

**Populationsgenetische Untersuchungen an hessischen
Populationen von *Cypripedium calceolus* L.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08: Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Botanik
AG Spezielle Botanik

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Andreas Opitz

Gutachter: Prof. Dr. Volker Wissemann
PD Dr. Birgit Gemeinholzer
Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

eingereicht im November 2016

„Es dürfte nicht leicht eine Pflanzengruppe genannt werden können, welche in gleichem Masse das Interesse der Gelehrten und der Laien gefunden hat, wie die Familien der Orchideen. Mögen wir die vielgestaltigen Formen der Blüthe betrachten, in denen die Natur gleichsam die höchste Potenz ihrer schöpferischen Kraft zum Ausdruck bringt, oder mögen wir auf die sonderbare, bald unterirdische, bald epiphytische Lebensweise, stets aber säkulare Lebensdauer dieser Gewächse sehen, oder die wunderbaren Einrichtungen und Anpassung an Insektenbefruchtung ins Auge fassen, - überall erregt die Orchidee mehr als jeder andere pflanzliche Organismus unsere gerechte Bewunderung.“

Botaniker GOTTHELF ANTON LUDWIG LEIMBACH (1848-1902)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1.1	Lebenszyklus	6
1.1.2	Mykorrhiza und Samenkeimung	9
1.1.3	Samenvermehrung	10
1.1.4	Gesetzlicher Hintergrund.....	11
1.2	Vorkommen Europa- und Deutschlandweit	12
1.3	Vorkommen, Entwicklung und Gefährdung hessischer Populationen.....	17
1.4	Rückblick auf die genetische Forschung im Hinblick auf den Frauenschuh	19
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Pflanzen	23
2.2	Blattproben	25
2.2.1	Laborarbeiten.....	27
2.2.1.1	Extraktion der Blattproben und DNA-Messung	27
2.2.1.2	PCR.....	28
2.2.1.3	ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”).....	29
2.2.1.4	SRAP (“Sequence-related Amplified Polymorphism”)	34
2.2.1.5	AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)	36
2.2.1.6	Gel-Elektrophorese.....	42
2.2.1.7	Statistik	43
2.3	Samenentnahme.....	46
2.3.1	Herstellung des Aussaatmediums.....	46
2.3.2	Verarbeitung der gesammelten Samenkapseln.....	47
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Laborarbeit.....	49
3.1.1	Ergebnisse der Extraktion der Blattproben.....	49
3.1.2	Ergebnisse der ISSR	50
3.1.2.1	Statistische Auswertung ISSR.....	56
3.1.3	Ergebnisse der SRAP	62
3.1.4	Ergebnisse der AFLP.....	64
3.1.4.1	Statistische Auswertung AFLP.....	66
3.1.5	Vergleich der statistischen Auswertung der Daten der ISSR- und der AFLP- Methode.....	72

3.2	Ergebnisse der Samenaussaat	74
4	Diskussion	75
4.1	Hypothese 1:	76
4.2	Hypothese 2:	81
4.3	Fazit:	90
5	Fehlerbetrachtung und Ausblick.....	95
6	Zusammenfassung	98
7	Literaturverzeichnis	99
8	Danksagung	113
9	Versicherung.....	115

1 Einleitung

Orchideen, die mehr als 850 Gattungen, 25000 Arten und 10 % der weltweiten Blütenpflanzen umfassen (ROBERTS & DIXON 2008), faszinieren schon seit Jahrhunderten die Menschheit. Nicht nur die vollkommene Schönheit dieser Pflanzen, sondern auch die Art der Bestäubung, der teilweise langsame, komplizierte Lebenszyklus und die teils schwierige Kultivierung einiger Orchideen sind es, die den Reiz bei Botanikern und Interessierten wecken. Schon ROBERTS & DIXON (2008) bezeichneten die kosmopolitischen Orchideen als Inbegriff bzw. Verkörperung der pflanzlichen Evolution.

Zu den bekanntesten und aufsehenerregendsten Orchideen in Europa gehört der Frauenschuh (*Cypripedium calceolus* L.). Als großblütige und auffällige Art hat der Frauenschuh schon früh Aufmerksamkeit bei botanisch Interessierten geweckt und steht oft als populäre Art stellvertretend für alle Orchideen im Fokus der Öffentlichkeit (HEINRICH et al. 2014). Erstmals abgebildet wurde der Frauenschuh auf dem im Historischen Museum in Basel ausgestellten Bischofszeller Wandteppich aus dem Jahr 1510. Auf dem Wandteppich ist das städtische Treiben von Bischofszell mit Reiter und Gefolge, Bauern mit ihrer Ernte, im Fluss badende Menschen und Händlern abgebildet. Zusätzlich sind Tiere und Pflanzen auf Wiesen zu sehen, auf denen u.a. eine Akelei, eine wilde Erdbeere und eine Frauenschuhpflanze abgebildet sind (CRIBB 2014). Der Wandteppich beweist zumindest, dass der Frauenschuh schon damals eine große Bedeutung hatte.



Abbildung 1: „Bischofszeller Teppich“ Wandbehang (1510) im Historischen Museum Basel. „In differenzierter Anwendung zahlreicher Sticharten mit buntem Wollgarn auf zusammengestückeltem Wolltuch ist eine detailreiche Bilderchronik entstanden. Sie zeigt wirklichkeitsnah das Städtchen Bischofszell (Kanton Thurgau) auf dem Hang vor dem Bischofsberg und die Landschaft am Zusammenfluss von Sitter und Thur.“ (<http://www.hmb.ch/sammlung/object/bischofszeller-teppich-wandbehang-detail.html>). Neben dem städtischen Trubel ist im unteren rechten Teil des Teppichs eine Frauenschuhpflanze eindeutig erkennbar (Abbildung aus CRIBB 2014).

Die erste farbige Illustration (Abbildung 2) des Frauenschuhs stammt von Conrad Gesner (1516-1565) aus dem Jahr 1541 und ist bekannt als „a watercolour of a plant from Mt. Saleu in the Swiss Jura near Geneva“ (CRIBB 2014). Diese Abbildung zeigt deutlich, wie präzise die Pflanze schon vor Jahrhunderten beobachtet und studiert wurde und bestätigt schon zu früher Zeit einmal mehr das gesteigerte Interesse der Botaniker an der Pflanze.



Abbildung 2: Erste farbige Abbildung des Frauenschuhs von Conrad Gesner aus dem Jahr 1541. Zu sehen sind genaue Studien an der Blüte mit Spross und Wurzeln sowie drei Samenkapseln (Abbildung aus CRIBB (2014)).

Conrad Gesner war darüber hinaus der Erste, der den Frauenschuh erstmalig in gedruckter Form in seinem Sammelband „*Horti Germaniae*“ 1561 erwähnte (ECCARIUS 2010). Eine erste öffentliche Beschreibung des Frauenschuhs stammt aus dem Jahr 1568 von Rembert Dodoens (1516 - 1585) in „*Florum, et coronariarum odoratarumque nonnullarum herbarum historia*“ (CRIBB 2014). Der für diese Veröffentlichung benötigte Holzschnitt, der auf Grundlage einer Zeichnung von Joannes Vrecomtus entstand, zeigt den Frauenschuh erstmalig mit einem Rhizom und einer Wurzel. Nach CRIBB (2014) war Joannes Vrecomtus auch der Erste, der diese Pflanze in seinem Garten gezogen hat. Dies gilt als erster Nachweis für eine Kultivierung. In einem seiner weiteren Werke „*Stripium historiae pemptades*“ (1583) zeigt Rembert Dodoens

den Frauenschuh mit einem weiteren zweiten Spross, der zwei Samenkapseln detailliert abbildet und auch von Charles de l'Écluse (1526 - 1609) in seinem Werk „Rariorum aliquot stirpium, per Pannoniam, Austriam, & vicinas quasdam provincias observatarum historia, IV libris expressa Antwerpen: Ex officina Plantiniana“ 1583 verwendet wurde (CRIBB 2014).

Da viele Botaniker damals zugleich auch als Ärzte tätig waren (z.B. Conrad Gesner, Rembert Dodoens und Charles de l'Écluse), verwundert es nicht, dass der Frauenschuh geschichtlich auch in der Medizin eine, wenn auch nur kleine, Anwendung fand. KLEMPERER & ROST (1929) beschreiben, dass aus *Cypripedium*-Arten (speziell *C. hirsutum* MILL. (Synonym für *C. acaule* AITON)) leicht krampfstillende Mittel hergestellt werden können. HÄNSEL et al. (1992) berichten hierzu, dass in der volkstümlichen Anwendung die getrockneten Rhizome und Wurzeln („*Cypripedii rhizoma* (Frauenschuhwurzelstock) von *calceolus* var. *pubescens*“) „bei Schlaflosigkeit, Erregungszuständen [...] emotionaler Spannung“, Nervosität und hysterischen Affektionen genutzt wurden, wobei die Wirksamkeit bis zum heutigen Zeitpunkt nicht belegt wurde. Oft wurde die Anwendung für Kinder empfohlen. Für eine innerliche Anwendung sollen nach den Aussagen von HÄNSEL et al. (1992) „2 Teelöffel (2-4 g) der getrockneten Droge als Infus (Aufguss)“ oder als „Fluidextrakte 1:1 in 45%igem Alkohol“ verwendet werden. „Die Droge soll in höheren Konzentrationen Unruhe, Kopfschmerzen, Erregungszustände und Halluzinationen verursachen“ (HÄNSEL et al. 1992). Der einzige Wirkstoff, der in *Cypripedium*-Arten gefunden wurde, ist 2,8-Dimethoxy-7-hydroxy-1,4-phenanthrenchinon mit dem Trivialnamen Cypripedin, ein Chinon (SCHMALLE & HAUSEN 1979), welches bei Umgang mit dem Frauenschuh Dermatitiden (entzündliche Reaktionen der Haut) verursachen kann.

Carl von Linné etablierte 1737 den Gattungsnamen „*Cypripedium*“ in seinem Werk „Flora Laponica“ und beschrieb 1753 als erster Autor die Art (JARVIS & CRIBB 2009) mit dem Namen *Cypripedium calceolus* (aus dem griechischen: Kypris = Beiname der Aphrodite, aus dem lateinischen: *calceolus* = kleiner Schuh, Stiefelchen). Offiziell war Michel Adanson (1727 - 1806) der erste Botaniker, der den Frauenschuh im Jahr 1763 in die Familie der Orchidaceae einordnete (CRIBB 2014). Der nächste nennenswerte Botaniker im Bezug zum Frauenschuh war Charles Robert Darwin (1809 - 1882). Er betrieb nähere Forschung an Orchideen, unter anderen auch an *Cypripedium*, und schrieb diese Erfahrungen 1862 nieder (DARWIN 1862). Mit seinen genauen Beobachtungen zur Bestäubung weckte er das Interesse etlicher Botaniker an der Familie der Ochidaceae (ANTONELLI et al. 2009).

Cypripedium calceolus gehört zur Abteilung der Magnoliophyta BRONGN. (Bedecktsamer), zur Klasse der Liliopsida DC. (Einkeimblättrige) und nach neuem Kenntnisstand zur Ordnung der Asparagales BROMHEAD (Spargelartigen) (CHASE et al. 2003). Die Art ist der Familie der Orchidaceae JUSS. (Orchideengewächse, Unterfamilie Cypridioideae LINDL.) zugehörig und der einzige europäische Vertreter in der Gattung *Cypripedium* (CHASE et al. 2003). In die Unterfamilie der Cypridioideae werden neben der Gattung *Cypripedium* noch die Gattungen *Paphiopedilum* PFITZER, *Phragmipedium* ROLFE, *Mexipedium* V.A.ALBERT & M.W.CHASE und *Selenipedium* RCHB.F. eingeordnet. Die weltweite Verteilung der 5 Gattungen ist in der Abbildung 3 zu sehen, wobei die Gattung *Cypripedium* weltweit am häufigsten vertreten ist. Die Verwandtschaftsbeziehungen untereinander werden derzeit noch von Wissenschaftlern diskutiert.

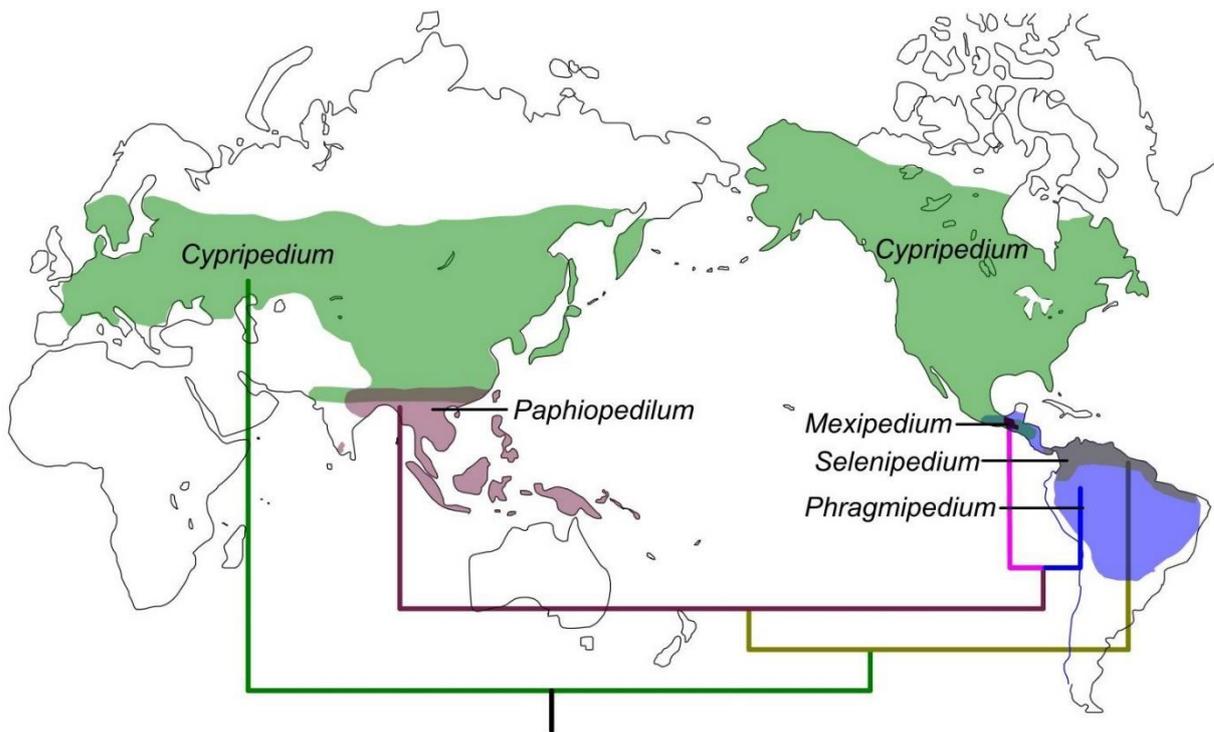


Abbildung 3: Weltweite Verteilung der 5 Gattungen (*Cypripedium* LINNÉ, *Paphiopedilum* PFITZER, *Phragmipedium* ROLFE, *Mexipedium* V.A.ALBERT & M.W.CHASE und *Selenipedium* RCHB.F.) aus der Unterfamilie Cypridioideae (GUO et al. 2012), wobei die Gattung *Cypripedium* weltweit am weitesten vertreten ist.

In der englischen Sprache wird der Frauenschuh „Lady’s slipper orchid“ genannt. Im deutschsprachigen Volksmund besitzt *C. calceolus* aufgrund der damaligen unterschiedlichen Dialekte verschiedene Bezeichnungen wie z. B. Marienschuh, Krimhilds Helm, Guggerschuh (Gugger im Sinne von Kuckuk), Herrgottsschühli, Pantoffeln, Pfaffenschuh, Schafsäcka, Goldbeutel, Maischuh, Pferdetratsche oder Ochsenbeutel (PRITZEL 1882, CRIBB 2014,

HEINRICH et al. 2014). Bekannt geworden ist die Pflanze durch ihre einmalige Blütengestalt in der einheimischen Flora und ihrem komplizierten Lebenszyklus, der damals wie heute großes Interesse bei vielen Pflanzeninteressierten und Botanikern weckt.

1.1.1 Lebenszyklus

Der Frauenschuh hat einen sehr langlebigen und komplexen Lebenszyklus. Er hat durchschnittlich eine Lebenserwartung von etwa 100 Jahren (KULL 1988, KULL 1999), nach Modellrechnungen von NICOLE et al. (2005) kann *C. calceolus* sogar eine Lebenserwartung von 110 bis 350 Jahren haben. Der Lebenszyklus bzw. die Lebensdauer der indigenen Art ist plurienn-pollakanth, das heißt sie blüht und fruchtet mehrmals in ihrem Leben. Neben der außergewöhnlichen Lebensdauer zeigt sich beim Frauenschuh auch eine Besonderheit bei der Samenkeimung. Die Samen des Frauenschuhs benötigen für die Keimung einen Mykorrhizapilz, um die feste Testa zu durchdringen. Näheres wird in Kapitel 1.1.2 zum Mykorrhiza-Pilz erläutert. Nach der Keimung erfolgt die Bildung eines Protokorms. Das Erscheinen des ersten Blattes aus diesem Protokorm zeigt sich nach mehreren Protokormstadien meist nach ca. drei bis vier Jahren (KULL 1998, NICOLE et al. 2005, BRUNZEL 2010). Hierbei bildet der Keimling des Frauenschuhs im Verlauf der Jahre ein Rhizom aus und gehört daher zu den Geophyten (KULL 1999). Das Rhizom verläuft ca. 10 cm tief horizontal im Boden und beginnt nach ca. 20 Jahren am älteren Ende abzusterben (KULL & KULL 1991). Nach 6 – 10 Jahren entstehen die ersten Blüten (KULL 1995). Zur Blütezeit von Mai bis Juni (JÄGER et al. 2013) bzw. Juli (SEYBOLD 2011) können an einem Trieb eine bis zwei (bei sehr guten Habitatbedingungen auch drei) Blüten ausgebildet werden. Unter guten Bedingungen können Rhizome bis zu 40 Blütentriebe, welche als Horst bzw. Stock bezeichnet werden (LOHR 2013), ausbilden. Die Blüten des Frauenschuhs besitzen keinen Nektar zum Anlocken der Insekten (COZZOLINO & WIDMER 2005), sie sind Täuschblumen (JAGEL & MARGENBURG 2011). Die Bestäuber werden durch die auffällige Gestalt der Blüte angelockt.

Durch vielfältige Nachweise bestätigt (DAUMANN (1968), MÜLLER (1873), NILSSON (1979), KULL (1998), ANTONELLI et al. (2009), GRELL (2010), PEMBERTON (2013)), gehören die Sand- bzw. Erdbienen (*Andrena spec.*) zu den häufigsten Besuchern der Blüten. Neben den *Andrena*-Arten wurden auch Furchenbienen (*Lasioglossum spec.*), Wespenbienen (*Nomada spec.*) und Seidenbienen (*Colletes spec.*) erfasst. Einschränkend dazu schreiben ERNEBERG & HOLM (1999) als Ergebnisse aus Untersuchungen in Dänemark, dass *Andrena*-Arten nur

unregelmäßige Besucher der Frauenschuh-Blüten seien und durch ihre Größe unfähig sind, diese zu bestäuben. Sie fügen zu den aufgezählten Bestäubern noch einige *Halictus*-Arten hinzu. Damit die Bestäuber die Blüten regelmäßig besuchen können, müssen geeignete Lebensräume für Nistmöglichkeiten (WESTRICH 1989) in der näheren Umgebung vorhanden sein, da z.B. Sandbienen nur geringe Flugradien von maximal 600 m aufweisen (GATHMANN & TSCHARNTKE 2002). Geeignete Lebensräume sind meist Magerrasen, Ruderalflächen, Brachland sowie Sand-, Kies- und Lehmgruben mit sonnenexponierten Böschungen oder Abruchkanten mit lückigem Bewuchs (WESTRICH 1989). „*Fehlen solche Stellen im Umkreis von etwa 500 m rund um ein Frauenschuh-Vorkommen, dann bleiben die Blüten mangels Besucher unbestäubt und können keine Samen zur Vermehrung ausbilden.*“ (BARTH & OPITZ 2014). Zusätzlich werden die Bestäuber, insbesondere die Honigbienen, drastisch dezimiert durch die Intensivierung der Landwirtschaft, dem Einsatz von Pestiziden, von Viren, invasiven Arten (wie der Varroamilbe), der Fragmentierung bzw. dem Verlust von Lebensräumen und schließlich dem Verlust von Imkern (POTTS et al. 2010).

Die Blüte von *C. calceolus* bildet mit dem hochgewölbten Labellum eine sogenannte „Kesselfalle“, in der die Insekten durch Hineinfallen die Blüte mit zuvor gesammelten Pollen bestäuben (DARWIN 1862, NILSSON 1979). Die eigenen Pollen werden den Insekten erst am Ausgang der Kesselfalle angeheftet und somit wird eine Selbstbestäubung der Blüte verhindert. Laut JERSÁKOVÁ et al. (2006) verhindert der Mechanismus der Kesselfalle erfolgreich die Selbstbestäubung, da keine Übertragung der Pollen auf die Narbe innerhalb einer Blüte von *C. calceolus* erfolgen kann. Der Ausgang der Kesselfalle befindet sich am Gynostemium mit den Pollinarien bzw. Pollinien (MÜLLER 1873, THOMÉ 1885, SEYBOLD 2011, KADEREIT et al. 2014) (Abbildung 4). Das Gynostemium bildet eine spezielle Struktur bei den Orchidaceae, bei der das dritte sterile Staubblatt mit dem Griffel verwachsen ist (JACOB et al. 1994). Beim Besuch einer Frauenschuhblüte bestäuben Bienen diese mit den transportierten Pollinarien. Nach der Befruchtung erfolgt die Ausbildung einer Samenkapsel, die 6.000 – 20.000 Samen enthalten kann. Der Ausbreitungstyp (TACKENBERG 2001) der staubfeinen Diasporen ist die Anemochorie (Ausbreitung durch den Wind). Der Fruchtansatz der Blüten vom obligat allogamen (ausschließlich fremdbestäubten) Frauenschuh mit 20 – 30 % (SADOVSKÝ 1973, BARTH & PLOB 2014) oder sogar weniger als 10 % (PRIMACK & STACY 1998, SHEFFERSON et al. 2014) fällt dabei sehr gering aus, wobei eine Dezimierung der Bestäuber zu einem weiteren Rückgang der Befruchtungsquote führt.

