerblichen Maßstab handelt, ist eine relativ große Zahl verschleppter Individuen durch Ausbringen des Kompostes wahrscheinlich.

Anhand der Ergebnisse, besonders der Mikrosatellitenanalyse, liegt die Vermutung nahe, dass speziell bei den untersuchten Populationen der Gründereffekt eine wichtigere Rolle spielt, als der genetische Flaschenhals. Das wird dadurch deutlich, dass die drei Regionen gut voneinander abgrenzbar sind und die genetischen Distanzen zwischen den Regionen größer sind, als zwischen den Standorten in Herl. Genetische Flaschenhälse können jedoch durch Genfluss in ihren Auswirkungen

abgeschwächt werden. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass der Genfluss innerhalb von Herl die Ähnlichkeit der Stichproben aufrecht erhält.

### 10.4.3 „Isolation by distance“

Die Regressionsanalyse auf Basis der genetischen Distanzen beider Mikrosatellitenloci (Abbildung 26) ergab innerhalb des Untersuchungsgebietes Herl einen signifikanten Zusammenhang zwischen geografischer Distanz und genetischer Distanz (NEI 1972). Wie schon bei der Analyse der RAPD-Daten, kann dieses als ein Hinweis auf deutliche Arealeffekte auf die genetische Populationsstruktur gedeutet werden. Allerdings wird nur ein kleiner Teil der Varianz des Datensatzes durch „Isolation by distance“ erklärt ( $R^2 = 0,233$ ), so dass dieses nicht als alleinige Erklärung für die beobachtete Populationsstrukturierung dienen kann.

### 10.4.4 Einfluss der Flächennutzung

Hinsichtlich der  $F_{IS}$ -Werte beider Loci war kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Bewirtschaftungssystemen zu erkennen (U-Test,  $p = 0,686$ ). Es waren auch keine statistischen Unterschiede zwischen den drei Dichteklassen und dem Inzucht-Koeffizient ( $F_{IS}$ ) festzustellen (Kruskal-Wallis,  $p=0,313$ ,  $p=1,000$ ,  $p= 0,472$ ).

Die genetischen Distanzen waren allerdings innerhalb der biologisch bewirtschafteten Flächen signifikant kleiner als innerhalb der konventionellen Flächen (U-Test,  $p=0,009$ ). Hier spielt sicher auch die geringere geografische Distanz zwischen den Bioflächen eine Rolle.

Die genetische Diversität ( $H_S$  und  $H_E$ ) unterschied sich nicht zwischen den biologisch und den konventionell bewirtschafteten Flächen (U-Test,  $p=0,886$ ).

Die genetische Diversität, angegeben als  $H_S$  (Shannon-Diversität) bzw.  $H_E$  (erwartete Heterozygotie) war bei Betrachtung der ackerbaulich genutzten Standorte signifikant höher als auf den nicht ackerbaulich genutzten Flächen (Konv1, Brache und Wiese). „Konv1“ ging hier als nicht ackerbaulich genutzte Fläche in die Berechnung ein, da auf dieser Fläche 2001 erstmalig, nach langer Zeit, wieder Getreide angebaut wurde. Dieses Ergebnis wird mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test bei beiden Loci bestätigt (Arin1:  $p=0,033$ , HA-7:  $p=0,017$ ). Dieses Ergebnis kann möglicherweise als Hinweis darauf gedeutet werden, dass Flächennutzung, unabhängig von biologischer oder konventioneller Bewirtschaftung, einen Einfluss auf die genetische Diversität von Arion-Populationen haben kann.

### 10.5 Vergleich der Ergebnisse der RAPD- und Mikrosatellitenanalyse

Grundsätzlich wird deutlich, dass die Mikrosatellitenanalyse deutlich höhere Diversitätswerte zeigt als die RAPD-Analyse. Diese Unterschiede sind unabhängig vom berechneten Diversitätsindex. Dieses verdeutlicht trotz der geringen Anzahl untersuchter Loci die Höhe der beobachteten genetischen Variation. Die Größenordnung, in der die Werte beider Analysen liegen, deckt sich im Großen und Ganzen mit den Angaben in der Literatur. Die Höhe der Diversität ist u.a. für die Berechnung der Populationsunterteilung von Bedeutung. Bei höherer Diversität ergibt sich ein geringerer  $F_{ST}$ -Wert, was auch in dieser Arbeit bestätigt werden kann.

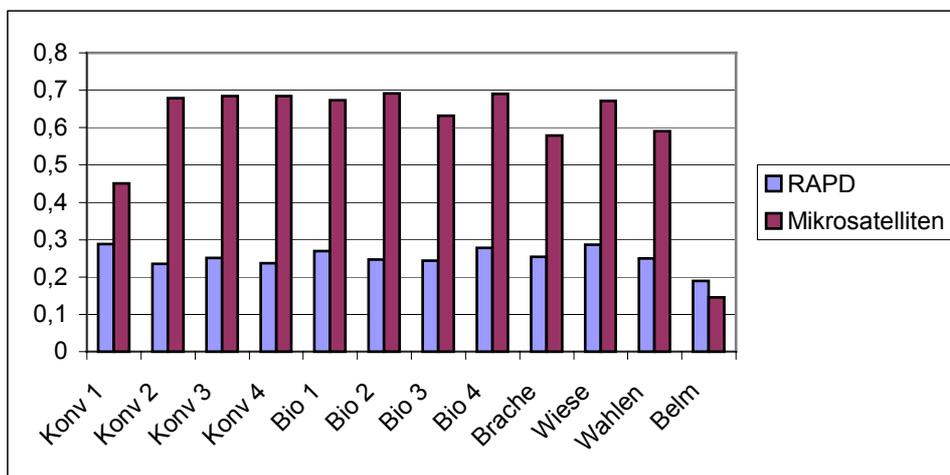


Abbildung 33: Vergleich der genetische Diversität zwischen RAPD-Analyse und Mikrosatellitenanalyse, Für die Mikrosatellitenanalyse wurde die genetische Diversität nach Nei (1972) berechnet, die Daten der RAPD-Analyse wurden nach Lynch & Milligan (1994) berechnet.

Hinsichtlich der genetischen Diversität konnte mittels Regressionsanalyse keine signifikante Übereinstimmung der RAPD-Daten mit den Ergebnissen der Mikrosatellitenanalyse festgestellt werden. Die RAPD-Daten zeigten keine Übereinstimmung zu den Mikrosatellitendaten des Locus Arin1 ( $p=0,591$ ) und HA-7 ( $p=0,495$ ). Allerdings konnte auch keine signifikante Übereinstimmung zwischen den beiden Mikrosatellitenloci festgestellt werden ( $p=0,326$ ). Die genaue Übereinstimmung einzelner Loci ist auch nicht zu erwarten. Der Mittelwert über verschiedene Loci soll verschiedene Tendenzen einzelner Loci ausgleichen. Die RAPD-Daten sind gewissermaßen ein Mittelwert über 94 verschiedene Loci.

Einerseits kann die Mikrosatellitenanalyse die Trennung der Standorte Wahlen und Belm deutlicher darstellen, als die RAPD-Analyse, andererseits zeigt die RAPD-Analyse eine deutlichere Unterteilung innerhalb der Herler Areal. Da mit keinem

Mikrosatellitenlocus für sich alleine genommen, die Trennung von Herl, Wahlen und Belm gelingt, sondern erst die Kombination beider Loci zu einem befriedigenden Ergebnis kommt, könnten möglicherweise weitere Loci die „Auflösung“ der genetischen Unterschiede innerhalb von Herl deutlicher herausstellen. Dennoch ist bei Analyse von fünf oder zehn Loci der methodische Aufwand, bei bekannten Loci und vorhandenen Primern, bei der Mikrosatellitenanalyse deutlich geringer als bei der RAPD- Analyse. Bei der RAPD- Analyse ist vor allem das Finden geeigneter Primer, die Eichung aller relevanten Parameter innerhalb der PCR, die standardisierte Wiederholung und schließlich die Auswertung der Amplifikationsmuster besonders zeitaufwändig.

Es ist eine größere Anzahl dominanter als codominanter Marker erforderlich um eine vergleichbare Auflösung zu erreichen (SMOUSE & CHEVILLON 1998). Auch die widersprüchlichen Ergebnisse beider molekulargenetischer Methoden hinsichtlich des Einflusses der Bewirtschaftung auf die genetische Diversität muss daher differenziert betrachtet werden. Unter Berücksichtigung der Zahl der untersuchten Loci gibt die RAPD-Analyse einen besseren Überblick auf die genetische Variation der Schneckenpopulationen als die zwei Genorte der Mikrosatellitenanalyse.