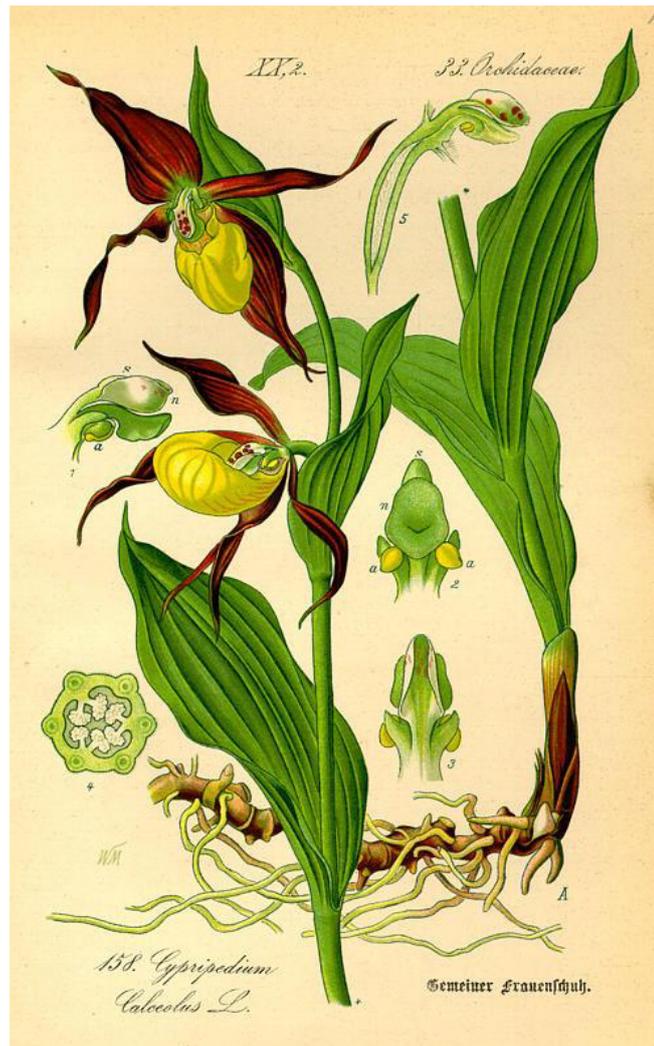


Abbildung 4: Habituszeichnung von *C. calceolus*. Zu sehen sind u.a. das Rhizom (A), die Blüte, das Gynostemium (1,2,3) mit den Pollinarien bzw. Pollinien (a) und die Samenanlage (5) (THOMÉ 1885).

Neben der generativen Vermehrung verbreitet sich der Frauenschuh zusätzlich vegetativ durch klonales Wachstum (DAUMANN 1968, HEINRICH & LORENZ 1996, KULL 1998, NICOLE et al. 2005). Als Geophyt bildet *C. calceolus* ein unterirdisches Rhizom aus. Durch jährliches Wachstum des unterirdischen Rhizoms entstehen weitere oberirdische Sprosse bzw. Triebe (Rameten) (KULL 1999), welche sich genetisch von der Mutterpflanze (Genet) nicht unterscheiden (Abbildung 5). KULL (1999) beschreibt, dass durchschnittlich 4,9 Jahre benötigt werden, damit an einem Rhizom eine neue Verzweigung entsteht. Durch das unterirdische Rhizom ist der Frauenschuh in der Lage ungünstige Umweltbedingungen (z.B. Beschattung, Blattfraß) kurzfristig zu überdauern, indem in manchen Jahren kein Austrieb von Sprossen erfolgt (VAN GROENENDAEL et al. 1996, SHEFFERSON et al. 2005a). Der Genet mit seinen Rameten wird als Stock bzw. Horst bezeichnet (LOHR 2013).

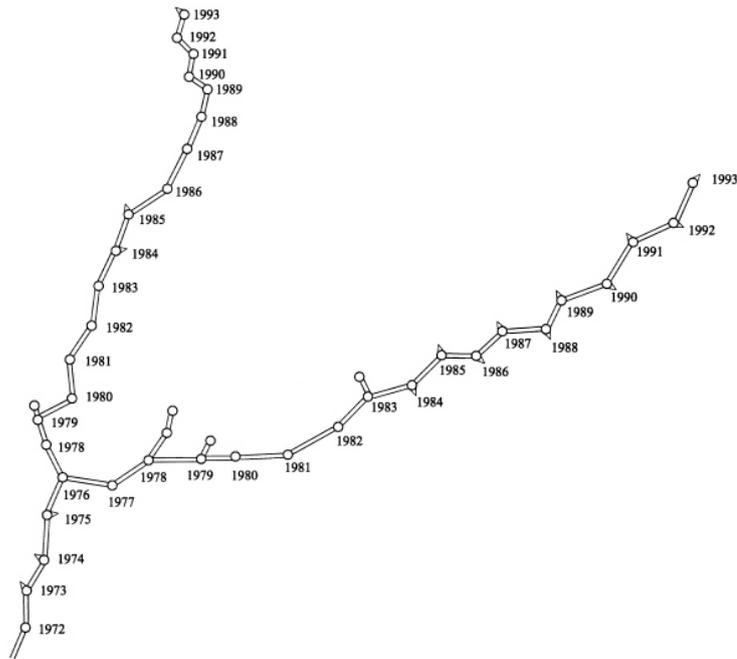


Abbildung 5: Die schematische Ansicht eines Rhizoms mit klonalem Wachstum von *C. calceolus* von 1972 – 1993 (KULL 1999). Der Genet entstand nach der Skizze zu urteilen vor 1972 und bildete jährlich mindestens einen Rameten aus. (Kreise = ausgetriebene Knospe bzw. Ramet, Dreiecke = ruhende Knospe)

1.1.2 Mykorrhiza und Samenkeimung

Symbiosen zwischen Pflanzenwurzeln und Pilzen nennt man Mykorrhiza. Mykorrhizen sind im Pflanzenreich weit verbreitet und werden in drei Arten, die vesikulär-arbuskuläre Mykorrhiza, die Ekto- und die Endomykorrhiza, unterteilt. Auch der Frauenschuh geht von Anfang an solch eine Symbiose ein. Genauer gesagt, handelt es sich bei dieser Symbiose um eine Endomykorrhiza, bei der die Pilzhyphen bis in den Raum zwischen Zellwand und Plasmalemma eindringen können (KADEREIT et al. 2014). Der Pilz, der mit *C. calceolus* eine Symbiose eingeht, wird in die Gattung *Rhizoctonia* eingeordnet (SHEFFERSON et al. 2005b). Wie schon erwähnt, beinhaltet eine Kapsel des Frauenschuhs 6000 – 20000 Samen, oder sogar bis zu 40000 (REINHARD et al. 1991), wobei ein einziger Samen nach KULL (1999) etwa 1,2 x 0,3 mm groß ist und mit zu den größten Orchideensamen der gemäßigten Breiten gehört. Durch die geringe Samengröße von Orchideen können zum einen große Mengen an Samen in einer Kapsel produziert werden, zum anderen können sich die Samen durch das damit verbundene geringe Gewicht mit dem Wind von wenigen Metern (JACQUEMYN et al. 2007) bis zu 10 km (FAY et al. 2009) oder sogar bis zu 2000 km (ARDITTI & GHANI 2000) weit ausbreiten.

Die im Verhältnis zu anderen Pflanzen geringe Größe der Samen von *C. calceolus* kommt daher, dass das Endosperm, welches als Nährgewebe dient, extrem reduziert ist. Von Anfang

an geht der Orchideensame mit dem Pilz eine Mykorrhizierung ein und wird bereits als Samen besiedelt. Durch diese Besiedlung des Pilzes kann die Keimung des Frauenschuhsamens erfolgen. Zuerst wird die robuste Testa des Samens für den Embryo durchlässig. Wenn die passenden Bodenbedingungen für Pilz und Pflanze vorhanden sind, kann der Samen keimen. Nach der Keimung bildet der Embryo für die ersten Lebensjahre ein Gewebe, das Protokorm, aus (IRMISCH 1853, ECCARIUS 2009). Dabei ist das Protokorm vollkommen von der Versorgung des Pilzes durch mineralische Nährsalze, Kohlenhydrate und Kohlenstoffe abhängig. Erst wenn die ersten Blätter des Protokorms gebildet werden, kann die Pflanze den Pilz versorgen. Nach neuesten Erkenntnissen wird *C. calceolus* nicht mehr als „autotroph“ (FUCHS & ZIEGENSPECK 1926) sondern als „partiell mykoheterotroph“ eingeordnet, weil anhand von Isotopenanalysen bewiesen wurde, dass der Pilz den Frauenschuh auch im höheren Alter (und nicht nur bei der Keimung) mit organischen Substanzen versorgt (GEBAUER et al. 2016). Die weitere Lebensweise wird in 1.1.1 erläutert.

1.1.3 Samenvermehrung

C. calceolus benötigt also für die Keimung einen Mykorrhiza-Pilz der Gattung *Rhizoctonia*. Es gibt zwei Faktoren, die dabei zu beachten sind. Zum einen benötigt der Samen den Pilz, um die solide Testa für den Embryo durchlässig zu machen und zum anderen um an Nährstoffe für die Keimung zu gelangen, die bei anderen Pflanzen im Endosperm enthalten sind. Um die solide Testa auch ohne den Pilz durchlässig zu machen, berichten FROSCH (1982), LUCKE (1982) und WEINERT (1992) von einer Behandlungsmöglichkeit von Orchideensamen vor der Keimung. Sie verwendeten in dieser Behandlung eine Natriumhypochlorid-Desinfektion, bei der die Samen in die Lauge eingelegt werden und die Testa der Samen nach einer Einwirkzeit von zwei bis drei Stunden durchlässig wird, worauf noch eine Wässerungsphase von mehreren Tagen erfolgt. Eine weitere Möglichkeit das Problem der soliden Testa zu umgehen, ist die Ernte von unreifen Samenkapseln. Es wurde festgestellt, dass bei einer Ernte von unreifen Samenkapseln die Testa der Samen noch nicht keimungshemmend wirkt und bei einer Aussaat der unreifen Samen die Quote der Keimung von *Cypripedium*-Samen ohne Mykorrhiza-Pilz erfolgreich ist (LIGHT & MACCONAILL 1998, RAMSAY & STEWART 1998, SHEFFERSON et al. 2007). Da der Pilz zur Bereitstellung der Nährstoffe nicht zur Verfügung steht, müssen nach dem Aufbrechen der Testa alle benötigten Nährstoffe, die der Samen zum Keimen braucht, im Agarmedium vorhanden sein. Dabei bewährte sich die Spurenelementlösung nach NITSCH & NITSCH (1969) (Tabelle 18) in Kombination mit der Zutatenliste nach MALMGREN (1992) (Tabelle 19) für eine

erfolgreiche Samenkeimung von *C. calceolus* in vitro ohne einen Mykorrhiza-Pilz. Nach Aussage von PRENDERGAST (2010) sind die *Cypripedium*-Keimlinge mit einem Mykorrhiza-Pilz bei Auspflanzungen widerstandsfähiger und haben somit höhere Überlebenschancen.

1.1.4 Gesetzlicher Hintergrund

Der Frauenschuh (*C. calceolus*) gehört in Deutschland zur Liste der Fauna-Flora-Habitat (FFH) -Arten nach Anhang II und IV (BNatSchG §10 Abs. 2 Nr. 10 und 11, vom 25.3.2002, BGBl. I S. 1193) der Fauna-Flora-Habitatrichtlinie (DER RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN 1992) vom 21. Mai 1992. In diesen Richtlinien sind für streng geschützte Arten Bestimmungen zum Artenschutz, für Maßnahmen innerhalb und außerhalb von „Natura2000“-Schutzgebieten, für Entnahmen, für Wiederansiedlungen etc. enthalten. In der Roten Liste Europas (BILZ et al. 2011) steht die Art auf der Vorwarnliste („near threatened“). Nach LUDWIG et al. (1996) bekam *C. calceolus* die Einstufung „3“ („gefährdet“) in der Roten Liste gefährdeter Pflanzen Deutschlands. In der Roten Liste der Farn- und Samenpflanzen Hessens (HEMM 2008) ist diese Pflanze als „2“ („stark gefährdet“) eingestuft. Für eine Bewertung der Verantwortlichkeit Deutschlands (LUDWIG et al. 2007) ist die Datenlage für den Frauenschuh gegenwärtig noch ungenügend. Momentan wird die weltweite Gefährdung als „unbekannt“ („G?“) eingestuft. Hessen verkörpert hierbei einen Teil des westlichen Arealrandes des Verbreitungsgebiets in Europa von *C. calceolus* (Abbildung 7). Nach dem Erhaltungszustand in den biogeografischen Regionen (Abbildung 6) gemäß des Nationalen Berichts 2013 wird der Erhaltungszustand (setzt sich zusammen aus dem Zustand der Populationen, der Habitatqualität und der Beeinträchtigungen des Verbreitungsgebiets) des Frauenschuhs in der kontinentalen Region Deutschlands als „ungünstig - unzureichend“ eingestuft.

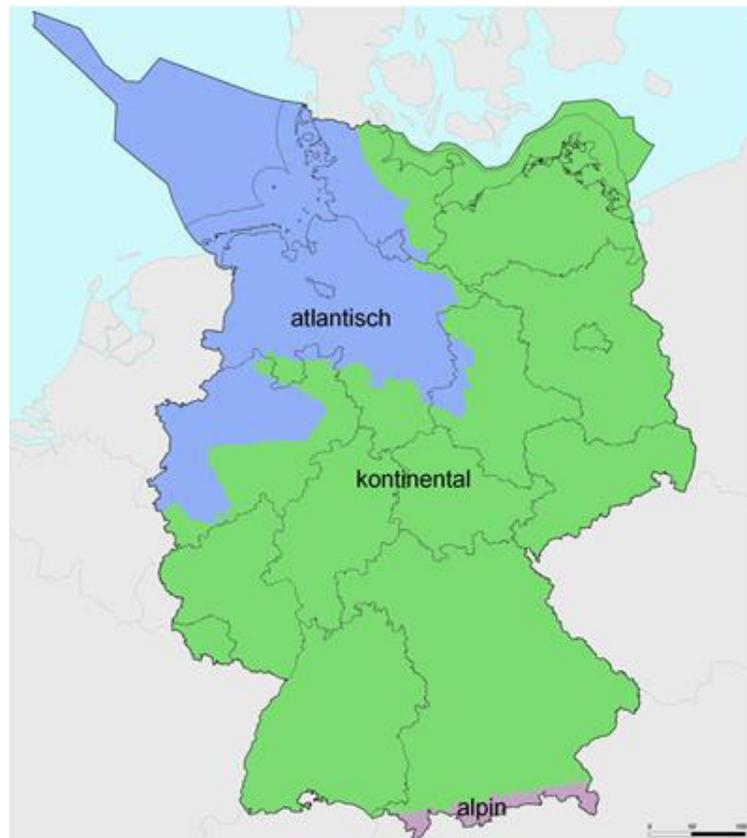


Abbildung 6: Karte der biogeografischen Regionen Deutschlands. Zu sehen ist, dass Deutschland in die drei biogeografische Regionen (atlantisch, kontinental, alpin) eingeteilt ist, wobei Hessen zur kontinentalen Region Deutschlands zugehörig ist (Quelle: BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT (2007))

1.2 Vorkommen Europa- und Deutschlandweit

Die Verbreitung von *C. calceolus* beschränkt sich auf die historisch geprägte “Alte Welt”. Nach HULTÉN & FRIES (1986), HEIN & MEYSEL (2010), LORENZ (2010) und JÄGER et al. (2013) reicht das Verbreitungsgebiet von *C. calceolus* innerhalb der borealen und temperaten Zonen von N-Sachalin über Japan, Korea, NO-China, Sibirien nach Europa (Abbildung 7). In Afrika, Nord- und Südamerika oder Australien ist die Art *C. calceolus* nicht verbreitet. Das Verbreitungsgebiet innerhalb von Europa ist auf Ost-, Mittel- und Nordeuropa beschränkt.

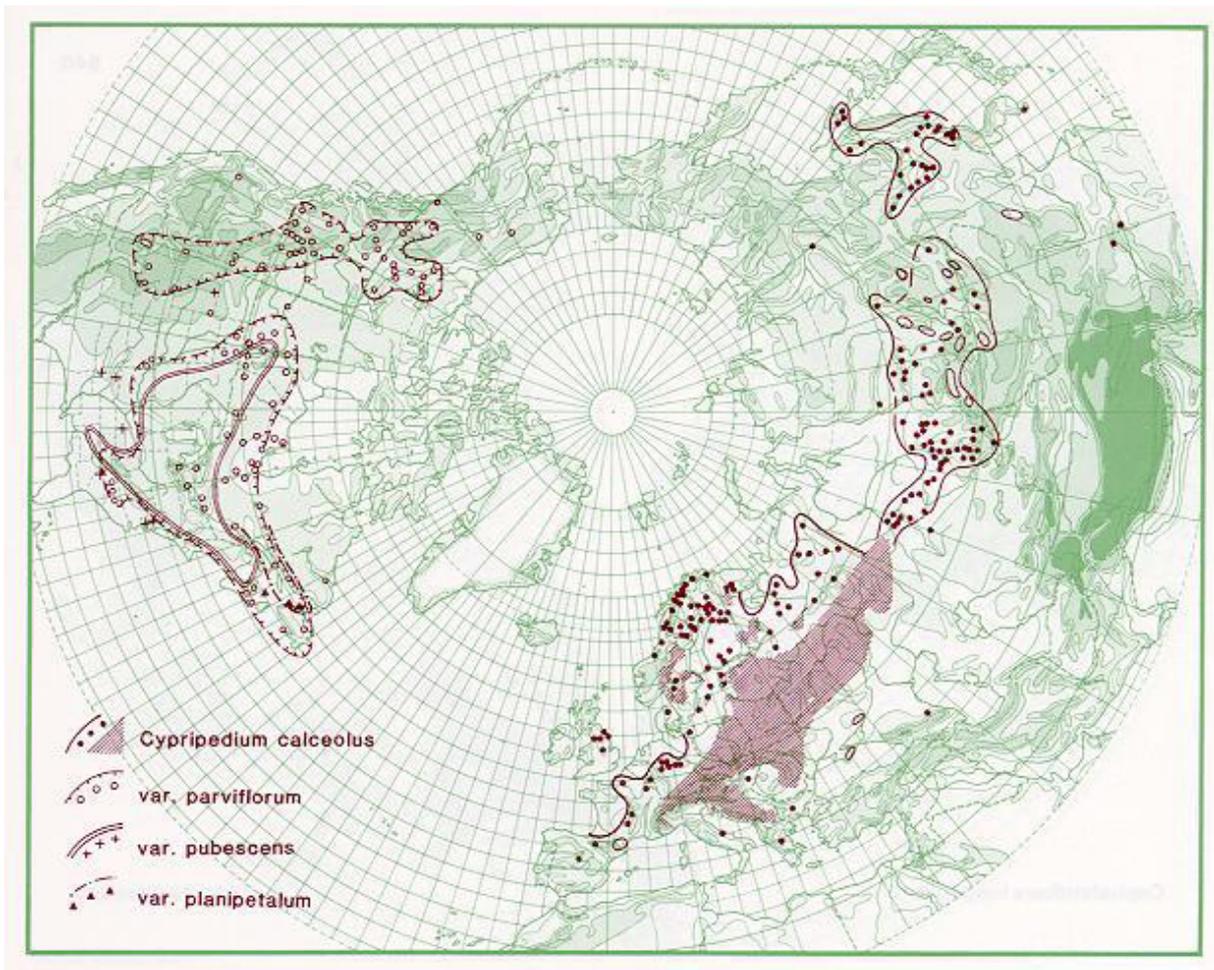


Abbildung 7: Verbreitung von *C. calceolus* auf der Nordhalbkugel. Es ist zu sehen, dass die Art *C. calceolus* ein Verbreitungsgebiet innerhalb der borealen und temperaten Zonen von N-Sachalin über Japan, Korea, NO-China, Sibirien nach Europa hat. Das Verbreitungsgebiet innerhalb von Europa ist auf Ost-, Mittel- und Nordeuropa beschränkt. Deutschland befindet dabei am westlichen Randbereich des Verbreitungsareals. (Quelle: (DEN VIRTUELLA FLORAN) in Anlehnung an (HULTÉN & FRIES 1986))

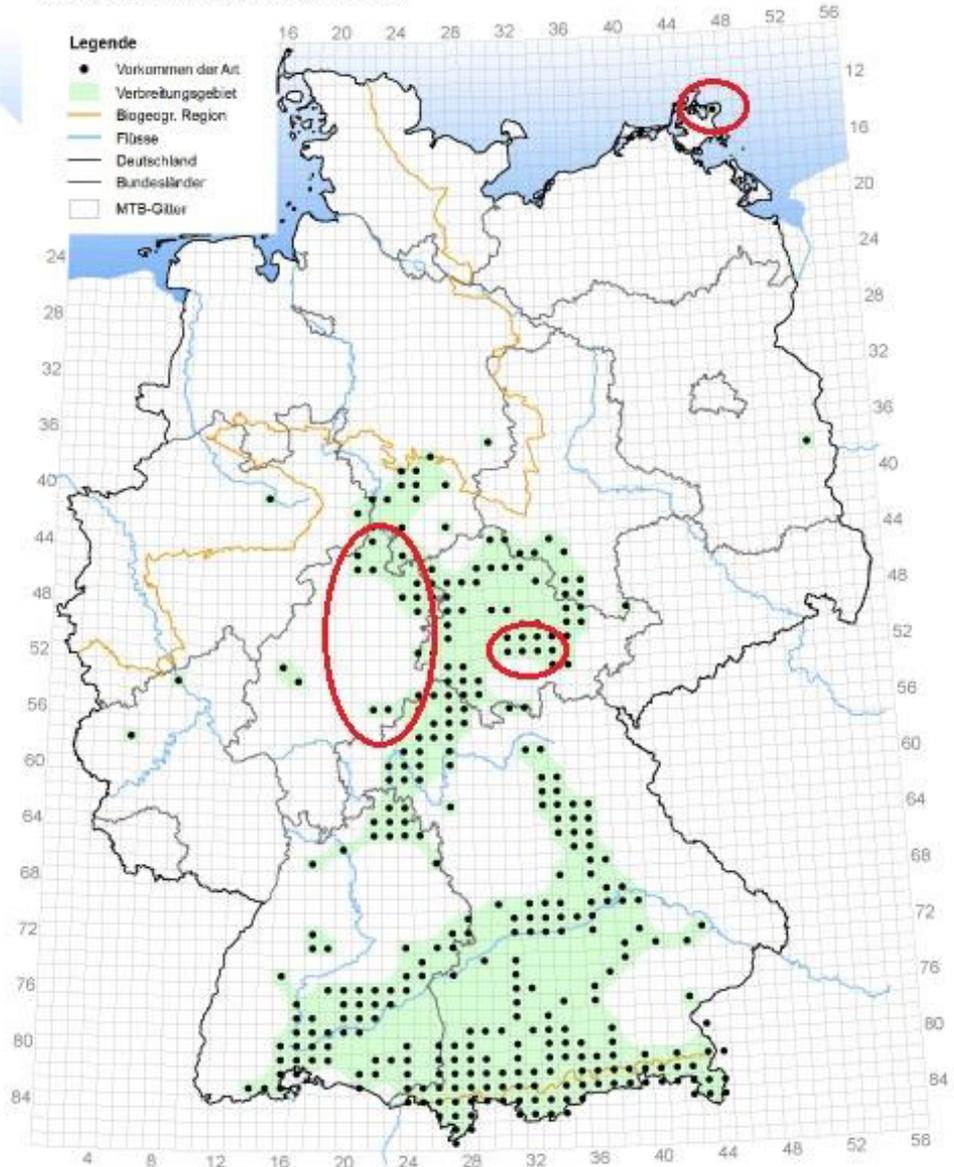
In Deutschland sind die Hauptwuchsorte des Frauenschuhs die Bundesländer Bayern, Baden-Württemberg, Thüringen, Niedersachsen und Hessen, wobei sie Randgebiete des gesamten Verbreitungsareals darstellen. Einzelne Populationen kommen laut der Vorkommens- und Verbreitungskarte der Pflanzen- und Tierarten der FFH-Richtlinie nach BFN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ /BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT (2013) noch in Brandenburg, in Mecklenburg-Vorpommern, in Sachsen-Anhalt, Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz vor (Abbildung 8).

Kombinierte Vorkommens- und Verbreitungskarte der Pflanzen- und Tierarten der FFH-Richtlinie

Stand: Dezember 2013

Berichtsjahr: 2013

1902 *Cyripedium calceolus* (Frauenschuß)



Geobasisdaten (c) GeoBasis-DE / BKG

Quelle: Nationaler FFH-Bericht 2013

Datengrundlagen: Verbreitungsdaten der Bundesländer und des BfN

0 50 100 Kilometer

Abbildung 8: Verbreitung von *C. calceolus* in Deutschland (Quelle: (BfN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ /BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT 2013), modifiziert). In Deutschland sind die Hauptwuchsorte des Frauenschuhs die Bundesländer Bayern, Baden-Württemberg, Thüringen, Niedersachsen und Hessen. Einzelne Populationen kommen nach dem Stand von 2013 noch in Brandenburg, in Mecklenburg-Vorpommern (auf Rügen), in Sachsen-Anhalt, Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz vor. Die rotmarkierten Bereiche zeigen die Gebiete der später erwähnten Blattentnahme.

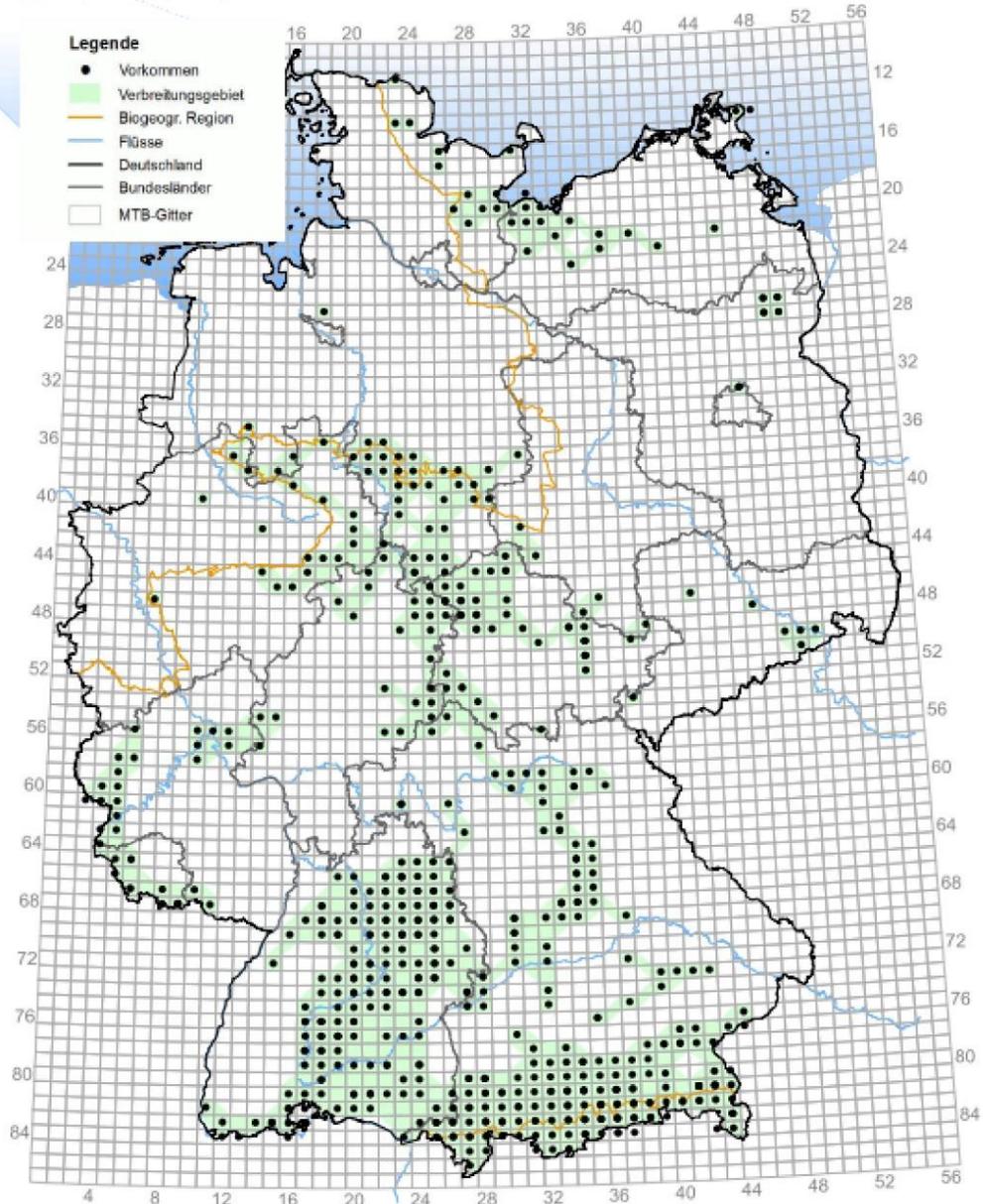
Abbildung 9 zeigt eine Karte der Verbreitung des Lebensraumtyps 7220 (Kalktuffquellen) in Deutschland (BFN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ /BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT 2013). Kalktuffquellen treten nur in Kalkgebieten auf. Dies ist ein seltener Lebensraum in Gebieten, in denen das Grundwasser stark mit Kalk angereichert ist und durch Quellaustritt an die Oberfläche gelangt. In Deutschland kommt dieser Lebensraum hauptsächlich in der Schwäbischen und Fränkischen Alp und dem Alpenraum sowie im Mittelgebirge und dem Norddeutschen Tiefland vor. In Hessen sind die Kalktuffquellen nur in Nord- und Osthessen vertreten (BFN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ /BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT 2013). Bei einem Vergleich der beiden Karten (Abbildung 8 + Abbildung 9) ist zu erkennen, dass die Vorkommen von *C. calceolus* vorwiegend in kalkhaltigen Gebieten mit Kalktuffquellen zu finden sind. Dies bestätigt auch ELLENBERG et al. (1991), der sie als kalkliebend eingeordnet hat. Auch DEVILLERS-TERSCHUREN (1999) schreibt zu *C. calceolus*, dass die Pflanze zumindest in Deutschland meistens in Kalkgebieten vorkommt.

Kombinierte Vorkommens- und Verbreitungskarte der Lebensraumtypen der FFH-Richtlinie

Stand: Dezember 2013

Berichtsjahr: 2013

7220 (Kalktuffquellen)



Geobasisdaten (c) GeoBasis-DE / BKG

Quelle: Nationaler FFH-Bericht 2013

Datengrundlage: Verbreitungsdaten der Bundesländer und des BfN

0 50 100 Kilometer

Abbildung 9: Verbreitung vom Lebensraumtyp 7220 (Kalktuffquellen) in Deutschland. In Deutschland kommt dieser Lebensraum hauptsächlich in der Schwäbischen und Fränkischen Alp und Alpenraum sowie im Mittelgebirge und dem Norddeutschen Tiefland vor. In Hessen sind die Kalktuffquellen nur in Nord- und Osthessen vertreten (Quelle: (BfN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ/BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT 2013).

1.3 Vorkommen, Entwicklung und Gefährdung hessischer Populationen

Abbildung 10 zeigt die Verbreitung von *C. calceolus* in Hessen bis 2013 (BARTH & OPITZ 2014). Aus dieser Verbreitungskarte ist aufgrund von historischen Daten ersichtlich, dass der Frauenschuh in Hessen vor 1990 nicht nur im Norden und Osten Hessens in zahlreichen Populationen vorkam, sondern auch in anderen Kalkgebieten im Süden und Westen Hessens. Ein deutlicher und dramatischer Rückgang ist in der Zeitspanne von 1990 – 2007 zu erkennen, wobei das hessische Hauptverbreitungsgebiet nur noch im Norden und Osten Hessens liegt. Im Westen von Hessen sind nur noch 3 Gebiete des Frauenschuhs vorhanden. Der dramatische Rückgang setzt sich in der Zeitspanne von 2008 – 2013 fort. Im Hauptverbreitungsgebiet des nördlichen und östlichen Hessens hat sich die Anzahl der Frauenschuhgebiete halbiert und im südlichen und westlichen Teil Hessens sind sie vollständig verschwunden. Aufgrund der schlechten Situation von *C. calceolus* in Hessen startete ein Artenhilfskonzept für den Frauenschuh in Hessen (BARTH 2007). Dank dieses Artenhilfskonzepts und der Beteiligung von ehrenamtlichen Botanikerinnen und Botanikern konnten Daten zu neuen Frauenschuhgebieten gewonnen werden; die Situation des Frauenschuhs in Hessen ist jedoch nach wie vor bedenklich.

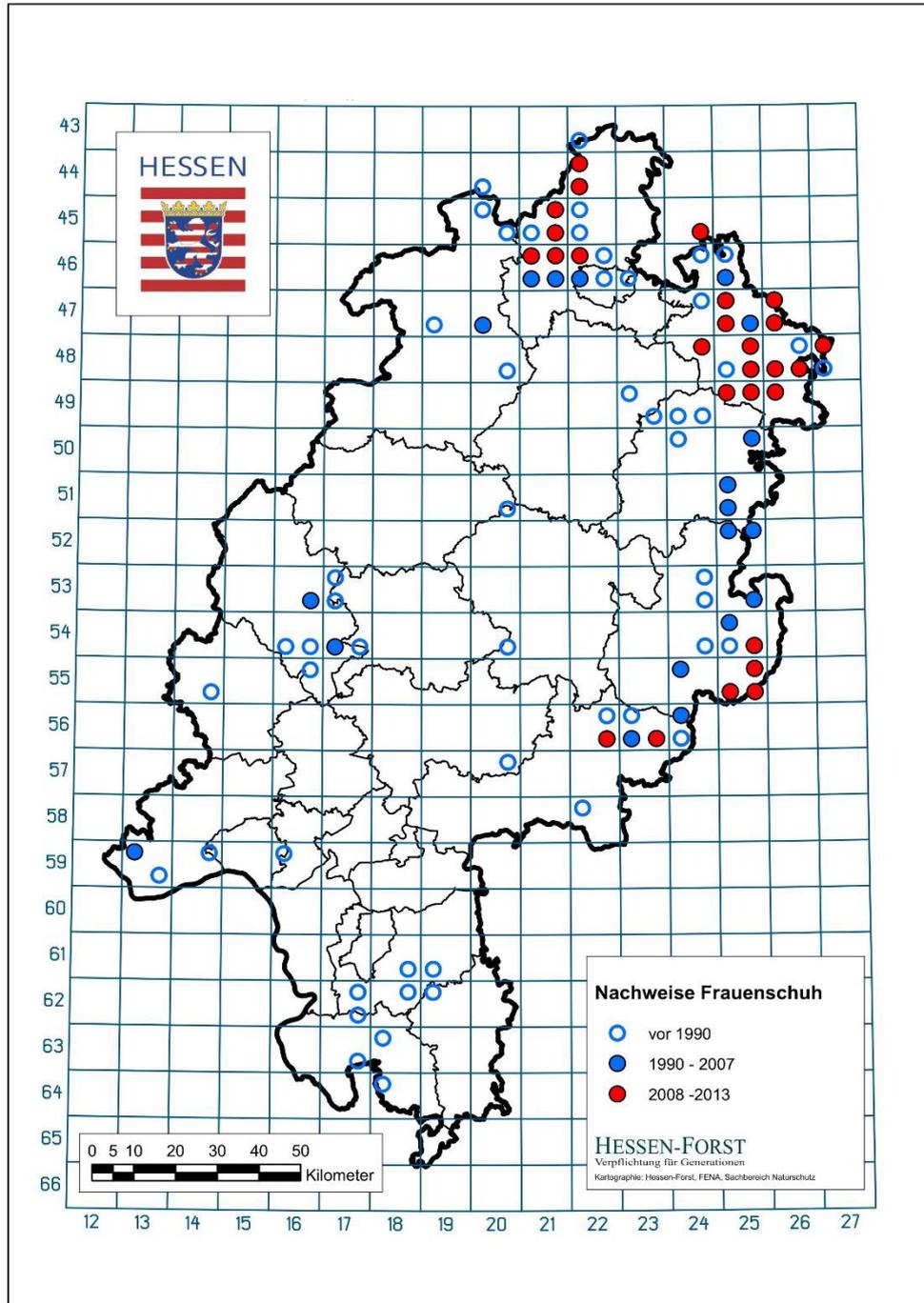


Abbildung 10: Verbreitung von *C. calceolus* in Hessen aus den Jahren vor 1990 – 2013. Es ist zu erkennen, dass vor 1990 das Verbreitungsgebiet deutlich größer war als im Jahr 2013. (BARTH & OPITZ 2014)

Auf den Entwicklungstrend der Frauenschuhpopulationen in Hessen von 2004 – 2013 weist die Abbildung 11 hin (BARTH & PLOß 2014). Es ist zu erkennen, dass die verbliebenen 41 hessischen Populationen durch die Maßnahmen des Artenhilfskonzeptes nicht nur stabilisiert, sondern sogar gestärkt (positiver Trend) wurden. Weitere fünf Populationen sind erloschen.

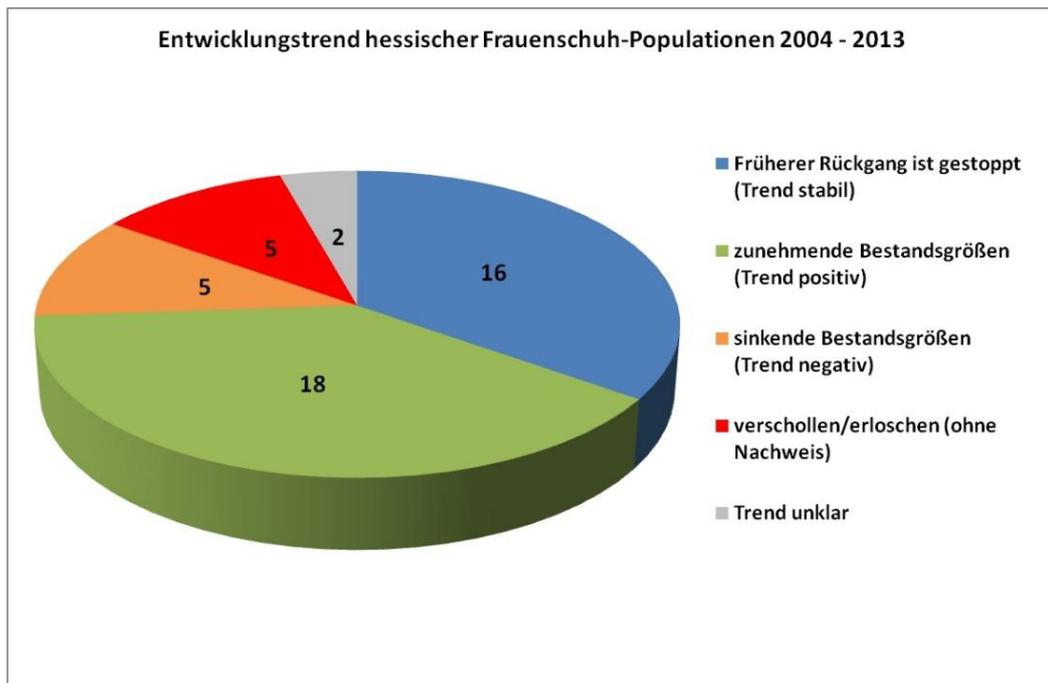


Abbildung 11: Entwicklungstrend der hessischen Frauenschuh-Populationen im Vergleich von 2004 – 2013 als Auswertung der in diesem Zeitraum in regelmäßigen Abständen entstandenen Gutachten und deren Populationsgrößenbestimmung. Es ist zu erkennen, dass in der Zeit von 2004 – 2013 5 Populationen erloschen und 5 Populationen sinkende Bestandsgrößen aufwiesen. In dieser Zeitspanne wurde bei 16 Populationen durch Pflegemaßnahmen der Rückgang der Populationsgröße gestoppt und zunehmende Bestandgrößen konnten bei 18 Populationen in Hessen verzeichnet werden. (BARTH & PLOB 2014)

Neben der Maßnahmenplanung müssen auch mögliche Gefährdungen erkannt und minimiert werden. Als „Hauptgefährdungsfaktor“ sind Lichtmangel durch Verbuschung und zu dichtem Kronenschluss zu nennen (BARTH & OPITZ 2014). Daneben sind es Fraßschäden von Schnecken, Rot- und Schwarzwild sowie Ausgrabungen von ganzen Stöcken, die vor allem bei kleinen Populationen gravierende Schäden anrichten.

1.4 Rückblick auf die genetische Forschung im Hinblick auf den Frauenschuh

Die Monokotyle *C. calceolus* ist nicht nur durch ihr Äußeres, sondern auch durch ihr im Inneren großes Genom eine interessante Pflanze. Die in die Familie der Orchidaceae eingeordnete Pflanze hat eine Chromosomenzahl (2n) von 20-22 und einen hohen DNA-Gehalt (1C (pg)) von 32,4 (OBERDORFER et al. 1983, BENNETT et al. 2000, CRIBB 1997). Im Vergleich zu anderen

Pflanzen wie z.B. der dikotylen Asteraceae *Crepis praemorsa* (L.) WALTHER (1C = 5,3 pg) (BENNETT & LEITCH 1997), anderer monokotylen Pflanzen wie *Alium sativum* L. (1C = 16,8 pg) oder *Alstroemeria psittacina* LEHM. (1C = 25 pg), oder sogar aus der Familien der Orchidaceae die Art *Paphiopedilum javanicum* PFITZER (1C = 25,3 pg) (BENNETT et al. 2000), befindet sich *C. calceolus* mit seinem DNA-Gehalt im oberen Teil. Dagegen hat der Reis *Oryza sativa* L. einen DNA-Gehalt von nur 1C = 0,5 pg (SOMERVILLE & SOMERVILLE 1999).

Aus morphologischer Sicht wurde die Art bereits ausführlich beschrieben. Ergebnisse von Datenauswertungen aus genetischen Untersuchungen von *C. calceolus* enden jedoch auffällig oft mit dem Fazit, dass verschiedene genetische Fingerabdruck-Techniken (MCGREGOR et al. 2000) wie RAPD, AFLP (VOS et al. 1995) und SSR verwendet wurden, aber die Ergebnisse nicht ausreichend Informationen boten. LEITCH et al. (2009) schrieb:

„...in *C. calceolus* (1C-32.4 pg) the AFLP traces were uninformative, giving just a few strongly amplifying bands with no variation, not only between individuals of different populations, but also when compared with other species of *Cypripedium* such as *C. macranthos*.“ (LEITCH et al. 2009).

Über Schwierigkeiten berichten auch FAY et al. (2005), dass sie insbesondere beim großen Genom des Frauenschuhs gescheitert sind, eine hohe Qualität an Banden mit Hilfe der AFLP-Methode zu erhalten. Nach weiteren Bemühungen berichten FAY et al. (2009):

„When the standard AFLP protocol is used with genomes as large as that in *C. calceolus*, levels of genetic variation are dramatically underestimated“ (FAY et al. 2009).

BRZOSKO et al. (2011) schreiben, dass die untersuchten polnischen Vorkommen von *C. calceolus* mit anderen Methoden durch eine moderate genetische Diversität charakterisiert sind. Sie trennten die Regionen nach dem maximalen Gletschervorstoß der letzten Eiszeit, fanden aber keine Unterschiede zwischen den Populationen der vergletscherten und eisfreien Gebiete und schlussfolgerten daraus, dass die Populationen einen Ursprung haben müssen.

Eine weitere Schwierigkeit der Art ist der Schutzstatus. In Deutschland ist es äußerst schwierig und mühsam an Genehmigungen zur Entnahme von Blatt- und Samenmaterial zu gelangen. Daher sind Untersuchungen über Populationen in Deutschland bisher nicht vorhanden.

Trotz der vielen Probleme mit großen Genomen, wie bei *Cypripedium*-Arten, erschien eine erfolgreiche Veröffentlichung von SHARMA et al. (2013) über eine Analyse der genetischen Variation an *Cymbidium* spp. mittels ISSR. Die ISSR-Methode fand häufig Anwendung an Pflanzen, wie z.B. an *Pseudotsuga menziesii* (MIRBEL) FRANCO und der *Cryptomeria japonica*

(THUNB. EX L. F.) D.DON (TSUMURA et al. 1996), *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH (GODWIN et al. 1997), *Fallopia* ssp. ADANS. (HOLLINGSWORTH et al. 1998), *Penstemon* ssp. SCHMIDEL, (WOLFE et al. 1998) oder aber an *Cymbidium goeringii* (RCHB.F.) RCHB.F. IN W.G.WALPERS (WANG et al. 2009b) oder *Dendrobium*-Arten (WANG et al. 2009a). SHARMA et al. (2013) benutzten 35 ISSR-Primer und fanden heraus, dass einige Primer Unterschiede in der genetischen Variation aufzeigten. *Cymbidium*-Arten gehören wie *C. calceolus* zu der Familie der Orchidaceae und somit konnten Parallelen nicht ausgeschlossen werden. Betrachtet man innerhalb der Familie der Orchideen den Frauenschuh, finden sich nach derzeitigem Stand keine Anwendungen der ISSR-Methode an *C. calceolus*. Aus diesen Gründen erfolgte eine Versuchsreihe mit ISSR-Primern an *C. calceolus* anhand der Veröffentlichung von SHARMA et al. (2013).