### **10.6 Ausbreitung und Verbreitung**

Die aus Spanien und Portugal stammende Art *Arion lusitanicus* kann, wie schon im Kapitel 4.3 ausgeführt wurde, leicht über weite Strecken verschleppt werden. Eine Verschleppung über Kompost, Schnittblumen oder Salat und Gemüse scheint ein normaler Ausbreitungsmechanismus zu sein. Der Weg über die Gärten in die Siedlungsbereiche wird von vielen Stellen berichtet. Der Einschleppungsvorgang, der vermutlich zu der Etablierung der Art in Herl geführt hat, wurde schon in Kapitel 3.1.1 geschildert. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass es sich um verschiedene, voneinander unabhängige, Einwanderungsereignisse gehandelt hat. Je schneller sich die Art in Deutschland ausbreitet, desto größer wird die Möglichkeit, dass von weiteren Standorten Tiere in das Gebiet gelangen. Es gibt anhand der, in dieser Arbeit erhobenen Daten keinen Anhaltspunkt für eine mehrfache Besiedlung des Gebietes aus unterschiedlichen Besiedlungsquellen. Die RAPD- Daten zeigen, dass es vier Standorte in Herl gibt, die stärker differenziert sind, als die anderen Standorte („Brache“, „Konv1“, „Konv2“ und „Bio1“). Diese stärkere Differenzierung kann jedoch durchaus mit stärkerer genetischer Drift oder verminderten Genflusses aufgrund der randlichen Lage erklärt werden. Die Standorte Belm und Wahlen sind allerdings noch stärker von den Flächen in Herl differenziert.

Die Ergebnisse der RAPD -Analyse lassen den Schluss zu, dass die genetische Ausstattung einer Population bei der Besiedlung, der so genannte Gründereffekt, zumindest in einem kurzen Zeitraum (ca. 20 Jahre) stärker ins Gewicht fällt, als umweltstochastische Prozesse wie Gendrift und Selektionsprozesse. Hier wäre es interessant, die Entwicklung der genetischen Differenzierung in der Zukunft weiter zu verfolgen. Ebenfalls interessant wäre es, zu untersuchen, wie stark sich die Population in Herl von der Pforzheimer „Stammpopulation“ oder von Populationen des Ursprungsgebietes in Spanien differenziert hat.

Nicht eindeutig beantwortet werden kann die Frage, ob die Tiere, einmal auf den landwirtschaftlichen Nutzflächen angekommen, sich hauptsächlich aktiv (durch Migration) oder passiv (durch weitere Verschleppungsvorgänge) ausbreiten. Es gibt jedoch Hinweise, dass beide Ausbreitungsmechanismen innerhalb von Herl stattfinden. Zum einen zeigt das Verbreitungsgebiet in Herl eine beinahe linienhafte Struktur, die sich mehr oder weniger entlang eines asphaltierten Hauptwirtschaftsweges erstreckt. Vor allem an der nördlichen Verbreitungsgrenze der Herler Population findet man die Tiere hauptsächlich an den angrenzenden Parzellen, nur wenige Meter von dem Weg entfernt. Auch die drei Parzellen, die am nördlichen Rand der Siedlung in Herl liegen, befinden sich direkt an einer asphaltierten Straße. Diese Wege werden natürlich von allen Landwirten in Herl auf dem Weg zu ihren landwirtschaftlichen Flächen stark frequentiert. Überall dort, wo schwere landwirtschaftliche Maschinen bewegt werden, wird auch zwangsläufig organisches und anorganisches Material (Boden) verteilt, in dem sich Eier, Jungtiere oder adulte Tiere befinden können.

Das Ausmaß der Verschleppung von Schnecken ist sicher auch von der Art der Bodenbewirtschaftung abhängig. Wie in Kapitel 5.2.2 schon beschrieben wurde, arbeitet ein konventionell wirtschaftender Landwirt („Konv2“, „Konv3“, „Konv4“) pfluglos. Durch diese Art der Bewirtschaftung kann die Verfrachtung von Boden und damit von Schnecken reduziert sein.

In Tabelle 17 wurde dargestellt, dass der Genfluss zwischen den Bio-Flächen mit  $N_e m = 2,27$  höher ist als zwischen den konventionellen Flächen ( $N_e m = 1,36$ ). Da die Flächen des Biobetriebes jedoch mit durchschnittlich ca. 340 m wesentlich näher aneinander liegen, als die Flächen des konventionellen Betriebes mit ca. 800 m, scheint hier die geografische Distanz die Unterschiede in den durchschnittlichen Genflussraten zu erklären. Da die Regressionsanalyse zumindest bei den konventionellen Flächen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen geografischer und genetischer Distanz ergaben ( $p = 0,814$ ) ist daher eine andere Erklärung notwendig. Das hier kein „Isolation by Distance“ nachgewiesen werden konnte, kann zum einen mit dem verringerten Genfluss aufgrund der Bodenbearbeitung zusammenhängen zum anderen aber auch mit höherer Gendrift,

die die genetische Differenzierung aufgrund stärkerer Populationsgrößen-schwankungen verstärkt. Eine größere genetische Drift ist bei den konventionellen Flächen aufgrund der geringeren Dichten durchaus möglich.

Eine Frage, die sich unweigerlich stellt ist, ob die Verschleppungstheorie mit „Isolation by Distance“ im Widerspruch steht. Grundsätzlich ist bei einer reinen Verschleppung zwischen verschiedenen Standorten nicht unbedingt mit „IbD“ zu rechnen, es sei denn, die Landwirte fahren nicht willkürlich zwischen verschiedenen Flächen hin und her, sondern fahren von einer Fläche zu der nächst gelegenen, soweit sich dieses mit dem Bearbeitungsplan vereinbaren lässt. Außerdem ist zusätzlich eine aktive Verbreitung zwischen Nachbarflächen wahrscheinlich.

Ein weiterer Hinweis auf Verschleppung innerhalb von Herl wird bei Betrachtung des Genflusses zwischen der Fläche „Wiese“ und den übrigen Flächen in Herl deutlich. Während der Genfluss zwischen „Wiese“ und den Nachbarflächen „Bio3“, „Bio4“ und „Konv3“ relativ hoch ist, sinkt er mit zunehmender Entfernung. Also ein klassisches „IbD“, mit Ausnahme der Fläche „Konv1“, zu der ein höherer Genfluss besteht, als z.B. zu benachbarten Flächen wie „Konv3“ und „Bio4“. Da diese beiden Flächen („Konv1“ und „Wiese“) demselben Landwirt gehören, scheint hier eine Verschleppung zwischen beiden Flächen plausibel zu sein.

Ein Beispiel für aktive Ausbreitung der Tiere ist die Fläche „Brache“. Diese Fläche liegt zum einen etwas abgelegen und ist zum anderen die einzige Fläche, die nicht landwirtschaftlich bewirtschaftet wird. Dennoch zeigt sie zur nächstgelegenen Fläche („Konv1“) den höchsten Genfluss.

Ein Effekt, der die umweltstochastischen Einflüsse ausgleichen kann aber an Hand genetischer Daten nicht bewertet werden kann, ist die Rekolonisierung aus Randstreifen und Grasrainen. Die mikroklimatischen Umweltbedingungen in Grasrainen, Hecken und ihren Säumen und den Säumen und Mänteln von Feldgehölzen bieten für Schnecken gute Voraussetzungen zum Aufbau größerer Bestandsdichten (RÖSER 1988).

## 11. Schlussfolgerungen

- Hinsichtlich der Populationsdichte von *Arion lusitanicus* gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen biologischen und konventionellen Flächen, obwohl drei der vier biologischen Flächen hohe Dichten aufwiesen. Da diese drei Flächen sich durch einen dichten Unterwuchs auszeichneten, wird vermutet, dass die Beschaffenheit und Dichte des Unterwuchses einen entscheidenden Einfluss auf die Populationsdichte hat.
- Die Flächen mit hohen Populationsdichten zeigten allerdings keine signifikant höheren Diversitätswerte als die Flächen mit geringerer Populationsdichte. Auch zeigten die Flächen mit geringer Dichte keine stärkere Differenzierung zu den anderen Flächen.
- Die Populationen auf den Bio-Flächen zeigten keine höheren genetischen Diversitätswerte als die konventionellen. Allerdings war bei der RAPD-Analyse auf den extensiveren Referenzflächen „Wiese“ und „Konv1“ eine höhere genetische Diversität zu beobachten. Auch die Fläche „Brache“ lag hier im oberen Bereich. Hier wären mehr Vergleichsflächen zur Untermauerung der Ergebnisse wünschenswert.
- Bei der RAPD-Analyse zeigten nur die Bioflächen ein deutliches „Isolation by Distance“, ob es hier aufgrund der theoretisch besseren Verschleppung der Tiere durch die Pflugbearbeitung kommt, kann nur vermutet werden.
- Insgesamt scheinen jedoch Arealeffekte die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit zwischen Teilpopulationen zu bestimmen.
- Der Vergleich der Mikrosatelliten-Genotypen zeigte keinen Unterschied zwischen den konventionellen und biologischen Flächen in Herl, es zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede zu den Vergleichsregionen Belm und Wahlen.

## 12. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Landbewirtschaftung und Flächennutzung auf die genetische Populationsstruktur und genetische Variabilität des Neozoen *Arion lusitanicus* zu untersuchen. *Arion lusitanicus* ist eine ihr Areal schnell ausweitende Nacktschneckenart. Diese Art wurde ausgewählt, da sie aufgrund ihrer geringen Mobilität gut einzelnen Parzellen zugeordnet werden kann und sie den Umwelt- und Bewirtschaftungseinflüssen gegenüber besonders exponiert ist. Darüber hinaus ist das Alter der recht jungen Population in Herl gut bekannt, so dass genetische Veränderungen rezent wirkenden Umwelt- und Bewirtschaftungseinflüssen zugeordnet werden können.

Um kleinräumliche Effekte der verschiedenen Bewirtschaftungssysteme untersuchen zu können, wurden in der Hunsrück-Gemeinde Herl zehn, größtenteils landwirtschaftlich genutzte Untersuchungsflächen ausgewählt. Darunter fielen vier ökologisch und vier konventionell bewirtschaftete Flächen mit teilweise unterschiedlicher Flächennutzungsdynamik. Darüber hinaus wurden eine langjährige Brachfläche und eine Dauergrünlandfläche mit in die Untersuchung einbezogen. Als Referenzgebiete wurden Wahlen im Nordsaarland und Belm im südlichen Niedersachsen ausgewählt, um die Ergebnisse des Hauptuntersuchungsgebietes Herl besser bewerten zu können.

Zum Einsatz kamen zwei grundsätzlich unterschiedliche, PCR-basierte, molekulargenetische Analysemethoden. Die RAPD-Analyse (randomly-amplified-polymorphic DNA) und die Mikrosatellitenanalyse. Die dominanten RAPD-Marker sind größtenteils selektionsneutral und eignen sich daher gut zur Analyse der genetischen Variabilität und Populationsdifferenzierung von Arten, deren Genom unbekannt ist und daher keine spezifischeren Methoden angewandt werden können. Die Mikrosatellitenanalyse ist eine solche Methode, die prinzipiell die genaue Kenntnis der hochvariablen DNA-Regionen erfordert. Da dieses für *Arion lusitanicus* nicht der Fall war, wurden bekannte Mikrosatellitenprimer anderer Molluskenarten erfolgreich getestet. Zwei Mikrosatellitenloci zeigten auswertbare Ergebnisse. Obwohl die beiden Loci polymorph waren, waren sie nicht sonderlich variabel. So konnten insgesamt nur fünf Allele ausgewertet werden. Im Vergleich dazu sind in der RAPD-Analyse 94 polymorphe Marker ausgewertet worden.

Im Vergleich der konventionell und biologisch bewirtschafteten Parzellen konnten mit beiden molekulargenetischen Methoden kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der analysierten Parameter (genetische Diversität, genetische Distanzen und Populationsstrukturierung) gefunden werden. Insbesondere die RAPD-Analyse zeigte im Untersuchungsgebiet eine Populationsunterteilung, die aufgrund reduzierten Genflusses und Gendrift durch umweltstochastische Einflüsse zustande

kommen kann. An Hand der molekulargenetischen Daten wird vermutet, dass im Untersuchungsgebiet Herl sowohl aktives Dispersal als auch Verschleppung zwischen Teilpopulationen eine Rolle spielen kann. Ein Teil der Populationsstrukturierung kann durch „Isolation by distance“ erklärt werden. Bei „Isolation by distance“ nimmt die Ähnlichkeit zwischen Populationen mit zunehmender Entfernung ab. Obwohl eine Regressionsanalyse einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe ü. NN und der genetischen Diversität der einzelnen Stichproben nachweisen konnte ( $p=0,029$ ), fällt es schwer funktionelle Zusammenhänge herzustellen. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass abiotische Faktoren wie Temperatur und Bodenfeuchte einen Einfluss auf die Mortalität und Vitalität und damit auf die genetische Struktur von Schneckenpopulationen haben.

Hinsichtlich der Bewirtschaftung zeigten drei Schneckenpopulationen in Herl besonders bei der Mikrosatellitenanalyse geringere genetische Diversitäten. Dies waren eine Brachfläche, eine Wiese und eine Fläche, die bis zum Jahr 2001 lange brachgelegen hatte. Der Unterschied zwischen diesen drei Flächen und den restlichen ackerbaulich genutzten Flächen war auf Basis beider Mikrosatellitenloci signifikant (Arin1: U-Test,  $p=0,033$ ; HA-7:  $p=0,017$ ). Bei der RAPD-Analyse zeigten die Flächen „Konv1“ und „Wiese“ höhere Diversitäten, die Fläche „Brache“ lag ebenfalls hinsichtlich der Diversität im oberen Bereich. Da bei der RAPD-Analyse 94 Genorte analysiert wurden, während es bei der Mikrosatellitenanalyse nur zwei Loci waren, sind die RAPD-Ergebnisse vertrauenswürdiger. Diese Ergebnisse können möglicherweise als Hinweis darauf gedeutet werden, dass Flächennutzung, unabhängig von biologischer oder konventioneller Bewirtschaftung, einen Einfluss auf die genetische Diversität von *Arion lusitanicus* haben kann.

### 13. Literaturverzeichnis

- Aldrich, P. R.; Hamrick, J. L.; Chavarriaga, P., et al., 1998: Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology* 7 (8): pp 933-944
- Allendorf, F.W. und Leary, R.F., 1986: Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: Soulé, M.E. (ed.): *Conservation Biology, The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., pp 57-76
- Anonymus, 2002: Konzept zur guten Landwirtschaftlichen Praxis im Freistaat Thüringen
- Arnaud, J. F.; Madec, L.; Guiller, A., et al., 2001: Spatial analysis of allozyme and microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Molecular Ecology* 10 (6): pp 1563-1576
- Aruna, M. Ozias-Akins, P., Austin, M.E., Kochert, G., 1993: Genetic Relatedness among Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) cultivars determined by DNA Amplification using arbitrary primers. *Genome* 36: pp 971-977.
- Bachtrog, D., Agis, M., Imhof, M., Schlotterer, C., 2000: Microsatellite variability differs between dinucleotide repeat motifs-evidence from *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 17: pp 1277-1285
- Backeljau, T. & De Bruyn, L., 1990: On the infrageneric systematics of the genus *Arion* Férussac, 1819 (Mollusca, Pulmonata). *Bulletin de l'institut Royal de Sciences Naturelles de Belgique, Biology*. 60: pp 35-68
- Backeljau, T. & De Bruyn, L., 1991: Preliminary report on the genetic variability of *Arion intermedius* in Europe (Pulmonata), *Journal of Medical and applied Malacology* 3: pp 19-29
- Backeljau, T., Winnepeninckx, B., Jordaens, K., De Wolf, H., Breugelmans, K., Parejo, C., Rodríguez, T.: Protein electrophoresis in Arionid taxonomy. - In: *Monograph of the British Crop Protection Council*, 66(1996): pp. 21-28
- Balloux, F. & Lugon Moulin, N., 2002: The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: pp 155-165
- Beebe, S. E.; Ochoa, I.; Skroch, P. et al., 1995: Genetic diversity among common bean breeding lines developed for Central America. *Crop Science* 35 (4): pp 1178-1183
- Beer, G. J., 1989: Levels and economics of slug damage in potato crops 1987 and 1988: Monograph - British Crop Protection Council (No. 41): pp 101-105
- Bender, C., 1999: Populationsgefährdungsanalyse der Mauereidechse (*Podarcis muralis*): demographische und genetische Grundlagen, Dissertation Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt
- Bergmann F. & Leinemann, L., 2000: Nutzen molekularer Marker bei der Ausweisung von Genreservaten (Genressourcen). In: Finkeldey, R., Bonfils, P. & Landolt R. (Hrsg.): *Forstliche Genreservate*. Swiss federal Research Institute WSL, Birmensdorf: pp 115-120
- Bernstein, F., 1930: Über die Erbllichkeit der Blutgruppen. *Zeitschrift für Abstammung und Vererbungslehre*, 54: pp 400-426
- Bijlsma, R., Ouborg, N.J. & van Treuren, R., 1991: Genetic and phenotypic variation in relation to population size in the plant species: *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria*. In *species Conservation: A population-Biological approach*, Seitz, A., and Loeschcke, V. (eds). Birkhäuser Verlag, Basel: pp 89-101