Die SRAP-Methode hat sich in der genetischen Analyse von Populationen einzelner Arten bewährt (BUDAK et al. 2004) und ist wie die ISSR auch eine PCR-basierende Marker Technik, wobei in der SRAP-Methode, im Gegensatz zur ISSR-Methode, mit 2 Primer gearbeitet wird (LI & QUIROS 2001, JIA-LIN et al. 2014). Die SRAP-Methode hat sich durch ein weites Anwenderspektrum als effektiv und zuverlässig erwiesen (DING et al. 2008, CAI et al. 2011, LI et al. 2014) und soll informativer sein als AFLP, RAPD und SSR Marker (BUDAK et al. 2004). Für eine genetische Untersuchung wurde SRAP als zweite Methode ausgewählt, weil nach JIA-LIN et al. (2014) die SRAP-Methode an *Paphiopedilum micranthum* TANG & F.T.WANG (zu der Familie der Orchidaceae gehörend) aussichtsreich und damit erfolgversprechend war.

Auch mit der Methode der AFLP erschienen neue Veröffentlichungen, wie z.B. von XIN et al. (2013), die eine AFLP-Analyse an sechs Populationen von *Cypripedium japonicum* THUNB. durchführten. Darin zeichneten sich Ergebnisse mit einer geringen genetischen Differenzierung innerhalb der Populationen und einem gewissen Grad an genetischer Differenzierung zwischen den Populationen ab. Daher wurde an *C. calceolus* eine AFLP-Analyse auf der Grundlage von XIN et al. (2013) gestartet.

Die einzelnen Methoden werden im Kapitel 2.2.1 näher beschrieben.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Populationen des Frauenschuhs gehen in ganz Europa stark zurück. Es gab schon mehrere Anstrengungen für Populationsstärkungen und Wiederansiedlungen des Frauenschuhs (2009 und 2011 in Hessen (Information vom HLNUG), 2002 in Nordrhein-Westfalen (KLINGENSTEIN et al. 2002), 2006 – 2009 Aussaatexperimente in Hessen, Thüringen und Bayern (BRUNZEL 2009, BRUNZEL 2010)). Dennoch gibt es selten Erfolge zu verzeichnen. Zum einen liegt dies an biologischen Besonderheiten wie dem schwierigen Lebenszyklus, den speziellen Keimungsbedingungen unter Beteiligung einer Mykorrhiza und der besonderen Bodenansprüche. Zum anderen gibt es aber auch in Naturschutzbelangen Schwierigkeiten, so z.B. bei Wissenschaftlern und Behörden über Unsicherheiten, welches Saatgut für welche Gebiete geeignet und verwendet werden kann. Diese Arbeit untersucht unter Anwendung der molekularen Methoden ISSR, SRAP und AFLP die Frage der genetischen Diversität hessischer Populationen anhand der Hypothese, dass die hessischen Populationen von *C. calceolus* hoch divers sind, da sie am Rand des Verbreitungsareals liegen und als Vorpostenpopulationen Fragmentierung vom Gesamtareal erfahren. Als weitere Fragestellung ist zu klären, ob Unterschiede zu den Populationen in Thüringen und auf Rügen existieren. Als Hypothese liegt zugrunde, dass der Kontakt zwischen den hessischen und thüringischen Populationen zu einem genetischen Austausch und Homogenisierung der Bestände geführt hat, während hingegen die Rügener Population aufgrund der die natürlichen Ausbreitungsdistanzen überschreitenden räumlichen Distanz isoliert, und damit genetisch eigenständig ist. Resultierend aus diesen beiden Fragestellungen soll eine naturschutzfachliche Empfehlung gegeben werden, ob nur naheliegende Populationen für eine Populationsstärkung von *C. calceolus* verwendet werden können, um möglicherweise vorhandene und begonnene genetische Differenzierungsprozesse nicht zu verändern.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzen

Im Auftrag des Hessischen Landesamts für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) (damals der Sachbereich Naturschutz des Servicezentrums Forsteinrichtung und Naturschutz (FENA) von Hessen-Forst) wurde im Jahr 2013 das Gutachten „Landesmonitoring 2013 des Frauenschuhs (*C. calceolus*) in Hessen (Art des Anhangs II und IV der FFH-Richtlinie)“ (BARTH & PLOß 2014) in Auftrag gegeben. Das Gutachten untersuchte die 46 bekannten hessischen Populationen und bewertete diese nach dem bundesdeutschen Bewertungsrahmen für den Bericht an die Europäische Union. Im Zuge der Begutachtung aller hessischen Populationen konnte in enger Zusammenarbeit mit der beauftragten Bürogemeinschaft „Sozietät Barth & Partner“ das benötigte Pflanzenmaterial sowie Samen gesammelt werden. Es wurden dazu alle benötigten Genehmigungen eingeholt.

Es werden nur landesweite Übersichtskarten zur Verfügung gestellt (Abbildung 12). Karten der genauen Koordinaten der besammelten Gebiete können leider nicht veröffentlicht werden. *C. calceolus* ist eine Art des Anhangs II und IV und damit in Hessen strengstens geschützt. Die genauen Standorte werden nicht zur Verfügung gestellt, um Missbrauch und Ausgrabungen in den untersuchten Gebieten zu unterbinden. Sie sind jedoch im Rahmen der Dissertation punktgenau bekannt.

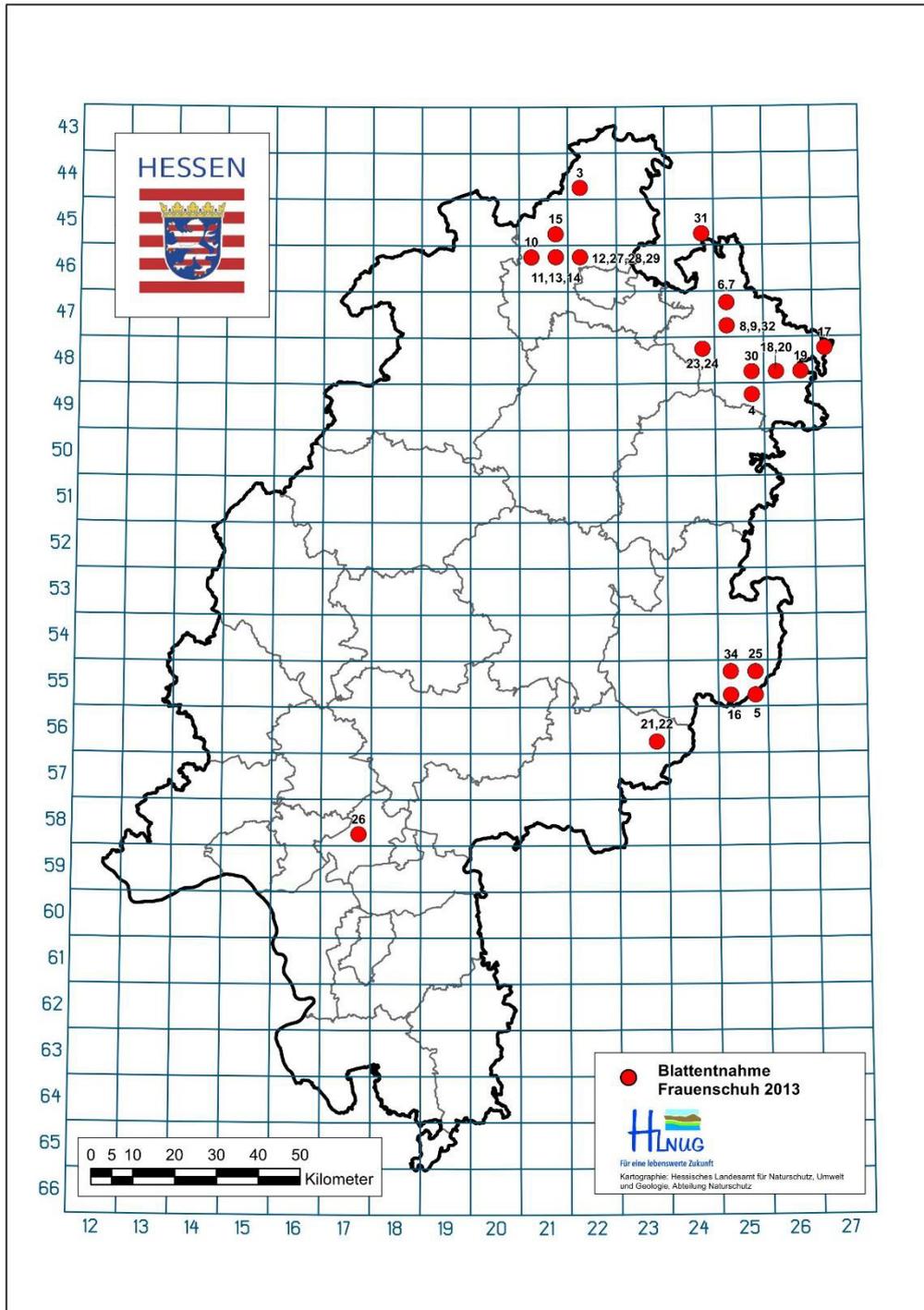


Abbildung 12: Populationen der Blatt- und Samenentnahme des Frauschuhs in Hessen (HLNUG). Die Populationen 1 und 2 sind die Populationen, die in Thüringen besammelt wurden. Populationen 3 – 32 sind hessische Populationen und Population 33 ist eine Population aus Mecklenburg-Vorpommern. In der Population mit der Nummer 34 wurde eine Blatt- und Samenentnahme durchgeführt. Als Vergleich steht die Tabelle 1 zur Verfügung.

2.2 Blattproben

Die ursprünglich 46 hessischen Populationen von *C. calceolus* wurden im Jahr 2013 aufgesucht und begutachtet. Nach Begutachtung der jeweiligen Populationsgrößen und deren Zustand wurden nach den Kriterien der Entnahmegenehmigung aus 30 Populationen jeweils 1-17 Blattproben (keine Sprosse) entnommen. Dazu wurde auch die im Jahr 2013 noch vorhandene Pflanze aus dem Botanischen Garten Frankfurt beprobt und in diese Untersuchung mit einbezogen. Um kleine Populationen nicht zu gefährden, wurden neun hessische Populationen von einer Blattentnahme ausgenommen. Bei sieben Populationen konnten leider keine Vorkommen mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich gelang es im Jahr 2014 aus zwei Populationen in Thüringen jeweils 15 und einer Population der Insel Rügen 10 Blattproben zu erhalten (Abbildung 8, die rotmarkierten Bereiche zeigen die Gebiete der Blattentnahme). Die beiden Populationen aus Thüringen stammen aus dem Raum Arnstadt und dem Saaletal. Insgesamt gelangen 195 Blattproben, wobei 155 Proben aus Hessen, 30 Blattproben aus Thüringen und 10 von der Insel Rügen stammen (Tabelle 1). Die erwähnte 34. Population ist auch die Population der Samenentnahme.

Tabelle 1: Anzahl der Blattproben von *C. calceolus* pro Population in und außerhalb Hessens (MTB = Messtischblatt; TK = Topografische Karte) (Die zwei Proben der Samenentnahme stammen aus der 34. Population.) Insgesamt gelangen 195 Blattproben, wobei 155 Proben aus Hessen, 30 Blattproben aus Thüringen und 10 aus Mecklenburg-Vorpommern stammen. (Angaben zur Population 33 mitunter aus JESCHKE (1964))

Population	TK-Blatt	Bundesland	Anzahl der Blattproben
1	Thüringen		15
2	Thüringen		15
3	MTB 4422	Hessen	12
4	MTB 4925	Hessen	17
5	MTB 5525	Hessen	9
6	MTB 4725	Hessen	4
7	MTB 4725	Hessen	11
8	MTB 4725	Hessen	2
9	MTB 4725	Hessen	2
10	MTB 4621	Hessen	16
11	MTB 4621	Hessen	6
12	MTB 4622	Hessen	6
13	MTB 4621	Hessen	7
14	MTB 4621	Hessen	6
15	MTB 4521	Hessen	3
16	MTB 5525	Hessen	1
17	MTB 4827	Hessen	5
18	MTB 4826	Hessen	1
19	MTB 4826	Hessen	1
20	MTB 4826	Hessen	2
21	MTB 5623	Hessen	2
22	MTB 5623	Hessen	12
23	MTB 4824	Hessen	2
24	MTB 4824	Hessen	2
25	MTB 5525	Hessen	13
26	MTB 5817	Hessen	2
27	MTB 4622	Hessen	2
28	MTB 4622	Hessen	2
29	MTB 4622	Hessen	3
30	MTB 4825	Hessen	1
31	MTB 4524	Hessen	2
32	MTB 4725	Hessen	2
33	Mecklenburg-Vorpommern		10
34	MTB 5525	Hessen	2

Es wurde max. $\frac{3}{4}$ eines frischen Blattes von *C. calceolus* als Blattprobe verwendet und max. 10 % der Pflanzen einer Population besammelt (Experteneinschätzung). Große Populationen wurden im Frühjahr/Sommer beprobt und kleine Populationen im Spätsommer, bevor der oberirdische Teil im Herbst abstirbt. Dadurch wurde vermieden, dass die kleinen Populationen zu sehr geschwächt werden. Die Blätter wurden einzeln in Teebeuteln transportiert und

ausreichend beschriftet (z.B. Standort, 1.Probe, usw.), um eine stetige Zuordnung der Herkunftsgebiete zu gewährleisten. Danach wurden die mit Blätter gefüllten Teebeutel in Plastiktüten mit dem Trocknungsmaterial Silicagel (CHASE & HILLS 1991) aufgefüllt. Das Silicagel wurde ständig überprüft und ausgetauscht, um die Restfeuchte aus den Blättern zu beseitigen.

Es wurden nur Teile des Blattes der 195 gesammelten Blattproben für die Analyse im Labor benötigt. Die restlichen Blattteile wurden in der AG Spezielle Botanik im Institut für Botanik der Justus-Liebig-Universität in Gießen gelagert bzw. eingefroren (-80°C) und stehen künftig weiteren Analysen zur Verfügung.

2.2.1 Laborarbeiten

Die genetischen Analysen wurden im Labor des Botanischen Instituts, AG Spezielle Botanik an der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. In den folgenden Abschnitten werden die Extraktion der Blattproben, die DNA-Messung, sowie die Methoden ISSR, SRAP und AFLP mit ihren Optimierungen näher erläutert. Zusätzlich wird die Samenaussaat mit den Substratzusammensetzungen und ihre Verarbeitung erklärt.

2.2.1.1 Extraktion der Blattproben und DNA-Messung

Nach der Nummerierung der getrockneten Proben erfolgte mittels Kugelschwingmühle (Retsch GmbH, Deutschland) eine mechanische Zerkleinerung von 1 x 1 cm pro Probe. Aus dem zerkleinerten Material wurde die DNA mittels Extraktion standardgemäß mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) mit leichten Veränderungen (MÜLLER et al. 2016) gewonnen.

Mit dem Produkt der DNA-Extraktion wurde der DNA-Gehalt mit einem NanoPhotometer™ (Implen) gemessen. Dazu wurden 4 µl aus jeder Probe entnommen, um den DNA-Gehalt zu messen. Als Nullprobe dienten 4µl H₂O. Die Messung des DNA-Gehalts jeder Probe wurde 3mal wiederholt und daraus der Mittelwert ermittelt. Es wurde der „Lid-Factor“ 50 benutzt, wobei der gemessene DNA-Gehalt immer im vorgegeben Rahmen bei einer Konzentration von 0,020 – 1,700 ng/µl lag. Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt von einigen Proben mit einer

Gelelektrophorese überprüft, um unnötige Arbeitsschritte zu vermeiden. Die Gelelektrophorese wird im entsprechenden Kapitel näher erläutert.

2.2.1.2 PCR

Eine PCR ist die Abkürzung für „polymerase chain reaction“ und dient dazu, DNA mittels einer DNA-Polymerase zu vervielfältigen. In diesem Kapitel wird die PCR kurz erläutert, weil sie als Grundlage für die Methoden der ISSR, SRAP, AFLP dient.

Zu einer herkömmlichen PCR, beschreibt MÜLHARDT (2009), gehören drei Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation (Abbildung 13). Der Denaturierungs-Schritt ist notwendig um die beiden Stränge der Ausgangs-DNA zu trennen (Eine Denaturierung wird bei 94°C durchgeführt.). Im Anschluss erfolgt der Annealing-Schritt (Temperatur variiert nach Basen und Länge der Primersequenz), in dem die verwendeten Primer an die getrennten DNA-Stränge hybridisieren. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, damit durch die Taq-Polymerase die Sequenzen der Primer verlängert werden und damit zwei gleiche DNA-Doppelstränge vorliegen (MÜLHARDT 2009). Der Ablauf dieser drei Schritte umfasst einen Zyklus. Umso höher die Zahl der Zyklen, umso höher die exponentielle Vervielfältigung (Es sollte dennoch beachtet werden, dass ab einer bestimmten Höhe der Vervielfältigung die Aussagekraft abnimmt.).

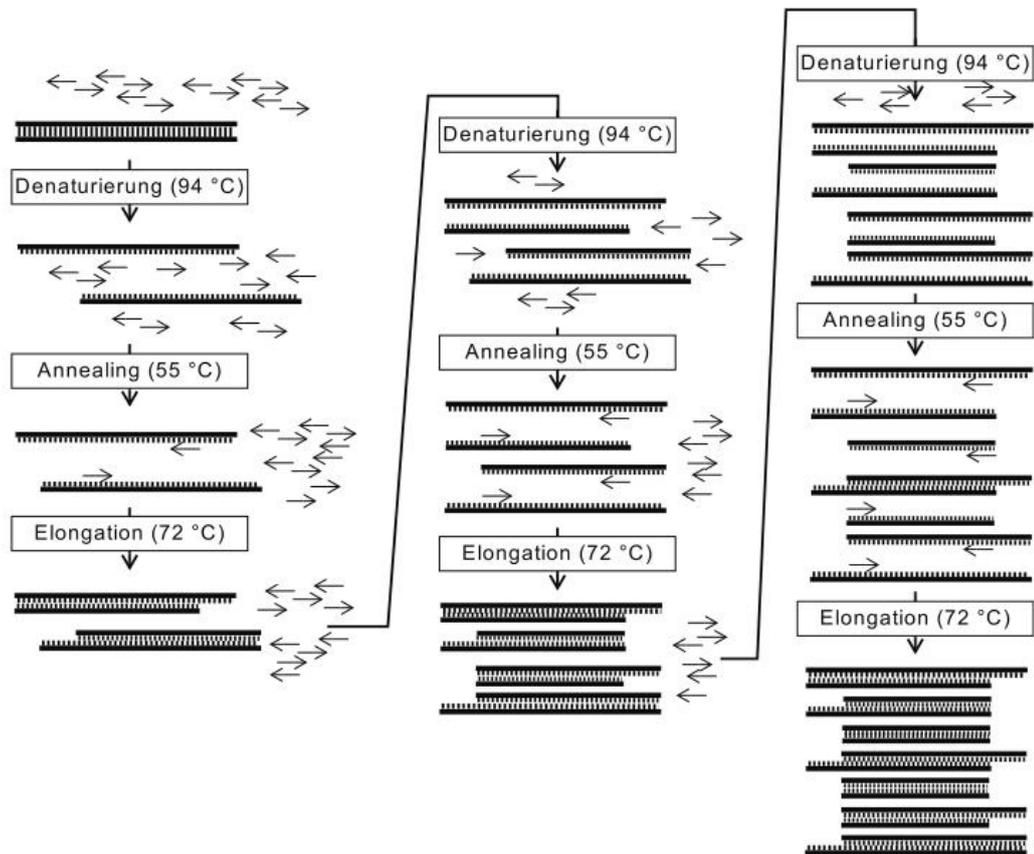


Abbildung 13: Schematische Darstellung von drei Zyklen in einer PCR. Der Denaturierungs-Schritt ist notwendig um die beiden Stränge der Ausgangs-DNA zu trennen. Im Anschluss erfolgt der Annealing-Schritt, in dem die verwendeten Primer an die getrennten DNA-Stränge hybridisieren. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, damit durch die Taq-Polymerase die Sequenzen der Primer verlängert werden und damit zwei gleiche DNA-Doppelstränge vorliegen. Umso höher die Zahl der Zyklen, umso höher die exponentielle Vervielfältigung. (MÜLHARDT 2009)

Um eine vorhandene genetische Diversität zwischen verschiedenen Populationen einer Art sichtbar zu machen, werden verschiedene Methoden verwendet. Im Folgenden werden, die in dieser Arbeit, verwendeten drei Methoden vorgestellt.

2.2.1.3 ISSR („Inter Simple Sequence Repeats“)

Die ISSR-Methode ist die Abkürzung für „Inter Simple Sequence Repeats“ und besitzt eine hohe Leistungsfähigkeit und Effizienz mit einer guten Reproduzierbarkeit (ACHTELIK 2006, GEORGE et al. 2009, WANG et al. 2009b). ZIETKIEWICZ et al. (1994) schrieb: „*Inter-SSR PCR*

provides a novel fingerprinting approach applicable for taxonomic and phylogenetic comparisons and as a mapping tool in a wide range of organisms.“ (ZIETKIEWICZ et al. 1994).

Für die genetische Untersuchung wurde diese Methode ausgewählt, weil nach SHARMA et al. (2013) die ISSR-Methode an *Cymbidium* (Orchidaceae) erfolgreich war und akzeptable Ergebnisse bot. Es wird hierbei ein spezieller Primer benutzt, der sich aus Di- oder Trinukleotidwiederholungen mit ein bis drei zusätzlichen Nukleotiden am 5‘ und/oder 3‘-Ende aufbaut (GUPTA et al. 1994, ZIETKIEWICZ et al. 1994). Neben ihrer hohen Effizienz und Reproduzierbarkeit (resultiert aus der Länge der Primer von ca. 16-20 bp) ist diese Methode auch kostengünstig.

Für die Methode der ISSR wurde das Protokoll nach DOGAN et al. (2010) leicht verändert (Tabelle 2). Es wurde ein 25 µl Mastermix hergestellt, wobei die Menge an dNTP (2‘-Desoxyribonucleosid-5‘-triphosphate, „Bausteine zur DNA-Synthese“) (Fermentas, Thermo Scientific) erhöht und die Menge an Probenmaterial verringert wurde. In den Einstellungen am Thermocycler (Mastercycler EP Gradient S, Eppendorf) wurden die Anzahl der Zyklen sowie die Annealing-Temperatur reduziert.

Tabelle 2: ISSR-Protokoll mit Ausgangs-Mastermix (links) und den Ausgangs-Einstellungen für die PCR am Thermocycler (rechts) (verändert nach DOGAN et al. (2010))

	1x (µl)	PCR-Programm	Temp.	Zeit
H ₂ O	18,6	Step 1	94°C	3 min
10x Buffer (Fermentas)	2,5	Step 2	94°C	30 sec
Primer (10 pmol/µl) (MWG-Biotech)	0,5	Step 3	61°C	30 sec
dNTP (2 mM) (Fermentas)	2	Step 4	72°C	1 min
Dream Taq (5 units/µl) (Fermentas)	0,4	got to 2	35 Cycles	
Summe	24	Step 5	72°C	10 min
Probe	1	Step 6	8°C	hold

Mit diesem Ausgangsprotokoll wurden die vorhandenen ISSR-Primer (Tabelle 3) getestet und Optimierungen vorgenommen.