- Blab, J., 1993: Grundlagen des Biotopschutzes, Schriftenreihe für Landschaftspflege und Naturschutz, Heft 24, Bonn-Bad Godesberg
- Borowski, R.L., 2000: Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*: pp 1 - 6
- Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomforde, J., Minch, E., Kidd J.R. & Cavalli-Sforza, L.L., 1994: High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368: pp 455-457
- Brakefield, P.M., 1992: Population dynamics and genetic variation: consequences for the survival of butterflies in a fragmented landscape: In *Future of butterflies in Europe: Strategies for Survival*. Proceedings of the International Congress
- Brenden S., Holland & Michael G. Hadfield, 2002: Island within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*, *Molecular Ecology*, Volume 11, Issue 3: pp 365
- Brookes, R.C., Barker, J.H.A., Bohan, D.A., Glen, D.M. & Karp, A., 2001: Microsatellites for the slugs *Deroceras reticulatum* and *Arion intermedius*. *Molecular Ecology Notes* 1
- Bussell, J.D., 1999: The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Istoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*, 8: pp 775 - 789
- Byers, R. A. and D. D. Calvin. 1994. Economic injury levels to field corn from slug (Stylommatophora: Agrolimacidae) feeding. *J. Econ. Entomol.* 87:1345-1350.
- Chalmers, K.J., R. Waugh, J.I Sprent, A.J. Simons, W. Powell: 1992 : Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata*. *Heredity*, 69, pp 465 – 472
- Charbonnel, N.; Angers, B.; Razatavonjizay, R., et al., 2000: :Microsatellite variation in the freshwater snail *Biomphalaria pfeifferi*. *Molecular Ecology* 9 (7): pp 1006-1007
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D., 1987: Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: pp 237-268
- Chevallier, H., 1971: Cycle biologique des grands Arion en France; *Atti della Societa Italiana di Science Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale in Milano*, 112: pp 316- 320
- Comeron, J. M.; Kreitman, M.; Aguade, M., 1999: Natural selection on synonymous sites is correlated with gene length and recombination in *Drosophila*. *Genetics* 151 (1): pp 239-249
- Crawford, A.M., Dodds, K.G. et al., 1995: An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140: pp 703-724
- Davies, S.M., 1987: *Arion flagellus* Collinge and *Arion lusitanicus* Mabilie in the British Isles: A morphological, biological and taxonomic investigation.- *Journal of Conchology* 32: pp 339-354
- Dawson, I.K., Simaons, A.J., Waugh, R., Powell, W., 1995: Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliridia sepium* revealed by PCR-based assays. *Heredity* 75: pp 10-18
- Diercks, R., 1983: *Alternativen im Landbau*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Dudash, M.R., 1990: Relative Fitness of selfed and outcrossed progenin a self compatible, protandous species, *Sabatia angularis* L. (Gentianaceae) of three environments. *Evolution* 44: pp 1129-1139
- Ewens, W. J., 1983: Inference problems in population genetics: DNA sequences,

- restriction endonucleases and ascertainment sampling. Proceedings of the Royal Society of London, B (Biological Sciences) 219 (1216): pp 223-239
- Excoffier, L., P.E. Smouse, J.M. Quattro, 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 136, pp 343-359
- Folz, D., Ochman, H. Jones J.S. et al., 1982: Genetic population structure and breeding system in arionid slugs (Mollusca, Pulmonata)- *Biological Journal of the Linnean Society* 17: pp 225-241
- Frankel, O.H., Brown, A.H.D. & Burdon, J.J., 1995: The conservation of plant biodiversity. University press, Cambridge
- Gibbs, H. L., Prior, K.A. & Parent C., 1998: Characterization of DNA microsatellite loci from a threatened snake: the eastern Massasauga rattle-snake (*Sistrurus c. catenatus*) and their use in population studies. *Journal of Heredity* 89: pp 169-173
- Glaubitz, C. & Moran, G., 2000: Genetic Tools: The use of biochemical and molecular markers. In: Young, A., Boshier, D., Boyle, T.: Forest conservation genetics: Principles and practice. CSIRO Publishing, Collingwood and CABI Publishing, Wallingford: pp 39-59
- Glaubitz, J. C.; El-Kassaby, Y. A.; Carlson, J. E., 2000: Nuclear restriction fragment length polymorphism analysis of genetic diversity in western redcedar. *Canadian Journal of Forest Research* 30 (3): pp 379-389
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. & Feldman, M.W., 1995: An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: pp 463-471
- Goldstein, D.B. & Pollock, D.D., 1997: Launching Microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of heredity*, 88: pp 335-342
- Gomes, C., Dales, R.B., Oxenford, H.A., 1998: The application of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyfish, *Hirundichtys affinis* in the central western Atlantic. *Mol.Ecol.* 7: pp 1029-1039
- Gow, J.L., Jones, C. S., Noble, L. R., 2001: The genetic structure of subdivided populations: a case study using microsatellites in the highly-selfing freshwater snail *Bulinus forskalii*, *Molluscan Forum at the Natural History Museum*
- Grashof-Bokdam, C.J, Jansen, J., Smulders, J.M.: 1998: Dispersal patterns of *Lonicera periclymenum* determined by genetic analysis, *Mol. Ecol.* 7: pp. 165-174
- Grimm, B., 2001: Life cycle and population density of the pest slug *Arion lusitanicus* Mabile (Mollusca:Pulmonata) on grassland, *Malacologia*, 43 (1-2): pp 25-30
- Grimm, B., 1991: *Arion lusitanicus* Mab.: Aktivität und Entwicklung in Abhängigkeit von Umweltfaktoren; Master`s Thesis, Universität Graz, Austria, 75 pp
- Goudet, J., Raymond, M., De Meeüs, T. & Rousset, F., 1996: Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: pp 933-1940
- Guiller, A., Arnaud, J.F., Vautrin, D., Solignac, M., 2000: Highly polymorphic microsatellite markers in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Ecology*, 9: pp 1191-1193
- Guo, S.W., Thomson, E.A., 1992: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles, *Biometrics*, 48: pp. 361-372
- Hadrys, H.; Balick, M.; Schierwater, B., 1992: Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1 (1):pp 55-63

- Hanski, I. & Gilpin, M., 1991: Metapopulation dynamics. Brief history and conceptual domain. In Gilpin, M. & Hanski I. (eds): Metapopulation dynamics: Empirical and theoretical Investigations. Biol. J. Linn. Soc. 42: pp 3-16
- Hartl, D.L. & Clark, A.G., 1997: Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer associates, Inc, Sunderland, MA
- Hedrick, P.W., 1999: Genetics of populations. Jones and Bartlett Publishers, London
- Henle, K., Settele J. & Kaule, G., 1995: Aufgaben, Ziele und erste Ergebnisse des "Forschungsverbunds Isolation, Flächengröße, Biotopqualität (FIFB)". - Verh. Ges. Ökol. 24:pp 181-186.
- Hey, J., 1999: The neutralist, the fly and the selectionist. Trends Ecol. Evol. 14: pp 35-38
- Heydemann, B. & Meyer, H., 1983: Auswirkungen der Intensivkultur auf die Fauna in den Agrarbiotopen. - Landespflege und Landwirtschaft, Schriften-Reihe des deutschen Rats für Landespflege, Heft 42,pp 174-191; Bonn.
- Huff, D.R., Peakall, R., Smouse, P.E., 1993: RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalogras (*Buchloë dactyloides* [Nutt.] Engelm.). Theor Appl Genet 86: pp 927-934
- Irgang, K. 2001: Vergleich von Inzucht- und Homozygotieentwicklung anhand molekulargenetischer Marker in einer geschlossenen New Hampshire Linie. Inaugural-Dissertation, FU Berlin
- Jain, S.K. & Bradshaw, A.D., 1966: Evolutionary divergence among adjacent plant populations." Heredity 21: pp 407-441
- Jarne, P. & Lagoda, J.L., 1996: Microsatellites, from molecules to population and back. Trends in Ecology and Evolution, 11: pp 424-429
- Jordana, J., Folch, P. & Sanchez, A., 1999: Genetic Variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalonian donkeys. Biochemical Systematics and Ecology 27 (8): pp 791-798
- Jorde, P.E, Palm, S. & Ryman, N., 1999: Estimating genetic drift and effective population size from temporal shifts in dominant gene marker frequencies. Mol. Ecol., 8: pp 1171-1178
- Kantanen, J., Vilkki, J., Elo, K. & Mäki-Tanila, A.. 1995: Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae)- Techniques, Statistical Analysis and Applications. JmedEnt 29 (6): pp 315-320
- Kaiser et al., 1993: Untersuchungen über die biologischen und ökologischen Voraussetzungen des Massenaufretens der Spanischen Wegschnecke ; Final Report, Universität Graz, Austria, 99 pp
- Kerney, M.P., Cameron, A.D. & Jungbluth J.H. (Hrsg), 1983: Die Landschnecken Nord- und Mitteleuropas. P. Parey, Hamburg und Berlin
- Kimura, M., 1968: Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217: pp 624-626
- Kimura, M & Ohta, T., 1978: Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 75: pp 2868-2872
- Kimura, M, 1983: The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University press, Cambridge, UK
- Korneck, D , Sukopp, H., 1988: Rote Liste der in der Bundesrepublik Deutschland ausgestorbenen, verschollenen und gefährdeten Farn- und Blütenpflanzen und ihre Auswirkung für den Arten- und Biotopschutz: Schriftenreihe Vegetationskunde, Bd. 19, Bad Godesberg
- Krauss, S.L., 2000: Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length (AFLP) markers. Molecular Ecology, 9: pp 1241-1245
- Kresovich, S., Williams, J.G.K. McFerson, J.R., Routman, E.J. & Schaal, B.A., 1992:

- Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85: pp 190-196
- Lambooy, W. F.; McFerson, J. R.; Westman, A. L., et al., 1994: Application of isozyme data to the management of the United States national *Brassica oleracea* L. genetic resources collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 41 (2): pp 99-108
- Levin, I.; Cheng, H. H.; Baxter-Jones, C. et al. 1995: Turkey microsatellite DNA loci amplified by chicken-specific primers. *Animal Genetics* 26 (2): pp 107-110
- Lewontin R.C. & Cockerham, C.C., 1959: The goodness-of-fit test for detecting selection in random mating populations. *Evolution* 13: pp 561-564
- Lewontin, R.C., 1972: The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: pp 381-398
- Liedlhoff, A., 1999: Mantel2, Nonparametric Test Calculator for Windows Version 2.00, CSIRO Sustainable Ecosystems, Tropical Ecosystems Research Centre, PMB 44, Winnellie, Northern Territory, Australia.
- Linhart, Y.B., 1974: „Intra-population differentiation in annual plants. *Veronica peregrina* raised under non-competitive conditions.” *Evolution* 28: pp 232-243
- Litt, M. & Luty, J.A., 1989: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: pp 397-401
- Locher, R.; Baur, B., 2000: Sperm delivery and egg production of the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* exposed to an increased sperm competition risk. *Invertebrate Reproduction & Development* 38 (1): pp 53-60
- Lozán, J., 1998: *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler*, Blackwell-Verlag, Berlin, Wien
- Lundy, C.J. et al., 1999: Macrogeographical population differentiation in oceanic environments: a case study of European hake (*Merluccius merluccius*), a commercially important fish. *Mol Ecol* 8: pp 1889-1898.
- Lynch M. & Milligan B.G., 1994: Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3, pp 91-99
- Lys, J. A.; Nentwig, W, 1992: Augmentation of beneficial arthropods by strip-management. 4. Surface activity, movements and activity density of abundant carabid beetles in a cereal field. *Oecologia* 92 (3): pp 373-382
- Lys, J.A., 1994: The positive influence of strip-management on ground beetles in a cereal field: increase, migration and overwintering. In: *Carabid Beetles: Ecology and Evolution*, pp 451-455, Kluwer-Press
- Manly, B.F., 1994: *Multivariate statistical methods: A primer*, 2<sup>nd</sup> edn, London: Chapman & Hall
- Mantel, N., 1967: The detection of disease clustering and a generalised regression approach, *Cancer Research*, 27, pp 209-220
- Martin, C, Gonzales-Benito, M.E., Iriondo, J.M., 1997: Genetic diversity within and among populations of a threatened species: *Erodium paularense* Fern. Gonz. & Izco. *Molecular Ecology*, 6: pp 813- 820
- Mavarez, J.; Amarista, M.; Pointier, J. P., et al., 2000: Microsatellite variation in the freshwater schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Molecular Ecology* 9 (7): pp 1009-1011
- Mavarez, J.; Amarista, M.; Pointier, J. P., et al, 2002: Fine-scale population structure and dispersal in *Biomphalaria glabrata*, the intermediate snail host of *Schistosoma mansoni*, in Venezuela. *Molecular Ecology* 11 (5): pp 879-889
- McCracken, G.F. & Selander, R.K., 1980: Self-fertilization and monogenic strains in

- natural populations of terrestrial slugs- Proceedings of the National Academy of Science of the USA 77, pp 684-688
- Menges, E. S., 1991: The application of minimum viable population theory to plants. Genetics and conservation of rare plants: pp 45-61
- Menges, E. S., 1991: Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. Conservation Biology 5 (2): pp 158-164
- Miller, M. P., 1998: Department of Biological Sciences - Box 5640, Northern Arizona University Flagstaff, AZ 86011-5640
- Mitton, J.B & Grant, M.C., 1984: Associations among protein heterozygosity, growth rate and developmental homeostasis. Annual reviews of Ecology and systematics 15, pp 479-499
- Mitton, J.B, 1993: Theory and data pertinent to the relationship between heterozygosity and fitness. In Thornhill, N.W. (ed.): The natural history of inbreeding and outbreeding. Chicago: The University of Chicago Press, pp 17-41
- Mommens, G., Van Zeveren, A., Peelman, L.J., 1998: Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L. Animal Genetics 29 (1), pp 12-18
- Monaghan, B.G. & Halloran G. M., 1996: RAPD variation within and between natural populations of morama (*Tylosema esculentum*) in southern Africa. South African Journal of Botany, 62: pp 287 - 291
- Müller St. & Ohnesorge, B., 1985: Die Verwendung markierter Schnecken zur Populationsdichteabschätzung und zum Studium des Migrationsverhaltens von *Arion* sp., Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz 58: pp 123-126
- Müller, P., 1995: Living nature through agriculture-Integrated farming instead of blanket extensification. Agro-Food-Industry-Hi-Tech. 6, Verl. Teknoscienze, Milano
- Müller, P., Kautenburger, R., Elle O. et al., 2002: Flächennutzungsinduzierte Anpassungsprozesse, molekulargenetische Veränderungen und Indikationsbedeutung von Organismen in der Region Trier als Grundlagen für verbesserte Umweltmanagementstrategien. In: Müller, Rumpf & Monheim: Umwelt und Region- Aus der Werkstatt des Sonderforschungsbereichs 1: pp 137-142
- Nei, M., 1972: Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: pp 283-292
- Nei, M., 1973: Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of science of the USA, 70: pp 3321-3323
- Nei, M., 1977: F- Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics, 41: pp 225-233
- Nei, M., 1983: Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. Evolution of genes and proteins: pp 165-190
- Nei, M., 1987: Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press
- Nei, M., 1988: Relative roles of mutation and selection in the maintenance of genetic variability. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B (Biological Sciences) 319 (1196): pp 615-629
- Nei, M., Li, W.H., 1979: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: pp 5269-5273
- Nentwig, W., 1988: Augmentation of beneficial arthropods by strip-management. 1.

- Succession of predacious arthropods and long-term change in the ratio of phytophagous and predacious arthropods in a meadow. *Oecologia* 76 (4): pp 597-606
- Nentwig, W., 1993: Nützlingsförderung in Agrarökosystemen. *Verhdlg. Ges. Ökologie* 22: pp 9-14
- Nesbitt, K. A.; Potts, B. M.; Vaillancourt, R. E., et al., 1995: Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Heredity* 74 (6): pp 628-637
- Nevo, E.; Apelbaum-Elkahaer, I.; Garty, J., et al., 1997: Natural selection causes microscale allozyme diversity in wild barley and a lichen at 'Evolution Canyon', Mt. Carmel, Israel. *Heredity* 78 (4): pp 373-382
- Nienhuis, J.; Tivang, J.; Skroch, P., et al., 1995: Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120 (2): pp 300-306
- Novy, R.G., Kobak, C., Gofreda, J. and Vorsa, N., 1994: RAPDs identify varietal misclassification and regional divergence in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh). *Theor. Appl. Genet.* 88: pp 1004-1010.
- Ohta T. & Kimura, M., 1973: A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population, *Genet. Res.* 22: pp 201-204
- Orr, H. A., 1998: Testing natural selection vs. genetic drift in phenotypic evolution using quantitative trait locus data. *Genetics* 149 (4): pp 2099-2104
- Palacios, C., Gonzales-Candelas, F., 1997: Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). *Mol Ecol* 6: pp 283-298
- Pang, S. W. Y.; Ritland, C.; Carlson, J. E., et al., 1999: Japanese quail microsatellite loci amplified with chicken-specific primers. *Animal Genetics* 30 (3): pp 195-199
- Proschwitz, T., 1989: Göteborgs Naturhistoriska museum, Arstryck: pp. 43-53
- Quesada, H.; Wenne, R.; Skibinski, D. O. F., 1999: Interspecies transfer of female mitochondrial DNA is coupled with role-reversals and departure from neutrality in the mussel *Mytilus trossulus*. *Molecular Biology and Evolution* 16 (5): pp 655-665
- Quick, H. E., 1952: Rediscovery of *Arion lusitanicus* in Britain; *Proceedings of the Malacological Society of London*, 29: pp 93 –103
- Raymond, M., Rousset, F., 1995: Genepop (Version 1.2): population genetics software for exact tests and eucumenicism, *Journal of Heredity*, 86: pp 248-249
- Reischütz, P. 1984: Zum Massenhaften Auftreten von *Arion lusitanicus* Mabilie in den Jahren 1982 und 1983; *Mitt. Zool. Ges. Braunau*, 4 (10/11); pp 253-254
- Reischütz P. & Strojaspal, 1972: Bemerkenswerte Mollusken aus Österreich. *Mitt. Zool. Ges. Braunau* 1 (3): pp 339-344
- Reynolds, J., Weir, B.S. & Cockerham, C.C., 1983: Estimation of the coancestry coefficient, basis for a short term genetic distance. *Genetics*, 105, pp 767-779
- Risch, P. & Backeljau, T., 1989: On the occurrence of *Arion lusitanicus* Mabilie, 1868, in Belgium (Mollusca, Pulmonata); *Annals of the Royal Society of Belgium*, 118; pp 25-38
- Ritte, U. & Pashtan A., 1982: Extreme levels of genetic variability in two red sea *Cerithium* species (Gastropoda: Cerithidae). *Evolution* 36: pp 403-407
- Russel, R.J., Festing, M.F.W., Deeny A.A. & Peters, A.G., 1993: DNA fingerprinting