Tabelle 3: Verwendete ISSR-Primer mit Ihren Sequenzen nach SHARMA et al. (2013) und DOGAN et al. (2010) (V = A,C oder G; H = A,C oder T)

Primer	Sequenz (5' - 3')	Referenz
I-27	ACA CAC ACA CAC ACA CG	Sharma et al. (2013)
I-35	AGA GAG AGA GAG AGA GTC	Sharma et al. (2013)
I-845	CTC TCT CTC TCT CTC TGG	Sharma et al. (2013)
I-852	TCT CTC TCT CTC TCT CAA	Sharma et al. (2013)
ISSR-04	TGT GTG TGT GTG TGT GA	Sharma et al. (2013)
ISSR-05	VHV CTC TCT CTC TCT CTC T	Dogan et al. (2010)
ISSR-09	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	Sharma et al. (2013)
ISSR-10	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	Sharma et al. (2013)
ISSR-12	CAT GGT GTT CAT CAT TGT TCC A	Sharma et al. (2013)
ISSR-4	GAC AGA CAG ACA	Dogan et al. (2010)
ISSR-F1	GAG CAA CAA CAA CAA CAA	Dogan et al. (2010)
ISSR-F2	CTC GTG TGT GTG TGT GTG T	Dogan et al. (2010)
ISSR-F5	AGA GAG AGA GAG AGA G	Dogan et al. (2010)
ISSR-F6	CCA CCA CCA CCA CCA	Dogan et al. (2010)
ISSR-F7	ACA CAC ACA CAC ACA C	Dogan et al. (2010)
ISSR-M8	ACA CAC ACA CAC ACA CAC G	Dogan et al. (2010)
ISSR-M12	GAC ACG ACA CGA CAC GAC AC	Dogan et al. (2010)
ISSR-M15	CAC ACA CAC ACA CAC AAG	Dogan et al. (2010)
ISSR-N2	GTG GTG GTG GTG GTG	Dogan et al. (2010)

Es wurden mit der ISSR-Methode 19 Primer, die in Tabelle 3 aufgelistet sind, getestet und für die Optimierungen der Protokolle verwendet. Dabei haben die Primer ISSR-12, I-845, I-852, ISSR-09 und ISSR-10 (SHARMA et al. 2013) die besten Ergebnisse geliefert.

In den folgenden Tabellen werden nun die optimierten Protokolle für die einzelnen ISSR-Primer aufgelistet.

Tabelle 4: Optimiertes PCR-Protokoll für die ISSR-Primer ISSR-12 und ISSR-10 (verändert nach DOGAN et al. (2010))

	1x (µl)
H ₂ O	10,6
10x Buffer (Fermentas)	2
Primer (10 pmol/µl) (Metabion)	2
dNTP (2 mM) (Fermentas)	2
Mg ⁺⁺ (25 mM) 1,5 mM	1,2
DMSO (99,5 %)(Roth)	1
Dream Taq (5 units/µl) (Fermentas)	0,2
Summe	19
Probe	1

PCR-Programm	Temp.	Zeit
Step 1	94°C	5 min
Step 2	94°C	40 sec
Step 3	57°C	1 min 30 sec
Step 4	72°C	2 min
got to 2	40 Cycles	
Step 5	72°C	10 min
Step 6	8°C	hold

Im Vergleich zu Tabelle 2 reduzierte sich bei den Primer ISSR-12 und ISSR-10 (Tabelle 4) die Menge des Mastermix auf 19 µl. Es wurden der Buffer (Fermentas, Thermo Scientific) auf 2 µl und die Dream Taq Polymerase (Fermentas, Thermo Scientific) auf 0,2 µl reduziert. Die Menge an Primer wurde auf 2 µl erhöht. Als zusätzliche Substanzen wurden Mg⁺⁺ ((25 mM) 1,5 mM, Thermo Scientific) mit 1,2 µl und DMSO (Dimethylsulfoxid (10%), (Roth)) mit 1 µl hinzugefügt. Die Wassermenge wurde entsprechend angepasst.

Tabelle 5: Optimiertes PCR-Protokoll für den ISSR-Primer I-845 (verändert nach DOGAN et al. (2010))

	1x (µl)
H ₂ O	10,6
10x Buffer (Fermentas)	2
Primer (10 pmol/µl) (Metabion)	2
dNTP (2 mM) (Fermentas)	2
Mg ⁺⁺ (25 mM) 1,5 mM	1,2
Betain (Sigma-Aldrich)	3
BSA (Fermentas)	0,3
Dream Taq (5 units/µl) (Fermentas)	0,2
Summe	21,3
Probe	1

PCR-Programm	Temp.	Zeit
Step 1	94°C	5 min
Step 2	94°C	40 sec
Step 3	51°C	1 min 30 sec
Step 4	72°C	2 min
got to 2	40 Cycles	
Step 5	72°C	10 min
Step 6	8°C	hold

Im Vergleich zu Tabelle 2 reduzierte sich bei dem Primer I-845 (Tabelle 5) die Menge des Mastermix auf 21,3 μl , wobei für den PCR-Ansatz nur 19 μl verwendet wurde. Es wurden der Buffer auf 2 μl und Dream Taq Polymerase auf 0,2 μl reduziert. Die Menge an Primer wurde auf 2 μl erhöht. Als zusätzliche Substanzen wurden Mg^{++} mit 1,2 μl , Betain (betaine monohydrate (5M) (Sigma-Aldrich)) mit 3 μl und BSA (Bovine Serum Albumin (10ng/ μl), (Fermentas, Thermo Scientific)) mit 0,3 μl hinzugefügt. Die Wassermenge wurde entsprechend angepasst.

Tabelle 6: Optimiertes PCR-Protokoll für den ISSR-Primer I-852 (verändert nach DOGAN et al. (2010))

	1x (μl)	PCR-Programm	Temp.	Zeit
H ₂ O	8,3	Step 1	94°C	5 min
10x Buffer (Fermentas)	2	Step 2	94°C	40 sec
Primer (10 pmol/ μl) (Metabion)	2	Step 3	47°C	1 min 30 sec
dNTP (2 mM) (Fermentas)	2	Step 4	72°C	2 min
Mg^{++} (25 mM) 1,5 mM	1,2	got to 2	40 Cycles	
Betain (Sigma-Aldrich)	3	Step 5	72°C	10 min
BSA (Fermentas)	0,3	Step 6	8°C	hold
Dream Taq (5 units/ μl) (Fermentas)	0,2			
Summe	19			
Probe	1			

Im Vergleich zu Tabelle 2 reduzierte sich bei dem Primer I-852 (Tabelle 6) die Menge des Mastermix auf 19 μl . Es wurden der Buffer auf 2 μl und Dream Taq Polymerase auf 0,2 μl reduziert. Die Menge an Primer wurde auf 2 μl erhöht. Als zusätzliche Substanzen wurden Mg^{++} mit 1,2 μl , Betain mit 3 μl und BSA mit 0,3 μl hinzugefügt. Die Wassermenge wurde entsprechend angepasst.

Tabelle 7: Optimiertes PCR-Protokoll für den ISSR-Primer ISSR-09 (verändert nach DOGAN et al. (2010))

	1x (µl)	PCR-Programm	Temp.	Zeit
H ₂ O	10,6	Step 1	94°C	5 min
10x Buffer (Fermentas)	2	Step 2	94°C	40 sec
Primer (10 pmol/µl) (Metabion)	2	Step 3	53°C	1 min 30 sec
dNTP (2 mM) (Fermentas)	2	Step 4	72°C	2 min
Mg ⁺⁺ (25 mM) 1,5 mM	1,2	got to 2	40 Cycles	
DMSO (99,5 %) (Roth)	1	Step 5	72°C	10 min
Dream Taq (5 units/µl) (Fermentas)	0,2	Step 6	8°C	hold
Summe	19			
Probe	1			

Im Vergleich zu Tabelle 2 reduzierte sich bei dem Primer ISSR-09 (Tabelle 7) die Menge des Mastermix auf 19 µl. Es wurden der Buffer auf 2 µl und Dream Taq Polymerase auf 0,2 µl reduziert. Die Menge an Primer wurde auf 2 µl erhöht. Als zusätzliche Substanzen wurden Mg⁺⁺ mit 1,2 µl und DMSO mit 1 µl hinzugefügt. Die Wassermenge wurde entsprechend angepasst.

Die verwendete DNA-Menge war bei allen getesteten Primer 1µl.

Bei den fünf verwendeten ISSR-Primer wurden die pre-Denaturierung im 1.Schritt bei 94°C auf 5 Min. und die Denaturierung im 2.Schritt auf 40 Sekunden erhöht. Nach zahlreichen Optimierungsschritten lagen die optimalen Annealing-Temperaturen in 3.Schritt bei 57°C (I-12 und ISSR10), 51°C (I-845), 47°C (I-852) und 53°C (ISSR09). Die Elongation im 4. Schritt wurde auf 2 Min. erhöht. Die Zyklen wurden auf 40 erhöht.

Für die Darstellung der ISSR-PCR-Produkte wurde die Gelelektrophorese wie in Kapitel 2.2.1.6 durchgeführt.

2.2.1.4 SRAP (“Sequence-related Amplified Polymorphism”)

Die SRAP-Methode hat sich in Untersuchungen genetischer Beziehungen von Populationen einzelner Arten bewährt (BUDAK et al. 2004) und ist wie die ISSR auch eine PCR-basierende Marker Technik, wobei in der SRAP-Methode, im Gegensatz zur ISSR-Methode, mit 2 Primer gearbeitet wird (LI & QUIROS 2001, JIA-LIN et al. 2014). Der forward-Primer besteht dabei aus 17 Basen und der reverse-Primer aus 18 Basen, wobei die beiden Primer am 5'-Ende eine sogenannte „filler“-Sequenz von 10 (forward-Primer) oder 11 Basen (reverse-Primer)

aufweisen. Danach folgt beim forward-Primer die Basenfolge „CCGG“ und beim reverse-Primer „AATT“ und jeweils drei selektive Basen zum 3'-Ende hin (Tabelle 9) (LI & QUIROS 2001). Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Primern erfolgt als Ergebnis eine höhere Anzahl an Banden als bei der ISSR-Methode. Die SRAP-Methode hat sich durch die sequenzbezogene Amplifizierung und ein weites Anwenderspektrum als effektiv und zuverlässig erwiesen (DING et al. 2008, CAI et al. 2011, LI et al. 2014) und soll informativer sein als AFLP, RAPD und SSR Marker (BUDAK et al. 2004).

Für eine genetische Untersuchung wurde SRAP als zweite Methode ausgewählt, weil nach JIA-LIN et al. (2014) die SRAP-Methode an *Paphiopedilum micranthum* TANG & F.T.WANG (zu der Familie der Orchidaceae gehörend) erfolgreich war.

Für die Methode der SRAP wurde das Protokoll verändert nach JIA-LIN et al. (2014) verwendet (Tabelle 8).

Tabelle 8: SRAP-Protokoll mit Ausgangs-Mastermix und den Ausgangs-Einstellungen für die PCR am Thermocycler (verändert nach JIA-LIN et al. (2014))

	1x (µl)	PCR-Programm	Temp.	Zeit
H ₂ O	11,44	Step 1	94°C	3 min
10x Buffer (Fermentas)	2	Step 2	94°C	1 min
Primer forward (10pmol/µl) (Metabion)	0,2	Step 3	35°C	1 min
Primer reverse (10pmol/µl) (Metabion)	0,2	Step 4	72°C	1 min
dNTP (2 mM) (Fermentas)	2	got to 2	5 Cycles	
dream Taq (5units/µl) (Fermentas)	0,16	Step 5	94°C	1 min
Summe	16	Step 6	50°C	1 min
Probe (10ng/µl)	4	Step 7	72°C	1 min
		got to 5	30 Cycles	
		Step 8	72°C	10 min
		Step 9	8°C	hold

Mit diesem Ausgangsprotokoll wurden die folgenden SRAP-Primer (Tabelle 9) mit den Proben von *C. calceolus* getestet.

Tabelle 9: Verwendete SRAP-Primer mit Ihren Sequenzen nach JIA-LIN et al. (2014)

Primerkombinationen	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Referenz
Me1 - Em9	TGA GTC CAA ACC GGA TA	GAC TGC GTA CGA ATT CGA	Jia-Lin <i>et al.</i> (2016)
Me5 - Em2	TGA GTC CAA ACC GGA AG	GAC TGC GTA CGA ATT TGC	Jia-Lin <i>et al.</i> (2016)

In der folgenden Tabelle wird nun das optimierte Protokoll für beide Primerkombinationen aufgelistet.

Tabelle 10: Optimiertes PCR-Protokoll für die SRAP-Primerkombinationen Me1-Em9 und Me5-Em2 (verändert nach JIA-LIN et al. (2014))

	1x (µl)
H ₂ O	11,04
10x Buffer (Fermentas)	2
Primer forward (10pmol/µl) (Metabion)	0,4
Primer reverse (10pmol/µl) (Metabion)	0,4
dNTP (2 mM) (Fermentas)	2
dream Taq (5units/µl) (Fermentas)	0,16
Summe	16
Probe (10ng/µl)	4

PCR-Programm	Temp.	Zeit
Step 1	94°C	3 min
Step 2	94°C	1 min
Step 3	35°C	1 min
Step 4	72°C	2 min
got to 2	5 Cycles	
Step 5	94°C	1 min
Step 6	50°C	1 min
Step 7	72°C	2 min
got to 5	30 Cycles	
Step 8	72°C	10 min
Step 9	8°C	hold

Im Vergleich zu Tabelle 8 erhöhte sich bei beiden SRAP-Primerkombinationen die Menge der Primer auf 0,4 µl. Die Wassermenge wurde entsprechend angepasst. Bei beiden SRAP-Primerkombinationen erhöhte sich die Elongation im 4. und 7. Schritt auf 2 Minuten.

2.2.1.5 AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)

Mittels der AFLP-Methode von VOS et al. (1995) können, ähnlich der beiden anderen Methoden, Aussagen über die genetische Ähnlichkeit oder Unähnlichkeit zwischen Individuen einer Population bzw. zwischen Populationen einer Art festgestellt werden. Diese Methode zeichnet sich einerseits durch einen regelmäßigen und positiven Einsatz in der Beurteilung der genetischen Diversität von Populationen (MARIETTE et al. 2002, NYBOM 2004) als robust und reproduzierbar, auch an großen Genomen (WEISING et al. 2005), aus. Andererseits ist es aber

ein sehr komplexes Verfahren, in dem schneller Fehler produziert werden und unter Umständen Fehlinterpretationen (z.B. durch Banden, die durch nicht bindende Primer entstanden sind) auftreten können. Durch genetische Veränderungen (z.B. Mutationen) innerhalb der Individuen entstehen Unterschiede in der Anzahl der möglichen DNA-Schnittstellen. Dadurch entstehen in einer genetischen Untersuchung pro Individuum unterschiedlich lange DNA-Fragmente, deren Länge zwischen den Individuen einer Art verglichen werden können.

Mit Hilfe der AFLP-Methode wird die DNA der Individuen zuerst mittels Restriktionsenzyme in Fragmente (typische Fragmentlänge: 50 – 500 bp) zerschnitten, an denen in der Ligation Primeradapter mit definierten Sequenzen an beiden Enden ligieren (WEISING et al. 2005). Diese vorgefertigten Restriktionsfragmente mit ihren Adaptern liefern in den nachfolgenden PCR-Reaktionen (preselektive (pre) und selektive (sel) PCR) Bindungsstellen für die verwendeten Primer. Die Primer müssen genau auf die Adapter abgestimmt sein, sonst erfolgt keine Amplifikation dieser Restriktionsfragmente. In der selPCR verwendet man einen Primer mit der gleichen Sequenz wie in der prePCR und fügt zusätzlich noch drei spezifische Basen an, um eine höhere Selektivität und eine Reduktion der Restriktionsfragmente zu erzielen. Umso mehr PCR-Durchgänge mit unterschiedlichen Primer verwendet werden, umso spezifischer sind die Fragmente, die amplifiziert werden. Durch die Anzahl bzw. Selektivität (Menge an Basen bzw. Nukleotiden) der verwendeten Primer kann das PCR-Produkt bzw. die Menge an amplifizierten Restriktionsfragmenten im PCR-Produkt reguliert werden.

Für die genetische Untersuchung wurde diese Methode ausgewählt, weil nach XIN et al. (2013) die AFLP-Methode an Populationen von *C. japonicum*, derselben Gattung zugehörend wie *C. calceolus*, erfolgreich war und trotz des großen Genoms Ergebnisse bot.

Um alle Proben aus der DNA-Extraktion mit ihren unterschiedlichen DNA-Gehalten weiter verarbeiten zu können, wurden für die AFLP-Methode alle Proben auf ca. 30 ng/µl DNA verdünnt. Bei einem höheren DNA-Gehalt wurde die Probe dementsprechend mit Wasser verdünnt. Bei niedrigerem DNA-Gehalt wurde im Protokoll der Restriktion dementsprechend eine höhere Menge an Probenmaterial und eine niedrigere Menge an Wasser verwendet.

Für die Durchführung der AFLP-Methode wurde als Grundlage das Protokoll von VOS et al. (1995) verwendet (Tabelle 11 und Tabelle 12).

Tabelle 11: Protokoll der preselektiven PCR nach VOS et al. (1995)

Substanz	Einzelansatz (μ l)
H ₂ O	18,5
PCR-Puffer (incl.15 mM MgCl ₂) (10x) (Fermentas)	2,5
dNTP-Mix (10 mM each) (Fermentas)	2,5
Primer EpA (0,1-0,5 μ M) (MWG Biotech)	0,5
Primer MpC (0,1-0,5 μ M) (MWG Biotech)	0,5
Taq-Polymerase (Dream-Taq) (Fermentas)	0,1
Volumen	24,6

Tabelle 12: Protokoll der selektiven PCR nach VOS et al. (1995)

Substanz	Einzelansatz (μ l)
H ₂ O	8,7
PCR-Puffer (incl.15 mM MgCl ₂) (10x) (Fermentas)	1,1
dNTP-Mix (10 mM each) (Fermentas)	0,28
Primer EpA NN (1 μ M) (MWG Biotech)	0,42
Primer MpC NN (5 μ M) (MWG Biotech)	0,42
Taq-Polymerase (Dream-Taq) (Fermentas)	0,07
Volumen	10,99

Tabelle 13: Verwendete Restriktionsenzyme bzw. AFLP-Primer mit Ihren Schnittstellen bzw. Sequenzen nach VOS et al. (1995) und teilweise verändert nach XIN et al. (2013)

Name		Schnittstellen bzw. Sequenz (5' - 3')	Referenz
Eco RI	Restriktionsenzym	5'...G↓A A T T C...3' 3'...C T T A A ↑G...5'	Vos et al. (1995)
Not1	Restriktionsenzym	5'...G C ↓G G C C G C...3' 3'...C G C C G G ↑C G...5'	New England BioLabs GmbH
Not1+	Primeradapter	GGC CCT CAG GAC TCA T	metabion international AG
EA+/- (Eco +/-)	Primeradapter	(Eco-) 5' - AATTGGTACGCAGTCTAC - 3' (Eco+) 5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3'	metabion international AG
E03	Primer	GAC TGC GTA CCA ATT CG	verändert nach Xin et al. (2013)
E78 (FAM)	Primer	GAC TGC GTA CCA ATT CGT T	verändert nach Xin et al. (2013)
M03	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AG	Vos et al. (1995)
M67	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC A	Xin et al. (2013)
M67+A	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC AA	verändert nach Xin et al. (2013)
M67+T	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC AT	verändert nach Xin et al. (2013)
M70	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC T	Xin et al. (2013)
M70+A	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC TA	verändert nach Xin et al. (2013)
M70+C	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC TC	verändert nach Xin et al. (2013)
M70+T	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC TT	verändert nach Xin et al. (2013)
preNot1	Primer	GAT GAG TCC TGA GGG CCA	metabion international AG
selNot1	Primer	GAT GAG TCC TGA GGG CCA CTG	metabion international AG

Es wurden mit der AFLP-Methode 12 Primer, die in Tabelle 13 aufgelistet sind, getestet und optimiert. Dabei haben die Primerkombinationen preNot1 und E03 (prePCR) und selNot1 und E78 (selPCR) in Verbindung mit den Restriktionsenzymen Not1 und Eco RI (Restriktion) und den Primeradaptoren Not1+ und EA +/- (Ligation) die besten Ergebnisse geliefert.

Der Primer E78 ist FAM (6-Carboxy-Fluorescein) gelabelt, d.h. er ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM versehen, wodurch die Fragmente mit diesem Primer markiert sind und für eine bessere Erstellung eines digitalen Bandenmusters (Kapitel 2.2.1.6) genutzt werden. Das Restriktionsenzym Not1 ist ein sogenanntes methylierungssensitives Restriktionsenzym, welches die DNA-Stränge nur schneidet, wenn eine Methylierung auf dem DNA-Strang vorhanden ist. Damit erreicht man eine höhere Selektion an Fragmenten und im Nachhinein eine Minimierung des PCR-Produkts.

In den folgenden Tabellen werden nun die optimierten Protokolle für die oben genannten Primer, -adapter und Restriktionsenzyme aufgelistet.

Tabelle 14: Optimiertes PCR-Protokoll der Restriktion in der AFLP-Methode für die Restriktionsenzyme Not1 und Eco RI. Der Mastermix der Restriktion (linke Tabelle) und 10 µl DNA pro Probe wurden bei 37°C für 3 Stunden inkubiert (rechte Tabelle) (verändert nach VOS et al. (1995)).

	1x (µl)
H ₂ O	7,1
10x BufferY/Tango (Fermentas)	2,5
Eco RI (10 Units/µl) (Fermentas)	0,25
Not1 (10 Units/µl) (Metabion)	0,15
Summe	10

PCR-Programm	Temp.	Zeit
Step 1	37°C	3 h
Step 2	65°C	20 min
Step 3	4°C	hold

Der Mastermix der Restriktion und 10 µl DNA pro Probe wurden bei 37°C für 3 Stunden inkubiert.

Tabelle 15: Optimiertes PCR-Protokoll der Ligation in der AFLP-Methode für die Primeradapter Not1+ und EA +/- . Jeweils 5µl Mastermix der Ligation wurde zu jedem Produkt der Restriktion hinzugefügt und bei 37°C für eine Stunde im Heizblock inkubiert (verändert nach VOS et al. (1995)).

	1x (µl)
H ₂ O	3
10x Ligase-Puffer (Fermentas)	0,5
EA +/- (5 pmol) (MWG Biotech)	0,5
Not1+ (Metabion)	0,5
T4-Ligase (~2 U, Fermentas)	0,5
Summe	5

Jeweils 5µl Mastermix der Ligation wurde zu jedem Produkt der Restriktion hinzugefügt und bei 37°C für eine Stunde im Heizblock inkubiert.

Tabelle 16: Optimiertes PCR-Protokoll der prePCR in der AFLP-Methode für die Primerkombination preNot1 und E03. Zu jedem Mastermix der prePCR (24,6 µl, linke Tabelle) wurden 6,71 µl Ligationsprodukt hinzugefügt und im Thermocycler 30 Zyklen durchlaufen (rechte Tabelle) (verändert nach VOS et al. (1995)).

	1x (µl)
H ₂ O	18,5
PCR-Puffer (inkl. 20 mM MgCl ₂) (10x) (Fermentas)	2,5
Primer E03 (Metabion)	0,5
Primer preNot1 (Metabion)	0,5
dNTP-Mix (10 mM each) (Fermentas)	2,5
Dream Taq Polymerase (5 units/µl) (Fermentas)	0,1
Summe	24,6

PCR-Programm	Temp.	Zeit
Step 1	94°C	3 min
Step 2	94°C	30 sec
Step 3	63°C	1 min
Step 4	72°C	1 min
got to 2	30 Cycles	
Step 5	72°C	7 min
Step 6	8°C	hold

Zu jedem Mastermix der prePCR (24,6 µl) wurden 6,71 µl Ligationsprodukt hinzugefügt und im Thermocycler 30 Zyklen durchlaufen.

Nach der prePCR wurde mittels Nanophotometer überprüft, ob nach der Restriktion, Ligation und prePCR eine Amplifizierung der DNA stattfand. Dazu wurden 4 µl aus jeder Probe entnommen, um den DNA-Gehalt zu messen. Als Nullprobe diente dazu 4 µl Mastermix der prePCR ohne DNA-Probe. Die Messung des DNA-Gehalts jeder Probe wurde für eine Berechnung des Mittelwerts dreimal wiederholt und alle Proben auf 30 ng/µl verdünnt, um sie für die selPCR vorzubereiten. Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt von einigen Proben mit einer Gelelektrophorese überprüft, um sicher zu gehen, dass der Inhalt der Proben auch unseren Erwartungen entsprach und keine unnötigen Arbeitsschritte verursacht. Die Gelelektrophorese wird im nächsten Kapitel näher erläutert.

Tabelle 17: Optimiertes PCR-Protokoll der selPCR in der AFLP-Methode für die Primerkombination selNot1 und E78. Jeweils 1,8 µl des Produkts der pre-PCR wurde zu 10 µl Mastermix der selPCR (linke Tabelle) gemischt und wieder für 30 Zyklen (rechte Tabelle) im Thermcycler laufen gelassen (verändert nach VOS et al. (1995)).

	1x (µl)
H ₂ O	8,7
PCR-Puffer (inkl. 20 mM MgCl ₂) (10x) (Fermentas)	1,1
Primer E78 (Metabion)	0,42
Primer selNot1 (Metabion)	0,42
dNTP-Mix (10 mM each) (Fermentas)	0,28
Dream Taq Polymerase (5 units/µl) (Fermentas)	0,07
Summe	10,99

PCR-Programm	Temp.	Zeit
Step 1	94°C	3 min
Step 2	94°C	30 sec
Step 3	55°C	1 min
Step 4	72°C	1 min
got to 2	30 Cycles	
Step 5	72°C	7 min
Step 6	8°C	hold

Jeweils 1,8 µl des Produkts der pre-PCR wurde zu 10 µl Mastermix der selPCR gemischt und wieder für 30 Zyklen im Thermcycler laufen gelassen.

2.2.1.6 Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese wurde zum einen für die Darstellung der PCR-Produkte der Methoden ISSR und SRAP genutzt und zum anderen für die Überprüfung der prePCR Produkte aus der AFLP-Methode. Dazu wurde ein 2 %iges Agarosegel hergestellt und erhitzt. Nach kurzem Abkühlen unter ständigem Rühren wurde das flüssige Agarosegel in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm für die Taschen hinzugefügt. Nach dem Erkalten (ca. 30 min) und der Herausnahme des Kamms wurden für jede Probe 4 µl des PCR-Produkts mit 3 µl SYBR®Gold (Firma SYBR® Gold (Invitrogen™)) vermischt und in die vorgefertigten Taschen hinein pipettiert. Um die entstehenden Banden der Proben beurteilen und messen zu können, dienten 7 µl des Größenstandards (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas Life Science), der zusätzlich in freigelassenen Taschen im Agarosegel aufgetragen wurde. Das Agarosegel mit den Proben und dem Größenstandard lief in der Gel-Elektrophorese bei 80 V für 45 Minuten (Spannungsgerät: EPS 301 Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech). Nachdem die Gel-Elektrophorese abgeschlossen war, wurden im Agarosegel die amplifizierten Fragmente der PCR unter UV-Bestrahlung (N90M, UV-Flächenstrahler, MW 312 nm) begutachtet und per Foto (PowerShot A70, Canon) dokumentiert. In den Methoden der ISSR und SRAP wurden die

entstandenen Bandenmuster manuell in eine 0/1-Matrix übertragen, wobei die „1“ für eine vorhandene Bande und die „0“ für eine nichtvorhandene Bande stand. Die Erstellung der 0/1-Matrix erfolgte in Excel 2010 & 2016 (Microsoft Corporation). In der Methode der AFLP wurden die Proben nach der selPCR zur Analyse in ein Labor (LGC Forensics IfB, LGC GmbH) geschickt und per Sequenzer ein digitales Bandenmuster der Proben erstellt.

Diese Daten würden mittels Genographer (BENHAM et al. 1999) in eine 0/1-Matrix übertragen. Aber aufgrund einer ungenügenden Erkennung der einzelnen Banden in der automatischen Analyse in Genographer erfolgte auch in der Auswertung der AFLP-Daten eine manuelle Übertragung der Daten in eine 0/1-Matrix.

2.2.1.7 Statistik

Für die statistische Datenanalyse der beprobten Populationen aus Hessen, Thüringen und von Rügen wurden die 5 Programme „AFLPsurv“, „GenAlEx“, „ARLEQUIN“, „R“ und „STRUCTURE“ verwendet.

AFLPsurv (Software AFLPsurv 1.0, VEKEMANS (2002)) berechnet die genetische Diversität und populationsgenetische Strukturen von Individuen bzw. Populationen, die z.B. aus Daten der AFLP, ISSR, SRAP analysiert wurden und berechnet daraus genetische Distanzmatrizen zwischen Populationen. Diese Berechnung basiert auf Allelfrequenzen, die dominant und aus zwei Allelen (ein dominantes Marker-Allel für das Vorhandensein einer Bande an einer bestimmten Position und ein rezessives Null-Allel für die Abwesenheit der Bande) bestehen (VEKEMANS 2002). Nach dem Ansatz von LYNCH & MILLIGAN (1994) ermittelt AFLPsurv die durchschnittliche, voraussichtliche Heterozygotie der Marker-Loci (Nei's gene diversity (H_e)), welche als Maß für die genetische Diversität benutzt wird, und den Prozentsatz der polymorphen Loci (PLP) (VEKEMANS 2002). Als Grundlage diente für AFLPsurv die 0/1-Matrix, welche nach der Gelelektrophorese manuell in eine Excel-Tabelle übertragen wurde. Die entstandenen 0/1-Matrizen der ISSR- und der AFLP-Methoden befinden sich im Anhang.

GenAlEx ist ein „Add on“ für Excel und beinhaltet eine Menge populationsgenetischer Optionen, wie frequenzbasierende (F-Statistik, Heterozygotie, Populationszuordnungen) und distanzbasierende Analysen (AMOVA, PCoA, Manteltest) (PEAKALL & SMOUSE 2006). Für die Untersuchungen an den Proben von *C. calceolus* wurde aus dem Add on die PCoA

(Principal Coordinates Analysis) benutzt, womit prozentuale Variationen zwischen vorher bestimmten Gruppen ermittelt werden können. Dazu wurden alle Proben in 7 Regionen (und nicht in einzelnen Populationen), wie im Ergebnisteil zu sehen, unterteilt, weil sonst die Populationen mit nur einer Probe in der Berechnung von GenAlEx nicht berücksichtigt werden. Das Ergebnis der Auswertung wurde in Excel 07 grafisch dargestellt. Anhand der grafischen Darstellung können Rückschlüsse gezogen werden, in wie weit die einzelnen Individuen in den einzelnen Regionen Gemeinsamkeiten oder Unterschiede bzw. Zugehörigkeiten bilden. Als Grundlage diente auch hier die entstandenen 0/1-Matrizen der ISSR- und der AFLP-Methoden, die im Anhang zu finden sind.

ARLEQUIN ist in der Populationsgenetik ein statistisches Analyseprogramm mit vielen Funktionen, welches auf große Datenmengen ausgerichtet ist, um Informationen über genetische und demografische Merkmale der gesammelten Proben zu erhalten (EXCOFFIER & LISCHER 2010). Eines dieser Funktionen von ARLEQUIN ist die AMOVA (analysis of molecular variance), ein statistisches Verfahren basierend auf Varianzanalysen von Genfrequenzen zur Untersuchung von populationsgenetischen Strukturen unter Berücksichtigung der Anzahl von Mutationen zwischen molekularen Haplotypen (EXCOFFIER et al. 1992) (individuen-, populations- oder artspezifische Nukleotidsequenzvarianten in einem bestimmten Chromosomenabschnitt, in der mitochondrialen oder plastidären DNA (STORCH et al. 2013)). Die Varianzanalysen erlauben durch einen paarweisen Vergleich der Proben eine Partitionierung der genetischen Variationen auf Individuenebene (innerhalb der Populationen (F_{ST})), Populationsebene (zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen (F_{SC})) und Regionenebene (zwischen den Gruppen (F_{CT})). Die berechneten F_{ST} -, F_{SC} - und F_{CT} -Werte befinden sich stets im Bereich von 0 – 1, wobei 0 keine genetischen Unterschiede zwischen Proben bzw. keine unterschiedlichen Haplotypen und 1 den höchsten Grad der Differenzierung aufzeigt (WRIGHT 1978). Die Signifikanz wurde unter Verwendung von 10000 Permutationen (beinhaltet Randomisierungstests, exakte Tests) ermittelt. Als Grundlage diente auch hier die 0/1-Matrix, wobei die Matrix für die AMOVA in ARLEQUIN speziell formatiert werden musste (Anhang). Die AMOVA in ARLEQUIN wurde aufgrund eines höheren Informationsgehalts der Ergebnisse, im Gegensatz zu anderen Statistikprogrammen, für die Auswertung ausgewählt.

R ist eine Programmiersprache für statistischen Berechnungen mit zahlreichen Grafiken und Werkzeugen zur Datenanalyse, welche durch Schreiben von Funktionen und Paketen erweitert

werden kann (DIXON 2003). Eines dieser Pakete ist das, für Ökologen nützliche und auf große Datenmengen ausgerichtete, 'vegan' Packet (OKSANEN et al. 2008), was neben diversen Funktionen auch einen Manteltest, mit dem eine Bearbeitung von Distanzmatrizen möglich ist, beinhaltet (DIXON 2003). Mit einem Manteltest kann die Korrelation zwischen genetischen und geografischen Daten ermittelt werden unter Verwendung einer genetischen und einer geografischen Distanzmatrix (Anhang), um eine möglicherweise vorhandene Isolation von Populationen aufgrund der Distanz beurteilen zu können (DINIZ-FILHO et al. 2013). Als Grundlage dienten hierbei die genetische Distanzmatrix der AFLPsurv-Analyse (ermittelte „pairwise F_{ST} -Werte“) und die geografische Distanzmatrix, die mit GenAlEx angefertigt wurde (Anhang). Die Signifikanz wurde unter Verwendung von 999 Permutationen ermittelt.

Mittels der Software STRUCTURE Version 2.3.3 (PRITCHARD et al. 2000) wurde die genetische Zugehörigkeit der Proben zu genetischen Clustern anhand des Genotyps ohne eine vorher vorgegebene Zuordnung in Regionen oder Populationen untersucht.

„Dabei werden in mehreren Wiederholungen die Zuordnungswahrscheinlichkeiten jedes Individuums zu jedem Cluster ermittelt sowie eine Gesamtwahrscheinlichkeit P für jede vorgegebene Anzahl K von Clustern.“ (LIESEBACH 2012) (10 Wiederholungen pro Lauf für jeden ausgewählten Cluster ($K = 1 - 34$), 100 000 MCMC (Markov-Chain-Monte-Carlo-Verfahren (Algorithmen, die Stichproben aus Wahrscheinlichkeitsverteilungen ziehen))). Die Identifizierung des wahrscheinlichsten K , delta K (EVANNO et al. 2005), wurde mit STRUCTURE HARVESTER bestimmt (EARL & VONHOLDT 2012). Anhand der Daten wurden die entsprechenden Diagramme mit DISTRUCT dargestellt (ROSENBERG 2004). Als Grundlage diente auch hier die 0/1-Matrix.

Für die Auswertung der genannten Programme wurden die Daten der ISSR- sowie der AFLP-Analyse unter den angegebenen Bedingungen verwendet.

2.3 Samenentnahme

Die Auswahl der Population (Tabelle 1) für die Samenentnahme erfolgte nach zwei Kriterien. Zum einen musste die Population samenstark sein, d.h. es mussten im Jahr der Samenentnahme mindestens 5 Kapseln entwickelt sein. Zum anderen durften die Kapseln nicht vollständig ausgereift sein, d.h. wenn möglich sollten die Kapseln im grünen unreifen Stadium gesammelt werden (mündl. Mitteilung von Herrn Keller). Nach diesen Kriterien konnte im Jahr 2013 nur eine Population für die Samenentnahme aus dem MTB 5525 herangezogen werden.

Wie schon bei der Blattentnahme unter 2.2 beschrieben, können die genauen Koordinaten des besammelten Gebietes in dieser Arbeit leider nicht öffentlich zur Verfügung gestellt werden. Die genauen Koordinaten sind aber im Rahmen der Dissertation punktgenau bekannt.

2.3.1 Herstellung des Aussaatmediums

Das Substrat für die Aussaat der Frauenschuh samen setzt sich aus einem Aussaatmedium, einer Spurenelementlösung und einer weiteren Zutatenliste zusammen, die im Folgenden erläutert werden.

Das Aussaatmedium (CaCO_3 , Masse: 40,485 g) wurde mit 1,8 Liter destilliertem Wasser mit einem Pürierstab solange gemixt bis alle groben Teile verschwunden waren. Die entstandene Lösung wurde auf 50 °C erhitzt.

Tabelle 18: Spurenelementlösung nach NITSCH & NITSCH (1969).

Zutat	Menge (auf 1L H ₂ O dest.)
H ₂ SO ₄ spez.Dichte 1,84	0,5 ml
MnSO ₄	2,2 g
ZnSO ₄	0,5 g
H ₃ BO ₃	0,5 g
CuSO ₄	0,016 g
Na ₂ MoO ₄	0,025 g
CoCl ₂	0,046 g

Es wurden 2 ml der zusammengestellten Spurenelementlösung (NITSCH & NITSCH 1969) (Tabelle 18) zu den 1,8 Liter der Lösung pipettiert (mündl. Mitteilung von Herrn Keller). Danach wurde der pH-Wert auf 5,8 justiert. Die Lösung mit den Spurenelementen wurde erhitzt bis der Agar aufgelöst war. Nach Aufteilung der Lösung in kleinere Gefäße erfolgte die Sterilisation mittels Autoklav (Tuttnauer 2540EL, Programm: Festkörper bei 120°C für 20 min). Die sterile Lösung wurde jeweils auf ein Liter pro Gefäß aufgeteilt. Es wurden zwei verschiedene Lösungen hergestellt. Ein Liter wurde mit jeweils 150 mg Pepton und 1 g Aktivkohlepulver versetzt, wobei der andere Liter unbehandelt blieb. Beiden 1 Liter-Lösungen wurden nach MALMGREN (1992) BAP (Benzylaminopurin), Gibberellinsäure, Kokosnusswasser, Ananassaft und Kartoffel hinzugefügt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Zutatenliste verändert nach MALMGREN (1992)

Zutat	Menge (auf 1 L Medium)
BAP	0,5 ml
Gibberellinsäure	0,5 mg
Kokosnusswasser	50 ml
Ananassaft	20 ml
Kartoffel (püriert)	20 g

Nach Fertigstellung der beiden Lösungen erfolgte das Abfüllen der flüssigen Agarlösung in insgesamt 155 autoklavierte Tubes unter sterilen Bedingungen, wobei diese schräg aufgestellt wurden, damit mehr Oberfläche für die Samenaussaat entstand. Die Tubes wurden mit autoklavierten Deckeln verschlossen, nach 30 min war der Agar fest und erkaltet.

2.3.2 Verarbeitung der gesammelten Samenkapseln

Von *C. calceolus* wurden im Jahr 2013 zwei Kapseln gesammelt. Unter der Sterilbank wurden mit sterilen Pinzetten, Rasierklingen und Spatel die gesammelten Kapseln in einer autoklavierten Petrischale halbiert. Um die Anzahl der Keime auf der Kapsel zu reduzieren, wurden die Kapseln mehrmals mit Ethanol abgeflammt (PRENDERGAST 2010).

Die mit der Agarlösung vorbereiteten Tubes wurden geöffnet und die Samen darin sorgfältig verteilt. Alle Samen wurden an zwei Terminen innerhalb von zwei Wochen in insgesamt 94 Tubes gesät, wobei 47 Tubes davon Pepton und Aktivkohle enthielten.

Es erfolgte nach der Aussaat eine Aufteilung der Tubes in drei Kategorien. Jeweils ein Drittel der Tubes wurden bei 4°C, Raumtemperatur und bei konstanten 20°C (Inkubator Innova 4230, New Brunswick Scientific) gelagert und beobachtet. Die Tubes wurden stets vor Helligkeit geschützt aufgestellt, weil eine Keimung und Prothallenbildung mit Hilfe der Mykorrhizierung, unter Abwesenheit von Licht, im Boden stattfindet.

3 Ergebnisse

In diesem Teil werden zuerst die Ergebnisse der Laborarbeit aus den Methoden ISSR, SRAP und AFLP, und danach die Ergebnisse der Samenaussaat vorgestellt.

3.1 Laborarbeit

3.1.1 Ergebnisse der Extraktion der Blattproben

Als Produkt der Extraktion zeigt Tabelle 20 die Mittelwerte und Standardabweichungen der DNA-Gehalte aus den 195 Blattproben der drei Samenregionen mittels NanoPhotometer. Bei der Extraktion der Blattproben wurden keine Veränderungen innerhalb des Protokolls vorgenommen. Eine Liste der Proben mit genauen Standortangaben und dem dazugehörigen DNA-Gehalt ist beim Hessischen Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG) in der Abteilung Naturschutz im Dezernat „Arten“ hinterlegt. Eine Liste ohne die genauen Standortangaben ist im Anhang einsehbar.

Tabelle 20: Übersicht über die Anzahl der Proben aus den Samenregionen und die dazugehörigen Mittelwerte der DNA-Gehalte (ng/μl) und Standardabweichungen

	Mittelwert DNA ng/μl	Standard- abweichung
Thüringen (30)	39.52	13.28824
Hessen (155)	45.68	15.16585
Rügen (10)	70.25	30.49249

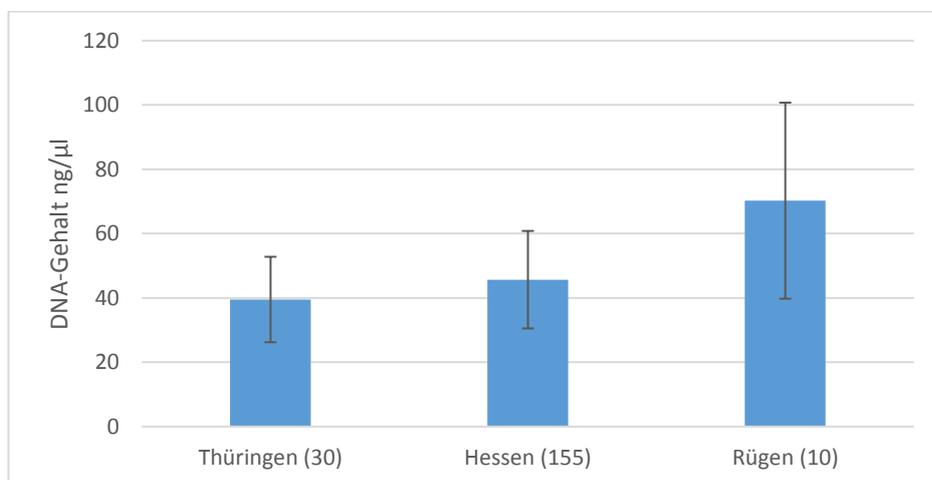


Abbildung 14: Grafische Darstellung der Probenanzahl aus den drei unterschiedlichen Regionen und die dazugehörigen Mittelwerte der DNA-Gehalte (ng/μl) mit der jeweiligen Standardabweichung

Die Tabelle 20 zeigt, dass bei den 155 Proben aus Hessen ein durchschnittlicher DNA-Gehalt von 45,7 ng/µl gemessen wurde. Die 30 Proben aus Thüringen ergaben einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 39,5 ng/µl und die 10 Proben von Rügen einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 70,3 ng/µl, wobei bei den Rügener Populationen die Standardabweichung den höchsten Wert ergab (Abbildung 14).

3.1.2 Ergebnisse der ISSR

Für die Darstellung der PCR-Produkte der ISSR-Methode wurde die Gel-Elektrophorese benutzt. Weil nicht alle entstandenen Gele der fünf Primer mit je 195 Proben abgebildet werden können, zeigen die nächsten Abbildungen für jeden Primer jeweils ein ausgewähltes Gel mit nur wenigen Proben nach der Optimierungsphase. Die Gelausschnitte zeigen deutlich, dass sowohl Gemeinsamkeiten und Unterschiede der verschiedenen Primer in der ISSR-Methode aufgezeigt werden können. Der Marker (M) für die Größeneinteilung findet sich jeweils links und rechts sowie in der Mitte der Gele. Mit den fünf Primer der ISSR-Methode konnten insgesamt 60 auswertbare Eigenschaften/Loci aus 195 Proben in 34 Populationen ermittelt werden.



Abbildung 15: Ergebnis des ISSR-Primer I-12 nach der Gelelektrophorese. Gel mit den Proben 1 – 33 (1 – 30: Thüringische Populationen, 31 – 33: Hessische Populationen), an denen der ISSR-Primer I-12 angewendet wurde, mit Marker (M). Zu sehen sind eindeutige Unterschiede in der Anzahl der Banden zwischen den einzelnen Proben.