- for genetic monitoring of inbred laboratory rats and mice. *Laboratory Animal Science (USA)*, 43 (5): pp 460-465
- Ruzzante, D. E., 1998: A comparison of several measures of genetic distance and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55 (1): pp 1-14
- Santos, J. B. dos; Nienhuis, J.; Skroch, P., et al., 1994: Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 87 (8): pp 909-915
- Samadi, S.; Erard, F.; Estoup, A., et al., 1998: The influence of mutation, selection and reproductive systems on microsatellite variability: a simulation approach. *Genetical Research* 71 (3): pp 213-222
- Samadi, S.; Mavarez, J.; Pointier, J. P., et al., 1999: Microsatellite and morphological analysis of population structure in the parthenogenetic freshwater snail *Melanooides tuberculata*: insights into the creation of clonal variability. *Molecular Ecology* 8 (7): pp 1141-1153
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G. et al., 1977: Nucleotide sequence of bacteriophage FX 174 DNA. *Nature* 265: pp 687-695
- Schlötterer, C. & Tautz, D., 1992: Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acid Research*, 20, pp 211-215
- Schlötterer, C., Ritter, R., Harr, B., Brem, G., 1998: High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele specific mutation rates. *Molecular Ecology and Evolution*, 15: pp 1269-1274
- Schmidtling, R. C. & Hipkins, V., 1998: Genetic diversity in longleaf pine (*Pinus palustris*): influence of historical and prehistorical events. *Canadian J. of Forest Research* 28: pp 1135-1145.
- Schmid, G., 1970: *Arion lusitanicus* in Deutschland. *Archiv für Molluskenkunde*, 100: pp 95-102
- Schneider, H., 1972: Die naturräumlichen Einheiten auf Blatt 159 Saarbrücken/ Naturräumliche Gliederung Deutschlands. Bonn Bad Godesberg
- Schneider, S., Kueffer JM., Roessli D., Excoffier L. (1997): Arlequin, Version 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva
- Selander, R.K. & Ochman, H., 1983: The genetic structure of populations as illustrated by molluscs. In: Rattazzi, M.C., Scandalios, J.C.Z. & Whitt, G.S. (eds.), *Isozymes: Current topics in biological and Medical Research*: pp 93-123
- Shannon, C.E. & Weaver, W., 1949: *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana
- Silva E.P., Russo, C.A.M., 2000: Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics, *Hydrobiologia* 420: pp 119-135
- Sinclair, E.A., Webb, N.J., Marchand, A.D., Tidemann, C.R., 1996: Genetic variation in the little red flying-fox *Pteropus scapulatus* (Chiroptera, Pteropodidae): implications for management. *Biol. Conserv.* 76: pp 45-50
- Skroch, P. W.; Dobert, R. C.; Triplett, E. W., et al., 1993: Polymorphism of the leghemoglobin gene in *Phaseolus* demonstrated by polymerase chain reaction amplification. *Euphytica* 69 (3): pp 177-183
- Skroch, P. & Nienhuis, J., 1995: The impact of scoring error and reproducibility of RAPD-Data on RAPD based estimation of genetic distance. *Theor. Appl. Genet.* 91: pp 1086-1091
- Slatkin, M. 1985: Geneflow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: pp 393-430

- Slatkin, M., 1995: A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: pp 457-463
- Slatkin M. & Barton, N.H., 1989: A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: pp 1358-1368
- Slatkin, M.; Voelm, L, 1991:  $F_{ST}$  in a hierarchical island model. *Genetics* 127 (3): pp 627- 629
- Smouse, P.E. & Chevillon, C., 1998: Analytical aspects of population-specific DNA fingerprinting for individuals. *JHered* 89: pp143-150
- Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., 1973: Numerical Taxonomy. Freeman, W.H. and Co., San Francisco
- Solé-Cava, A.M. und Thorpe, J.P., 1990: High levels of genetic variation in marine sponges. In Rutzler, K. (ed.), *New Perspectives in sponge biology*. Smithsonian Institution Press, Washington: pp 332-337
- Solé-Cava, A.M. und Thorpe, J.P., 1991: High levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. *Biol. J. Linn. Soc.* 44: pp 65-80
- Sork, V. L., Nason, J., Campbell, D. R. & Fernandez- M., J. F. 1999.: Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. In revision, *Trends in Ecology and Evolution*.
- Sourrouille P., Debain C. & Jarne, P., 2001: Microsatellite variation in the freshwater snail *Physa acuta*, *Molecular Ecology notes*, Volume 1, Issue 1-2: pp 39
- South, A., 1989: A comparison of the life cycles of the slugs *Deroceras reticulatum* (Müller) and *Arion intermedius* (Normand) on permanent pasture; *Journal of Molluscan Studies*, 55: pp 9-22
- Sukopp, H., 1969: Der Einfluss des Menschen auf die Vegetation. - *Vegetatio* 17: pp 360-371.
- Sukopp, H., 1972: Wandel von Flora und Vegetation in Mitteleuropa unter dem Einfluss des Menschen. - *Ber. Landw.* 50: pp 112-139.
- Tautz, D., 1992: Redundancies, development and the flow of information. *BioEssays* 14 (4): pp 263-266
- Taylor, B. A.; Reifsnnyder, P. C., 1993: Typing recombinant inbred mouse strains for microsatellite markers. *Mammalian Genome* 4 (5): pp 239-242
- Thorpe, J.P., A.M. Solé,-Cava, 1994: The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zool. Sci.* 23: pp 3-18
- Tischler, W., 1980: *Biologie der Kulturlandschaft*- Fischer, Stuttgart
- Triebes Korn, R. & Köhler H.-R., 1996: The impact of heavy metals on the grey garden Slug, *Deroceras reticulatum* (Müller): Metal storage, Cellular effects and semi-Quantitative evaluation of metal toxicity, *Environmental Pollution* Vol. 93, No.3, pp 327-343
- Turkington, R., W. Aarson, 1984: Local-Scale differentiation as a result of competitive interactions. *Perspectives on plant population ecology*, . Dierzo R. und Sarukhan, J.. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc.
- Urban D., Mecker-Richter M., Bruns T., Herzog R. und Neuhaus H. 1992: *Systematische Statistik für die computergestützte Datenanalyse*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Van Dongen, S., Backeljau T., Matthysen E., Dhondt, A.A., 1998: Genetic population structure of the winter moth (*Operophtera brumata* L.) (Lepidoptera, Geometridae) in fragmented landscape. *Heredity* 80: pp 92-100
- Viard, F.; Bremond, P.; Labbo, R., et al. 1996: Microsatellites and the genetics of highly selfing populations in the freshwater snail *Bulinus truncatus*. *Genetics* 142 (4): pp 1237-1247
- Watanabe, Y. & Chiba, S., 2001: High within-population mitochondrial DNA variation

- due to microvariance and population mixing in the land snail *Euhadra quaesita* (Pulmonata: Bradybaenidae)
- Weber J.L. & Wong C., 1993: Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: pp 1123-1128
- Weber, J.L. & May, P.E., 1989: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: pp 388-396
- Weber, J.L., 1990: Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 1 (2): pp166-171
- Weetman, D.; Hauser, L.; Carvalho, G. R., 2001: Isolation and characterization of di- and trinucleotide microsatellites in the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum*. *Molecular Ecology Notes* 1 (3): pp 185-187
- Weir, B.S. & Cockerham C.C., 1984: Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6): pp 1358-1370
- Weir, B.S., 1990: *Genetic Data analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Wiese, V., 1999: Die Spanische Wegschnecke, *Monatsblätter Haus der Natur*, Nr. 23
- Williams, J.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18: pp 6531-6535
- Wolff, K., El Akkad, S., Abott, R.J., 1997: Population substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert, in relation to its pollinator behaviour. *Molecular Ecology*, 6: pp 365 - 372
- Wright S., 1921: Systems of mating. *Genetics* 6: pp 111-178
- Wright S., 1931: Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: pp 97-159
- Wright, S., 1951: The genetical structure of populations, *Annals of Eugenics*, 15: pp 323-354
- Wright, S., 1965: The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: pp 395-420
- Wright, S.: 1969: *Evolution and Genetics of populations*. Chicago Univ. Press
- Wright, S., 1978: *Evolution and the genetics of populations*, Vol. 4, Variability within and among natural populations. Univ. Chicago Press, Chicago
- Yang, X.; Quiros, C., 1993: Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 86 (2-3): pp 205-212
- Yang, L, Zhao, S.H., Li, K. , Peng Z.Z. & Montgomery, G.W., 1999: Determination of genetic relationship among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. *Animal Genetics* 30 (6): pp 452-455
- Yeh, F.C., Jang, R.C., Boyle, TJB, Ye ZH & Mao, J.X., 1997: POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis, version 1.21. Edmont, Alberta: Universita of Alberta
- Zhivotovski, L., 1999: Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers, *Molecular Ecology*, 8: pp 907-913

## Anhang 1: Frequenzen der RAPD-Marker

	bp	Konv 1	Konv 2	Konv 3	Konv 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen	Belm
<b>270-5</b>	460	0,211	0,000	0,105	0,105	0,053	0,211	0,105	0,316	0,105	0,105	0,000	0,211
<b>270-5</b>	500	0,842	0,684	0,895	0,947	0,895	0,895	0,789	1,000	0,842	0,895	0,947	0,737
<b>270-5</b>	520	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>270-5</b>	555	0,000	0,053	0,000	0,053	0,000	0,053	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105
<b>270-5</b>	650	0,842	0,053	0,632	0,526	0,421	0,737	0,789	0,737	0,947	0,737	0,000	0,105
<b>270-5</b>	680	0,526	0,053	0,368	0,368	0,053	0,474	0,105	0,158	0,632	0,474	0,158	0,053
<b>270-5</b>	700	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,263	0,053	0,053	0,053	0,000	0,000	0,000
<b>270-5</b>	730	0,105	0,000	0,053	0,053	0,053	0,211	0,053	0,263	0,158	0,105	0,842	0,105
<b>270-5</b>	750	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,158	0,000
<b>270-5</b>	780	0,737	0,474	0,474	0,632	0,737	0,737	0,579	0,789	0,684	0,421	0,947	0,737
<b>270-5</b>	820	0,526	0,211	0,579	0,632	0,211	0,474	0,263	0,316	0,579	0,158	0,000	0,316
<b>270-5</b>	870	1,000	0,421	1,000	1,000	0,895	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,684	0,053
<b>270-5</b>	990	0,000	0,053	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,316	0,105
<b>270-5</b>	1020	0,684	0,263	0,895	1,000	0,421	0,947	0,947	0,947	0,842	0,526	0,263	0,000
<b>270-5</b>	1080	0,684	0,158	0,632	0,263	0,421	0,263	0,526	0,368	0,789	0,684	0,632	0,053
<b>270-5</b>	1130	0,684	0,842	0,789	0,895	0,895	0,947	0,947	0,895	0,895	0,842	0,211	0,789
<b>270-5</b>	1160	0,474	0,158	0,684	0,474	0,421	0,632	0,789	0,895	0,105	0,579	0,632	0,105
<b>270-5</b>	1270	0,105	0,053	0,000	0,158	0,105	0,263	0,000	0,000	0,368	0,000	0,263	0,000
<b>270-5</b>	1300	0,105	0,105	0,105	0,053	0,263	0,158	0,000	0,263	0,526	0,053	0,105	0,000
<b>270-5</b>	1400	0,000	0,000	0,000	0,105	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,158	0,000
<b>270-5</b>	1500	0,684	0,632	0,579	0,421	0,421	0,526	0,316	0,632	0,789	0,579	0,316	0,947
<b>270-5</b>	1560	0,000	0,158	0,368	0,000	0,053	0,211	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,053
<b>270-5</b>	1620	0,632	0,211	0,053	0,526	0,368	0,526	0,158	0,316	0,526	0,158	0,632	0,053
<b>270-5</b>	1680	0,789	0,895	0,579	0,842	0,684	0,895	0,789	0,895	0,895	0,895	0,947	0,842
<b>270-5</b>	1760	0,789	0,737	0,842	0,947	0,947	0,684	0,579	0,842	0,474	0,211	0,789	0,211
<b>270-5</b>	1860	0,947	1,000	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,947	0,947	0,842	1,000
<b>380-3</b>	530	1,000	1,000	1,000	1,000	0,895	1,000	1,000	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>380-3</b>	590	0,158	0,474	0,474	0,368	0,947	0,421	0,368	0,526	0,579	0,421	0,368	0,053
<b>380-3</b>	655	1,000	1,000	0,895	1,000	0,895	1,000	1,000	0,842	1,000	0,895	1,000	1,000
<b>380-3</b>	685	0,000	0,000	0,105	0,158	0,053	0,158	0,105	0,421	0,105	0,053	0,000	0,526
<b>380-3</b>	730	0,579	0,368	0,632	0,368	0,474	0,211	0,316	0,632	0,368	0,474	0,842	0,053
<b>380-3</b>	780	0,158	0,158	0,053	0,316	0,053	0,368	0,158	0,000	0,105	0,000	0,000	0,000
<b>380-3</b>	830	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>380-3</b>	860	0,789	0,263	0,368	0,737	0,947	0,316	0,474	0,684	0,895	0,316	0,474	0,211
<b>380-3</b>	900	0,947	0,263	1,000	1,000	1,000	0,789	1,000	1,000	0,842	0,947	0,263	1,000
<b>380-3</b>	970	0,737	0,789	0,526	1,000	0,842	1,000	0,421	0,947	0,526	0,526	0,000	0,737
<b>380-3</b>	1005	0,211	0,211	0,316	0,158	0,000	0,000	0,316	0,211	0,474	0,368	0,211	0,053
<b>380-3</b>	1120	0,421	0,789	0,053	0,421	0,368	0,053	0,000	0,263	0,947	0,474	0,947	0,000
<b>380-3</b>	1190	0,947	0,842	0,895	0,895	1,000	1,000	1,000	0,895	1,000	0,789	0,947	1,000
<b>380-3</b>	1325	0,105	0,000	0,000	0,053	0,000	0,158	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000
<b>380-3</b>	1360	0,684	0,105	0,105	1,000	0,474	0,526	0,368	0,368	0,316	0,842	0,474	0,789
<b>380-3</b>	1440	0,105	0,211	0,579	0,211	0,158	0,105	0,158	0,263	0,105	0,474	0,000	0,158
<b>380-3</b>	1520	0,895	0,842	1,000	1,000	0,842	0,947	0,895	0,947	0,789	1,000	0,737	0,211
<b>380-3</b>	1630	0,316	0,000	0,368	0,526	0,158	0,474	0,263	0,263	0,105	0,316	0,000	0,211
<b>380-3</b>	1840	0,316	0,000	0,368	0,474	0,053	0,211	0,421	0,316	0,263	0,211	0,158	0,000