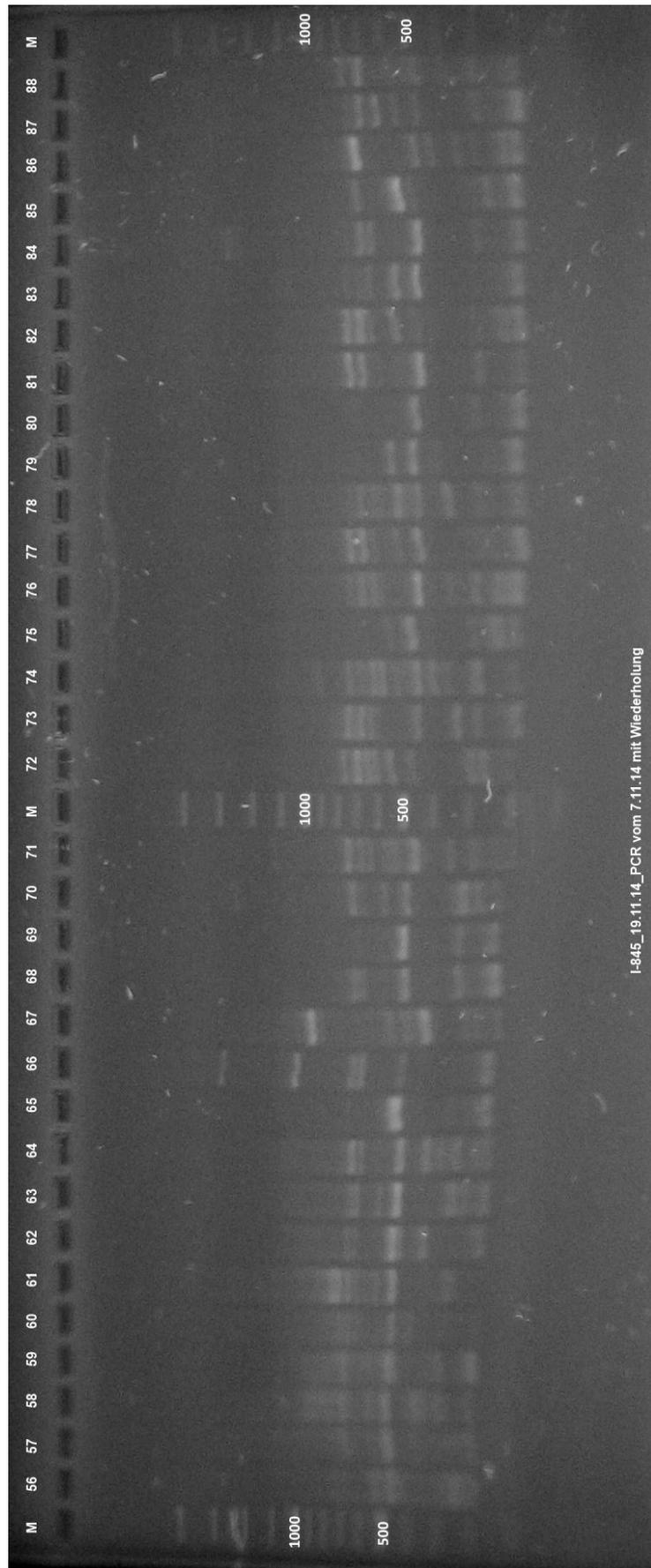


Abbildung 16: Ergebnis des ISSR-Primer I-845 nach der Gelelektrophorese. Gel mit den Proben 56 – 88 (Hessische Populationen), an denen der ISSR-Primer I-845 angewendet wurde, mit Marker (M). Zu sehen sind eindeutige Unterschiede in der Anzahl der Banden zwischen den einzelnen Proben.

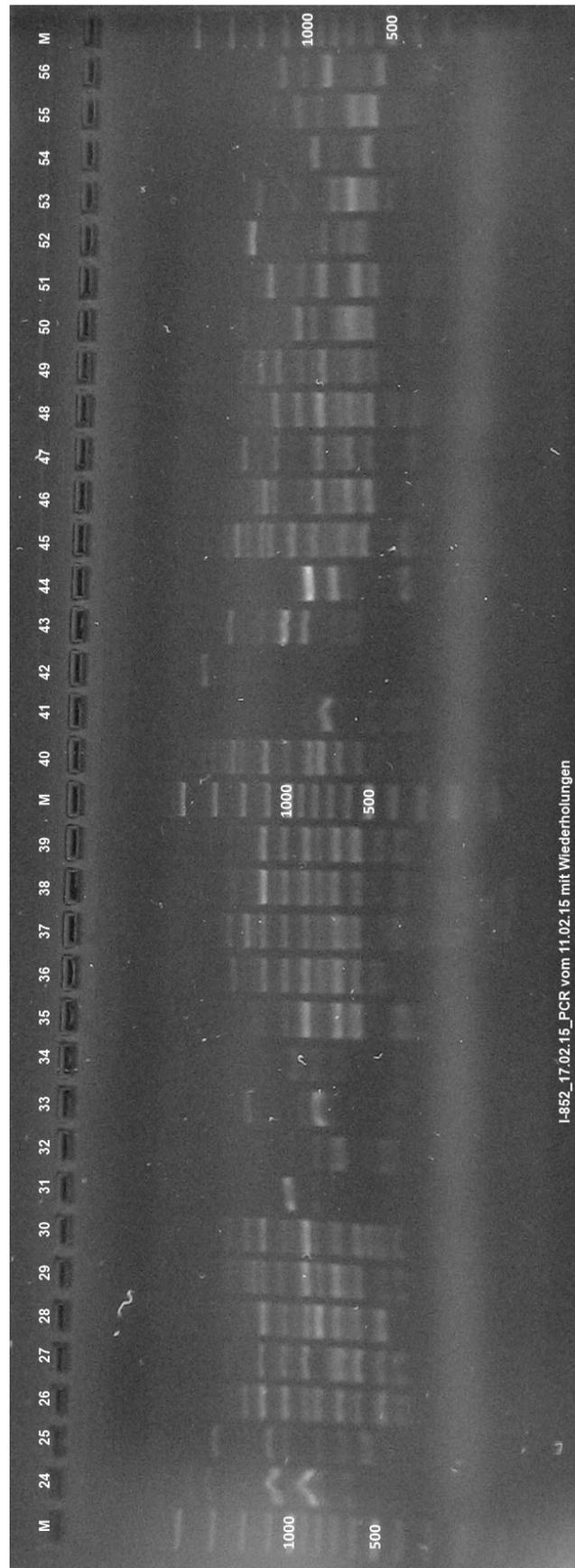


Abbildung 17: Ergebnis des ISSR-Primer I-852 nach der Gelelektrophorese. Gel mit den Proben 24 – 56 (24 – 30: Thüringische Populationen, 31 – 56: Hessische Populationen), an denen der ISSR-Primer I-852 angewendet wurde, mit Marker (M). Zu sehen sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Anzahl der Banden zwischen den einzelnen Proben.

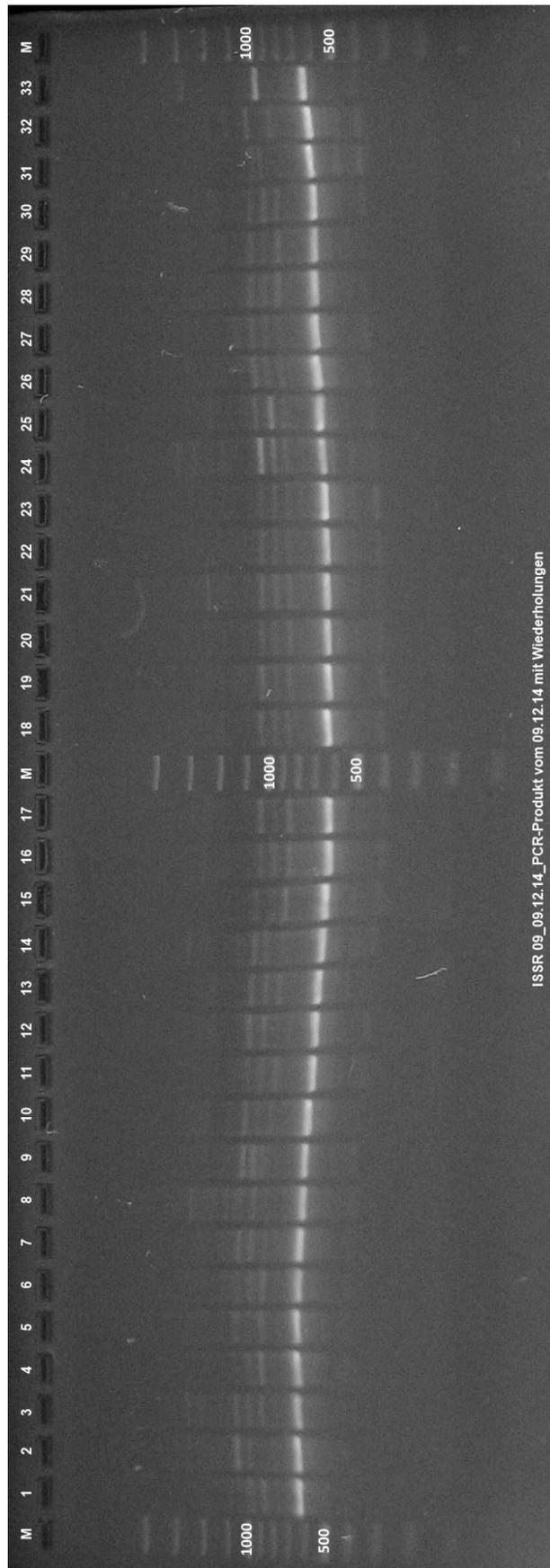


Abbildung 18: Ergebnis des ISSR-Primer ISSR 09 nach der Gelelektrophorese. Gel mit den Proben 1 – 33 (1 – 30: Thüringische Populationen, 31 – 33: Hessische Populationen), an denen der ISSR-Primer ISSR 09 angewendet wurde, mit Marker (M). Eindeutig sichtbar sind bei dem ISSR-Primer ISSR 09 die Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Proben.

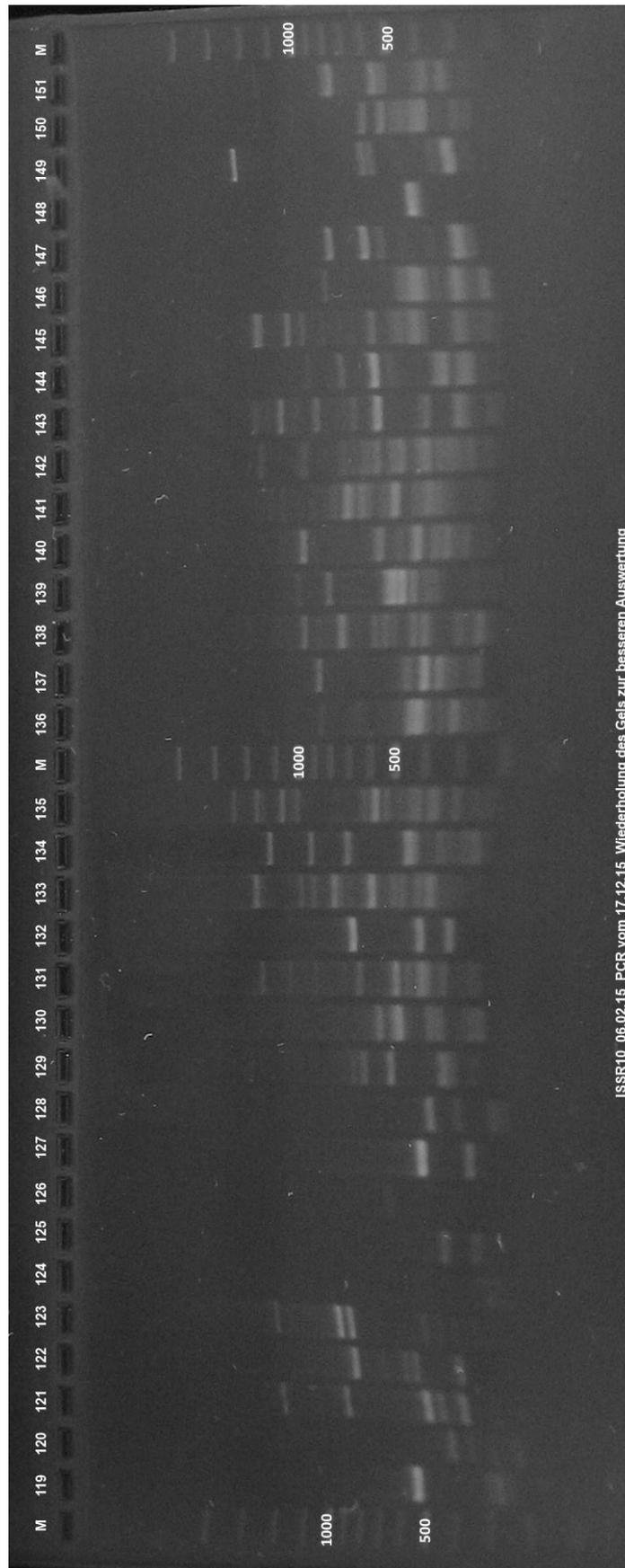


Abbildung 19: Ergebnis des ISSR-Primer ISSR 10 nach der Gelelektrophorese. Gel mit den Proben 119 – 151 (Hessische Populationen), an denen der ISSR-Primer ISSR 10 angewendet wurde, mit Marker (M). Bei den meisten Proben sind eindeutige Banden zu erkennen, wobei auch bei einigen Proben wenige oder keine Banden sichtbar sind.

3.1.2.1 Statistische Auswertung ISSR

Nach einer Zusammenfassung standen für die statistische Auswertung aus den Daten der fünf ISSR-Primer 60 auswertbare Eigenschaften/Loci aus 195 Proben in 34 Populationen zur Verfügung.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Auswertung der ISSR-Daten mit den Statistikprogrammen AFLPsurv, Arlequin, GenAlEx, R und STRUCTURE dargestellt.

Die nachstehenden zwei Tabellen zeigen die Ergebnisse des Statistikprogrammes „AFLPsurv“.

Tabelle 21: Daten der ISSR-Methode aus AFLPsurv der untersuchten Populationen, ihre Anzahl an untersuchten Proben (n), Gesamtzahl der Loci (#loc.), Anteil an polymorphen Loci (PLP) und die Nei's gene Diverstität (Hj) (Lynch & Milligan method)

Population	n	#loc.	PLP	Hj
1	15	60	66.7	0.19483
2	15	60	70.0	0.22844
3	12	60	56.7	0.19109
4	17	60	55.0	0.18810
5	9	60	48.3	0.20000
6	4	60	100.0	0.31374
7	10	60	51.7	0.20436
8	2	60	100.0	0.36382
9	2	60	100.0	0.39411
10	16	60	55.0	0.16976
11	6	60	100.0	0.25712
12	6	60	100.0	0.24652
13	7	60	100.0	0.21427
14	6	60	100.0	0.20843
15	3	60	100.0	0.32958
16	1	60	100.0	0.48208
17	5	60	100.0	0.26661
18	1	60	100.0	0.47521
19	1	60	100.0	0.48667
20	2	60	100.0	0.39882
21	2	60	100.0	0.39032

Population	n	#loc.	PLP	Hj
22	12	60	55.0	0.21005
23	2	60	100.0	0.40086
24	2	60	100.0	0.38654
25	12	60	50.0	0.21364
26	2	60	100.0	0.37477
27	1	60	100.0	0.48438
28	2	60	100.0	0.40005
29	3	60	100.0	0.33289
30	1	60	100.0	0.46833
31	2	60	100.0	0.42021
32	2	60	100.0	0.41355
33	10	60	60.0	0.24116
34	2	60	100.0	0.38070

Tabelle 22: Populationsgenetische Strukturen mit ihrer Anzahl Populationen (n), der gesamten genetischen Diversität (Ht), dem Durchschnittswert (Hw) der Nei's gene Diversität (Hj), dem Standardfehler (S.E), der Varianz (Var) und dem Wert der Differenzierung (F_{ST}) (Lynch & Milligan method)

n	Ht	Hw	Hb	F _{ST}
34	0,3252	0,3215	0,0037	0,0112
S.E.		0,017978	0,004526	1,220527
Var		0,000323	0,00002	1,489687

Die beiden Tabellen zeigen zum einen die einzelnen Populationen mit ihrer Anzahl an untersuchten Proben (n), der Gesamtzahl der Loci (#loc.), dem Anteil an polymorphen Loci (PLP) und der „Nei's gene diversity“-Konstante (Hj). Und zum anderen die populationsgenetischen Strukturen mit ihrer Anzahl an untersuchten Populationen (n), der gesamten genetischen Diversität (Ht), dem Durchschnittswert (Hw) der Nei's gene Diversität (Hj), dem Standardfehler (S.E), der Varianz (Var) und dem Wert der Differenzierung (F_{ST}). In Tabelle 21 ist zu sehen, dass die Populationen mit einer Anzahl an Proben von 1 – 7 immer 100% Anteil an polymorphen Loci (PLP) aufweisen. Die restlichen Populationen variieren zwischen 48% und 70% Anteil an polymorphen Loci (PLP). Der F_{ST}-Wert liegt bei 0,0112 (Tabelle 22) und zeigt damit, dass eine geringe genetische Differenzierung zwischen den 34

Populationen vorhanden ist. Diese Statistik basiert auf 500 zufälligen Permutationen von Individuen zwischen den Populationen.

Die nachstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse der AMOVA des Statistikprogramms „Arlequin“.

Tabelle 23: Ergebnisse der AMOVA des Statistikprogramms Arlequin in den untersuchten Gruppen, deren Prozentsatz an Variationen, deren Wert der Differenzierung (F_{ST}) und ihren P-Werten.

Source of variation	d.f.	Variance components	Percentage of variation	F_{ST}	P-value
Among groups	6	0,23647	3,43	0,03426	< 0,05
Among populations within groups	27	1,11148	16,11	0,16677	< 0,05
within populations	161	5,55335	80,47	0,19532	< 0,05
Total	194	6,9013			

Die Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse der AMOVA des Statistikprogramms Arlequin in den untersuchten Gruppen, deren Prozentsatz an Variationen, deren Wert der Differenzierung (F_{ST}) und ihren P-Werten. Nach HOLSINGER & WEIR (2009) reicht der F_{ST} -Wert von 0 – 1, wobei 0 keine Differenzierung und 1 eine vollständige Differenzierung darstellt. Ein F_{ST} -Wert im Bereich von 0,00 – 0,05 zeigt eine geringe Differenzierung, ein F_{ST} -Wert im Bereich von 0,05 – 0,15 eine moderate Differenzierung und ein F_{ST} -Wert > 0,15 zeigt ein hohes Maß an Differenzierung. Zu sehen ist, dass der F_{ST} -Wert zwischen den Regionen eine geringe genetische Differenzierung ($F_{ST}=0,03426$) sowie zwischen den Populationen innerhalb der Regionen ($F_{ST}=0,16677$) und innerhalb der Populationen ($F_{ST}=0,19532$) eine große genetische Differenzierung aufweist. Es konnten in den, mit der AMOVA untersuchten, drei Gruppen signifikante Werte ($p < 0,05$) ermittelt werden.

Die nachstehende Abbildung zeigt das Ergebnis der PCoA des Statistikprogrammes „GenAlEx“.

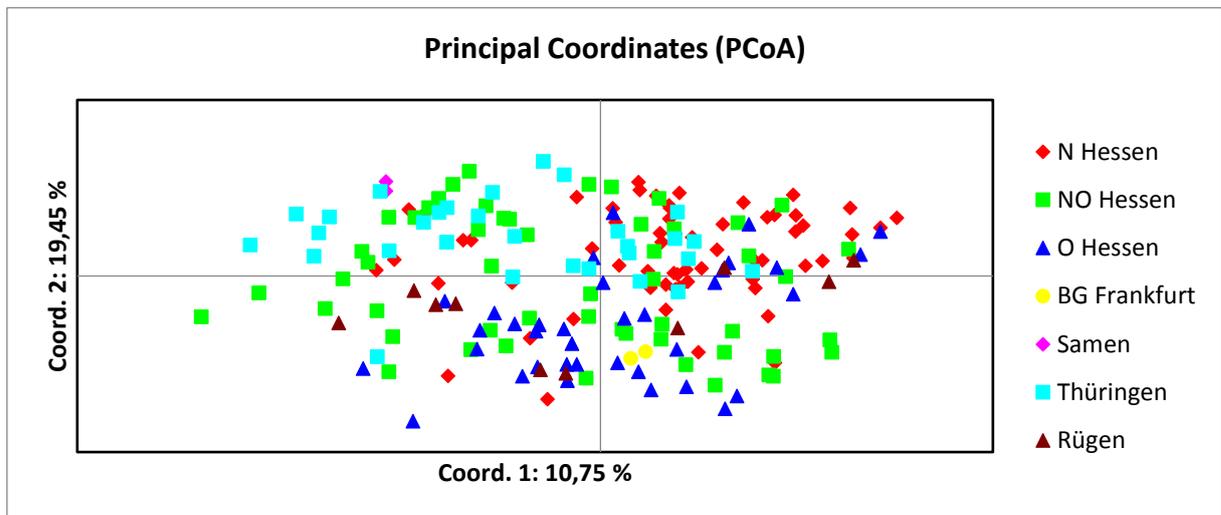


Abbildung 20: Principal Coordinates Analysis (PCoA) aus GenAlEx. Die 195 Proben wurden in die 7 Regionen Nord-, Nordost-, Ost-Hessen, Botanischen Garten Frankfurt, Ort der Samenentnahme, Thüringen und Rügen gegliedert.

Die Abbildung 20 präsentiert das Produkt der PCoA aus GenAlEx als grafische Darstellung in Excel 2007. Es ist zu sehen, dass für die PCoA die Daten der Proben nicht in Populationen, sondern in Regionen, wobei Hessen in die Himmelsrichtungen Nord-, Nordost- und Ost-Hessen, unterteilt wurde. Eine weitere Einordnung erfolgte in die Proben aus dem Botanischen Garten Frankfurt, dem Ort der Samenentnahme, und natürlich Thüringen und Rügen.

Diese Einteilung wurde vorgenommen, damit alle Populationen mit nur einer untersuchten Probe nicht aus der Bewertung herausfallen. Laut der PCoA von GenAlEx ist eine homogene Verteilung der Proben der sieben Regionen ohne etwaige Differenzierungen zu erkennen.

Die nachstehende Tabelle und Abbildung zeigen das Ergebnis des Manteltests des Statistikprogrammes „R“.

Tabelle 24: Ergebnisse des Manteltests mit R. Zu sehen ist der Wert des Manteltest und das Signifikanzniveau.

Mantel statistic r:	0,04189
Significance:	0,39

Laut des Manteltests in R aus Tabelle 24 und der Abbildung 21 ergibt sich mit $r = 0,041$ keine Korrelation zwischen genetischer und geografischer Distanz. Bei einem Wert von $r = 0$ ist keine

Korrelation vorhanden, bei einem Wert von $r = 1/-1$ wäre eine Korrelation zwischen genetischer und geografischer Distanz vorhanden. Es konnte mit den ISSR-Daten im Manteltest von R jedoch kein signifikanter Wert ($p > 0,05$) ermittelt werden.