	bp	Konv 1	Konv 2	Konv 3	Konv 4	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Brache	Wiese	Wahlen	Belm
<b>480-4</b>	510	0,895	0,316	0,947	1,000	0,368	0,158	0,737	0,895	0,105	1,000	0,789	0,895
<b>480-4</b>	550	0,211	0,105	0,000	0,000	0,000	0,105	0,105	0,105	0,158	0,105	0,158	0,368
<b>480-4</b>	580	0,737	0,789	0,842	0,842	0,842	0,842	0,789	0,632	0,579	0,789	0,368	0,737
<b>480-4</b>	640	1,000	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>480-4</b>	660	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,000	0,158	0,000
<b>480-4</b>	690	0,053	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,105	0,000	0,105	0,053	0,053	0,000
<b>480-4</b>	710	0,316	0,053	0,053	0,053	0,158	0,053	0,053	0,211	0,053	0,158	0,053	0,000
<b>480-4</b>	785	0,421	0,632	0,632	0,842	0,526	0,789	0,474	1,000	0,474	0,579	1,000	0,000
<b>480-4</b>	840	0,684	0,316	0,211	0,211	0,474	0,263	0,316	0,368	0,211	0,316	0,211	0,000
<b>480-4</b>	875	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000
<b>480-4</b>	890	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,105	0,000	0,053	0,000	0,053	0,000	0,053
<b>480-4</b>	905	0,000	0,105	0,105	0,053	0,421	0,158	0,158	0,053	0,316	0,211	0,895	0,842
<b>480-4</b>	960	0,211	0,421	0,316	0,526	0,316	0,158	0,158	0,368	0,684	0,632	0,158	0,000
<b>480-4</b>	1000	0,789	0,421	1,000	1,000	0,789	0,895	1,000	1,000	0,947	0,842	1,000	1,000
<b>480-4</b>	1060	0,368	0,000	0,263	0,421	0,263	0,158	0,263	0,211	0,000	0,263	0,053	0,053
<b>480-4</b>	1115	0,947	0,895	1,000	1,000	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<b>480-4</b>	1190	0,263	0,105	0,263	0,421	0,263	0,053	0,158	0,474	0,158	0,263	0,158	0,579
<b>480-4</b>	1230	0,053	0,000	0,105	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,105	0,105	0,000	0,158
<b>480-4</b>	1270	0,053	0,053	0,105	0,000	0,000	0,000	0,053	0,105	0,000	0,053	0,000	0,000
<b>480-4</b>	1440	0,895	0,053	1,000	0,842	0,632	0,895	0,947	0,684	1,000	0,789	0,737	0,421
<b>480-4</b>	1580	0,053	0,158	0,526	0,737	0,421	0,421	0,421	0,895	0,000	0,474	0,684	0,316
<b>480-4</b>	1650	0,684	0,842	1,000	1,000	1,000	1,000	0,895	0,895	0,316	0,474	1,000	1,000
<b>480-4</b>	1700	1,000	0,105	0,263	0,474	0,211	0,105	0,105	0,158	1,000	0,632	0,684	0,105
<b>480-4</b>	1730	0,263	0,211	0,000	0,000	0,000	0,158	0,158	0,158	0,474	0,316	0,000	0,000
<b>480-4</b>	1860	1,000	0,895	0,737	0,895	0,947	0,842	0,842	0,737	0,632	0,632	0,053	1,000
<b>A.I.1</b>	380	0,158	0,263	0,053	0,263	0,158	0,053	0,211	0,474	0,368	0,368	0,053	0,053
<b>A.I.1</b>	410	0,000	0,842	0,316	0,000	0,368	0,105	0,211	0,526	0,421	0,211	0,421	0,000
<b>A.I.1</b>	490	0,211	0,789	0,211	0,158	0,947	0,263	0,211	0,526	0,211	0,105	0,737	0,947
<b>A.I.1</b>	520	0,158	0,000	0,158	0,053	0,000	0,053	0,211	0,316	0,053	0,316	0,316	0,263
<b>A.I.1</b>	550	0,263	0,316	0,158	0,158	0,000	0,053	0,158	0,158	0,000	0,105	0,368	0,000
<b>A.I.1</b>	590	0,632	1,000	0,947	0,895	0,526	0,684	0,684	0,842	0,789	0,789	0,737	0,579
<b>A.I.1</b>	610	0,263	0,000	0,000	0,053	0,526	0,105	0,211	0,158	0,053	0,263	0,053	0,632
<b>A.I.1</b>	640	0,526	0,526	0,421	0,421	0,789	0,579	0,368	0,579	0,000	0,368	0,684	0,105
<b>A.I.1</b>	710	0,368	0,000	0,053	0,000	0,105	0,000	0,053	0,000	0,526	0,000	0,263	0,000
<b>A.I.1</b>	760	0,211	0,474	0,474	0,947	0,316	0,105	0,632	0,895	0,053	0,526	0,263	0,158
<b>A.I.1</b>	820	0,474	0,368	0,579	0,789	0,368	0,684	0,737	0,947	0,211	0,737	0,579	0,632
<b>A.I.1</b>	850	0,526	0,421	0,579	0,421	0,526	0,421	0,474	0,421	0,368	0,316	0,211	0,789
<b>A.I.1</b>	890	0,158	0,105	0,158	0,105	0,579	0,053	0,053	0,211	0,105	0,000	0,000	0,000
<b>A.I.1</b>	950	0,895	0,368	0,947	1,000	0,421	1,000	0,947	0,842	0,421	0,895	0,158	0,895
<b>A.I.1</b>	980	0,211	0,211	0,000	0,000	0,211	0,053	0,000	0,211	0,000	0,211	0,105	0,000
<b>A.I.1</b>	1070	1,000	0,895	1,000	1,000	0,947	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,421
<b>A.I.1</b>	1120	0,526	0,053	0,053	0,105	0,263	0,158	0,316	0,263	0,158	0,421	0,053	0,474
<b>A.I.1</b>	1210	0,053	0,053	0,000	0,211	0,316	0,105	0,000	0,000	0,263	0,263	0,053	0,053
<b>A.I.1</b>	1400	0,842	0,105	0,789	1,000	0,632	0,684	0,789	1,000	0,263	0,842	0,737	0,632
<b>A.I.1</b>	1480	0,263	0,421	0,316	0,000	0,105	0,368	0,316	0,421	0,000	0,053	0,632	0,000
<b>A.I.1</b>	1510	0,368	0,632	0,632	0,737	0,789	0,842	0,947	0,368	0,158	0,474	0,421	0,421
<b>A.I.1</b>	1640	0,105	0,000	0,053	0,158	0,105	0,000	0,211	0,000	0,053	0,421	0,263	0,000
<b>A.I.1</b>	1850	0,158	0,105	0,000	0,158	0,053	0,000	0,000	0,158	0,105	0,211	0,316	0,000
<b>A.I.1</b>	1940	1,000	0,842	1,000	1,000	0,895	1,000	1,000	1,000	0,947	1,000	1,000	1,000







Anhang 5: O/1-Matrix aller RAPD-Marker für 19 Individuen des Standortes „Konv4“

270-5	460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
270-5	500	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270-5	520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270-5	555	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
270-5	650	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
270-5	680	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
270-5	700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270-5	730	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270-5	750	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270-5	780	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
270-5	820	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
270-5	870	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270-5	990	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270-5	1020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270-5	1080	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
270-5	1130	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
270-5	1160	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0
270-5	1270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
270-5	1300	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270-5	1400	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270-5	1500	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
270-5	1560	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270-5	1620	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
270-5	1680	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
270-5	1760	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
270-5	1860	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	530	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	590	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
380-3	655	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	685	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
380-3	730	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
380-3	780	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
380-3	830	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	860	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
380-3	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	970	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	1005	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
380-3	1120	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
380-3	1190	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	1325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
380-3	1360	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	1440	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
380-3	1520	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
380-3	1630	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
380-3	1840	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
480-4	510	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480-4	550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	580	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1
480-4	640	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480-4	660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	690	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	710	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	785	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480-4	840	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
480-4	875	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	890	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	905	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	960	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
480-4	1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480-4	1060	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
480-4	1115	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480-4	1190	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
480-4	1230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	1270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	1440	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
480-4	1580	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
480-4	1650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
480-4	1700	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
480-4	1730	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480-4	1860	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A.I.1	380	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A.I.1	410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.I.1	490	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A.I.1	520	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.I.1	550	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A.I.1	590	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A.I.1	610	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.I.1	640	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A.I.1	710	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A.I.1	760	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
A.I.1	820	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A.I.1	850	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
A.I.1																						

















## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. hc. mult. Paul Müller für die Überlassung und Betreuung des Themas und das in den vergangenen Jahren entgegengebrachte Vertrauen danken.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern und Kollegen vom Fach Biogeografie der Universität Trier und des Sonderforschungsbereiches 522 „Umwelt und Region“ für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit. Besonders hervorheben muss ich Herrn Markus Quack und Herrn Markus Monzel für viele anregende Diskussionen und die „enge Kooperation“ im provisorischen Genetik-Labor. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Ralf Kautenburger und Herrn Dr. Thomas Schmitt, die die ersten Manuskripte kritisch und konstruktiv durchgesehen haben. Herrn Dr. Ralf Kautenburger danke ich darüber hinaus für die Hilfe am Sequenzierer.

Herr Dr. Ortwin Elle hat mir die digitalisierten Karten und Herr Markus Quirin hat mir Informationen zur Flächenbewirtschaftung zur Verfügung gestellt.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Dr. Jürgen Jungbluth für die Bestimmung des Referenzmaterials und natürlich den Landwirten Schneider, Meßer und Eiden, auf deren Flächen die Untersuchungen durchgeführt werden durften.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Ulrike und meinen Eltern für die Unterstützung während der vergangenen Jahre.

# Wissenschaftlicher Lebenslauf

Markus Langer

geboren am 09.07.1969 in Georgsmarienhütte

## **Schulbildung:**

1981-1989 Gymnasium Ursulaschule , Osnabrück  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## **Studium:**

WS 1990- SS 1992: Studium der Geographie an der Universität Osnabrück  
Abschluss: Vordiplom

WS 1992 – SS 1998: Studium der Geographie an der Universität des Saarlandes, Schwerpunkt Biogeografie, Abschluss: Diplom (Dipl.-Geogr.)

## **Promotionsstudium:**

WS 1999 –SS 2000 an der Universität Trier

## **Berufstätigkeit:**

August 1999 – Mai 2002: wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Trier im Fach Biogeografie

seit Juni 2002: wissenschaftlicher Angestellter an der Biologischen Bundesanstalt, Institut für Pflanzenschutz im Weinbau, Bernkastel-Kues