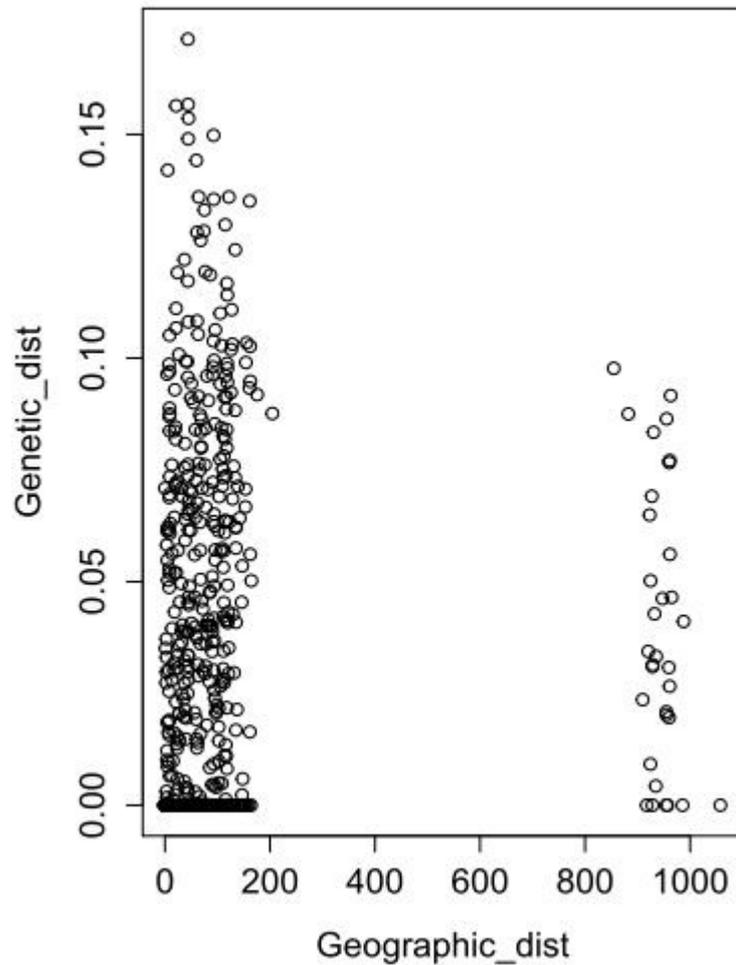


Abbildung 21: Korrelation ($r = 0,041$) zwischen genetischer und geografischer Distanz der 34 Populationen aus der ISSR-Methode.

Die nachstehenden Abbildungen zeigen das Ergebnis des Statistikprogrammes „STRUCTURE“.

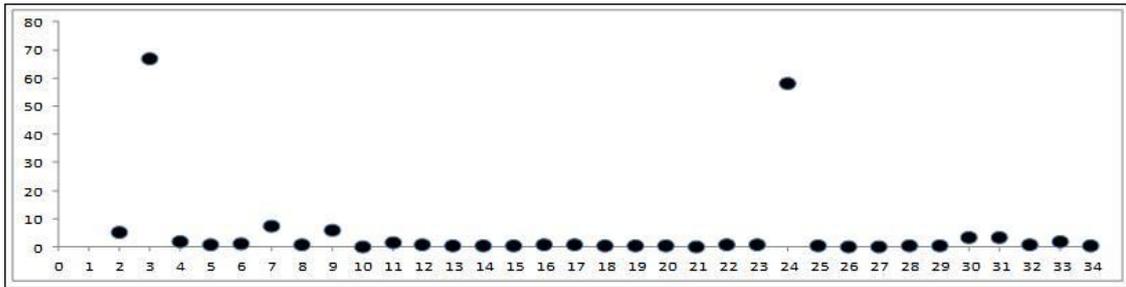


Abbildung 22: Korrektur nach Evanno mit dem Programm STRUCTURE HARVESTER. Auf der X-Achse ist die Anzahl K ($K = 34$ (ergibt sich aus der Annahme von 34 unterschiedlichen Populationen)) und auf der Y-Achse ist Delta K (wahrscheinlichstes K, welches die Populationsstruktur der 195 Proben wiedergeben soll) aufgelistet. Die Analyse ergab mit den Daten der ISSR-Methode $K = 3$ als wahrscheinlichste Cluster.

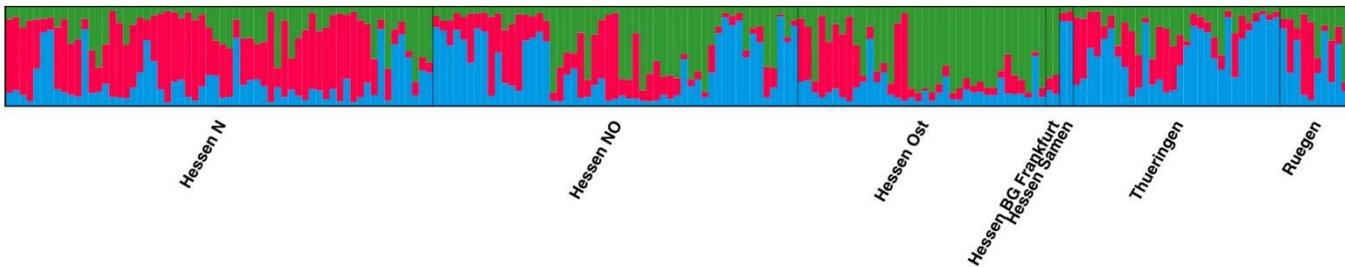


Abbildung 23: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Cluster-Analyse ($K = 3$ (zu sehen in den Farben blau, rot und grün)) basierend auf den Daten der ISSR-Methode für *C. calceolus*. Zu sehen sind die 195 Proben (jede Probe wird durch eine einzelne Säule veranschaulicht), die in die 7 Regionen aufgeteilt sind (durch vertikale schwarze Linien getrennt), wobei zwischen den Regionen keine deutlichen, regionenspezifischen Genotypen erkennbar sind. Dargestellt mit Distruct (ROSENBERG 2004).

Die Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen das Ergebnis der Korrektur nach Evanno mit dem Programm STRUCTURE HARVESTER nach der Cluster-Analyse einen Wert für $K = 3$. Zu sehen sind die Anzahl K bzw. 195 Proben (X-Achse) (jede Probe wird durch eine einzelne Säule veranschaulicht), die in die 7 Regionen aufgeteilt sind (durch vertikale schwarze Linien getrennt). Nach Betrachtung der einzelnen Proben der ISSR-Methode lässt sich keine Einteilung der Proben in die 7 Regionen erkennen und demnach sind keine deutlichen, regionenspezifischen Genotypen zu identifizieren.

3.1.3 Ergebnisse der SRAP

Es wurden mit der SRAP-Methode 2 Primerkombinationen mit je 2 Primer, die in Tabelle 9 aufgelistet sind, getestet und optimiert.

Für die Darstellung der SRAP-PCR-Produkte wurde die Gelelektrophorese, wie in Kapitel 2.2.1.6 beschrieben, durchgeführt. Die Optimierung wurde in diesem Schritt abgebrochen, da die Erfolgsaussichten negativ aussahen. Es konnten keine deutlichen Banden in den einzelnen Proben erzielt werden. Die vorhandenen schwachen Banden sind sehr gleichmäßig und ohne Variationen in den Proben vorhanden und damit für eine Auswertung nicht geeignet. Erwartet wurden eindeutige, spezifischere Banden, aus denen eventuell Variationen zwischen den Populationen ermittelt werden können. Nach etlichen Versuchsreihen trat keine Verbesserung der Ergebnisse, wie in Abbildung 24 zu sehen, ein. Für weitere Auswertungen standen somit keine Ergebnisse der SRAP-Methode zur Verfügung.

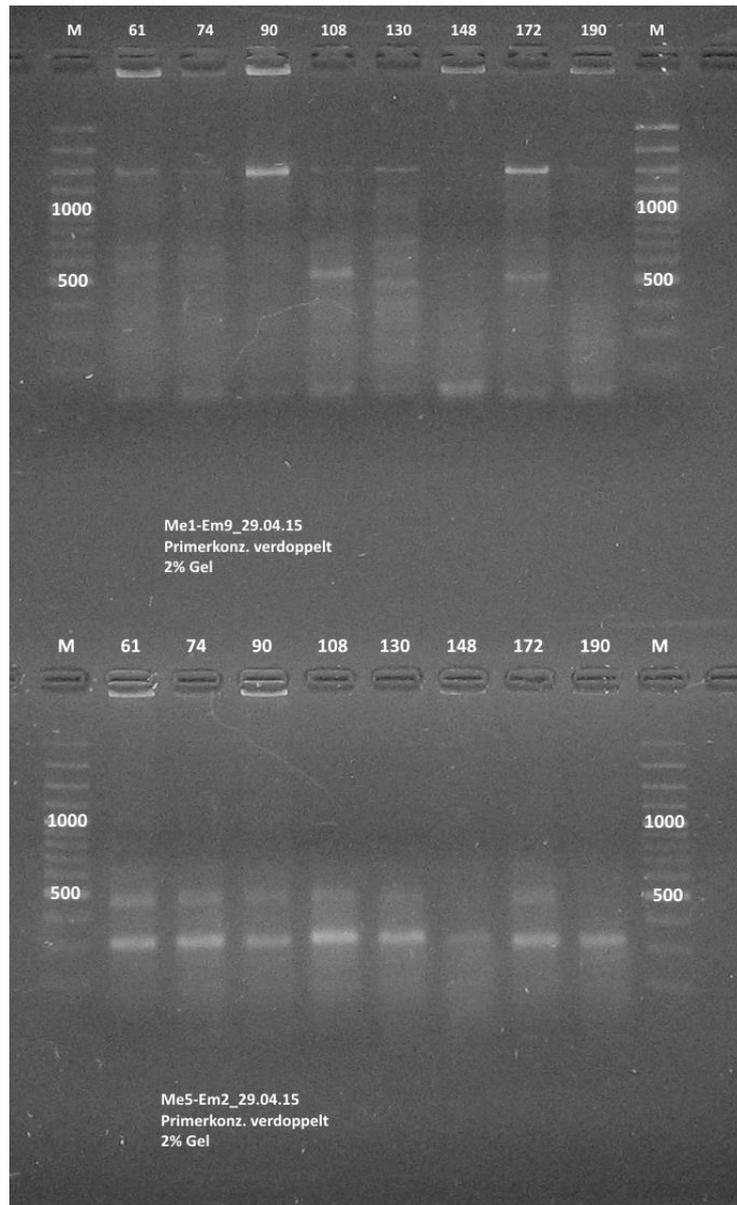


Abbildung 24: Ergebnis des SRAP-Primerkombinationen Me1-Em9 (oben) und Me5-Em2 (unten) nach der Gelelektrophorese. Gel mit den zufällig ausgewählten Proben 61, 74, 90, 108, 130, 148, 172 (Hessische Populationen), 190 (Rügener Population), an denen die SRAP-Primerkombinationen Me1-Em9 und Me5-Em2 angewendet wurden, mit Marker (M). Es konnten keine deutlichen Banden in den einzelnen Proben erzielt werden. Die vorhandenen schwachen Banden sind sehr gleichmäßig und ohne Variationen in den Proben vorhanden und damit für eine Auswertung nicht geeignet.

3.1.4 Ergebnisse der AFLP

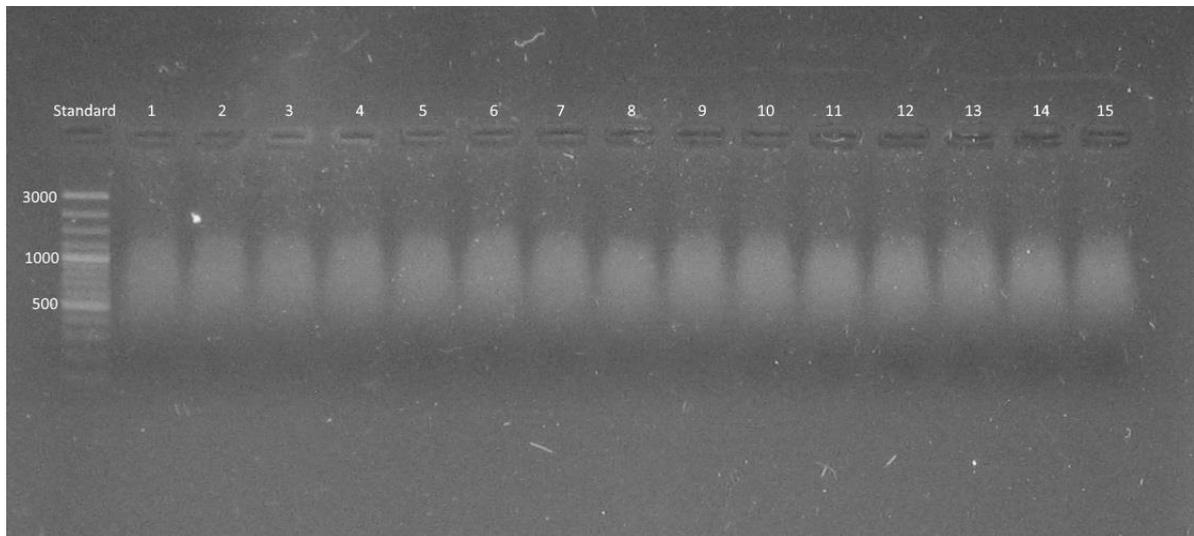


Abbildung 25: Überprüfung der *Cypridium*-Proben auf Probeninhalt mittels Gel-Elektrophorese nach der prePCR der AFLP-Methode mit der Primerkombination preNot1 und E03. Das DNA-Material (als undeutliche Wolken erkennbar) (Proben 1-15) liegt, laut Längenstandard (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific), zwischen 300 und 1200 bp.

Abbildung 25 zeigt die Überprüfung der *Cypridium*-Proben mittels Gel-Elektrophorese. Es wurde überprüft, ob die Amplifikation der DNA im Probeninhalt erfolgreich war. Wie in den 15 zufällig ausgesuchten Proben aller 195 untersuchten Proben zu sehen ist, war die DNA-Amplifikation erfolgreich. In den 15 Proben ist stets DNA-Material von 300 – 1200 bp als sogenannter „Schlier“ vorhanden. Nach der selektiver PCR wurden die Proben zur Analyse geschickt (LGC Forensics IfB LGC GmbH), worauf die Auswertung der Daten erfolgte.

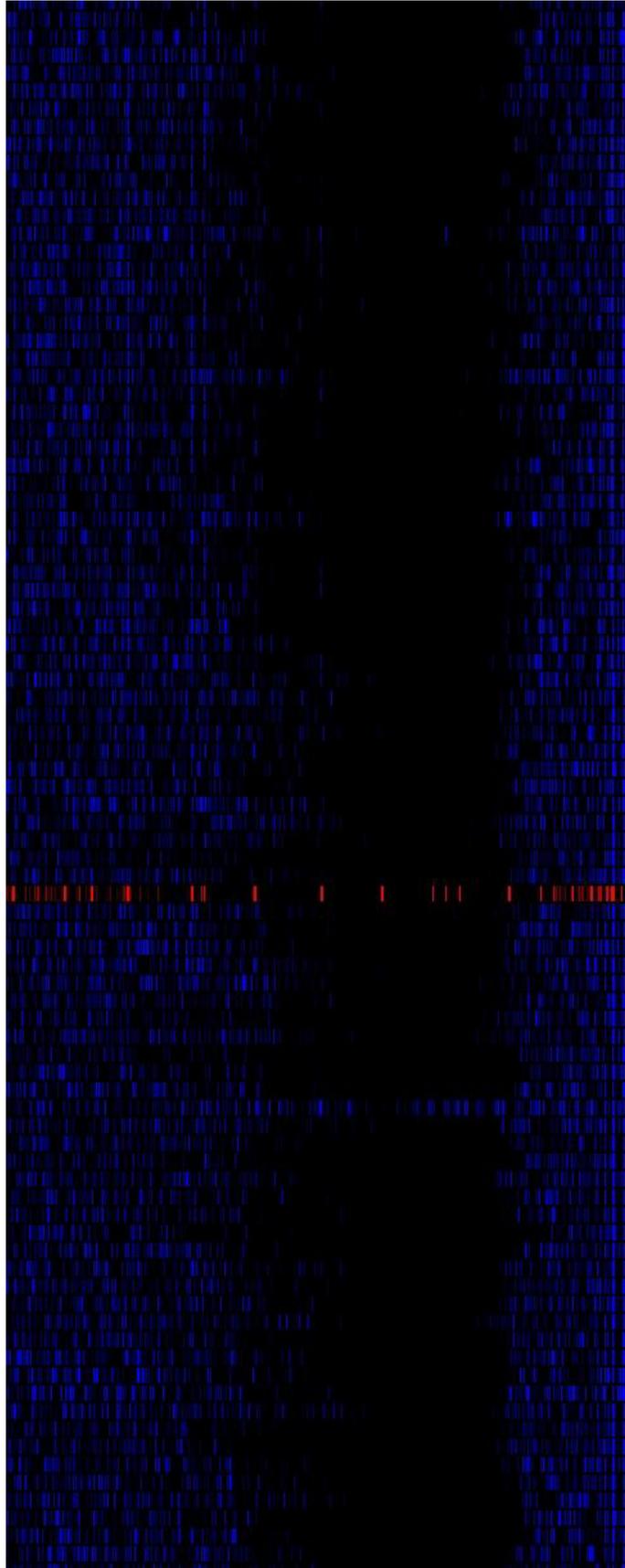


Abbildung 26: Ausschnitt (0 (unten)– 500 bp (oben)) von ca. 80 Proben mit ihren Banden des AFLP-Produkts aus Genographer. Die rotmarkierte Probe stellt den Standard dar.

Ein Beispiel eines Ausschnitts (0 – 500 bp) der Daten von ca. 80 Proben aus dem AFLP-Produkt aus Genographer ist in Abbildung 26 zu sehen. Die rotmarkierte Probe stellt den Standard dar. Zum einen befinden sich Banden (blau) von 0 – ca. 130 bp (unterer Bereich) und zum anderen von ca. 270 – 500 bp (oberer Bereich). Für die statistische Auswertung wurde aus dem AFLP-Produkt nur der Bereich von 300-500 bp analysiert um Fehler durch Primerdimere (häufig im Bereich von 0 – 130 bp) zu vermeiden.

Die Auswertung ergab, dass aus den Daten der 195 Proben in 34 Populationen (Hessen, Thüringen, Rügen) von *C. calceolus* mittels AFLP-Methode mit den Primerkombinationen preNot1 und E03 (prePCR) und selNot1 und E78 (selPCR) in Verbindung mit den Restriktionsenzymen Not1 und Eco RI (Restriktion) und den Primeradaptern Not1+ und EA +/- (Ligation) 810 auswertbare Eigenschaften hervorgegangen sind.

3.1.4.1 Statistische Auswertung AFLP

Diese 810 Eigenschaften der 195 Proben wurden mittels der Statistikprogramme (Kapitel 2.2.1.7) analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Statistikprogramme aus der AFLP-Methode aufgezeigt.

Die nachstehenden zwei Tabellen zeigen die Ergebnisse des Statistikprogrammes „AFLPsurv“.

Tabelle 25: Daten der AFLP-Methode aus AFLPsurv der untersuchten Populationen, ihre Anzahl an untersuchten Proben (n), Gesamtzahl der Loci (#loc.), Anteil an polymorphen Loci (PLP) und die Nei's gene Diversität (Hj) (Lynch & Milligan method)

Population	n	#loc.	PLP	Hj
1	15	810	85.6	0.20317
2	15	810	90.4	0.21677
3	12	810	88.0	0.23434
4	17	810	93.2	0.21395
5	9	810	79.3	0.24308
6	4	810	100.0	0.32105
7	10	810	84.2	0.24005
8	2	810	100.0	0.37688
9	2	810	100.0	0.39879

Population	n	#loc.	PLP	Hj
10	16	810	91.2	0.21600
11	6	810	100.0	0.26760
12	6	810	100.0	0.27345
13	7	810	100.0	0.25138
14	6	810	100.0	0.26705
15	3	810	100.0	0.34230
16	1	810	100.0	0.46969
17	5	810	100.0	0.27708
18	1	810	100.0	0.47156
19	1	810	100.0	0.47394
20	2	810	100.0	0.37966
21	2	810	100.0	0.37806
22	12	810	85.9	0.22717
23	2	810	100.0	0.38268
24	2	810	100.0	0.37822
25	12	810	88.6	0.23156
26	2	810	100.0	0.38056
27	1	810	100.0	0.47071
28	2	810	100.0	0.39612
29	3	810	100.0	0.33804
30	1	810	100.0	0.47326
31	2	810	100.0	0.38979
32	2	810	100.0	0.39272
33	10	810	67.4	0.19311
34	2	810	100.0	0.38892

Tabelle 26: Populationsgenetische Strukturen mit ihrer Anzahl an untersuchten Populationen (n), der gesamten genet. Diversität (Ht), dem Durchschnittswert (Hw) der Nei's gene Diversität (Hj), dem Standardfehler (S.E), der Varianz (Var) und dem Wert der Differenzierung (F_{ST}) (Lynch & Milligan method)

n	Ht	Hw	Hb	F _{ST}
34	0,3203	0,3282	-0,0079	-0,0247
S.E.		0,015647	0,00245	0,301349
Var		0,000245	0,000006	0,090811

Die beiden Tabellen zeigen zum einen die einzelnen Populationen mit ihrer Anzahl an untersuchten Proben (n), der Gesamtzahl der Loci (#loc.), dem Anteil an polymorphen Loci (PLP) und der „Nei's gene diversity“-Konstante (H_j). Und zum anderen die populationsgenetischen Strukturen mit ihrer Anzahl an untersuchten Populationen (n), der gesamten genetischen Diversität (H_t), dem Durchschnittswert (H_w) der Nei's gene Diversität (H_j), dem Standardfehler (S.E), der Varianz (Var) und dem Wert der Differenzierung (F_{ST}). In Tabelle 25 ist zu sehen, dass die Populationen mit der Anzahl an Proben von 1 – 7 immer 100% Anteil an polymorphen Loci (PLP) aufweisen. In Tabelle 26 liegt der F_{ST} -Wert bei -0,0247 und zeigt damit, dass keine genetische Differenzierung vorhanden ist. Diese Statistik basiert auf 500 zufälligen Permutationen von Proben zwischen den Populationen.

Die nachstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse der AMOVA des Statistikprogrammes „Arlequin“.

Tabelle 27: Ergebnisse der AMOVA des Statistikprogramms Arlequin in den untersuchten Gruppen, deren Prozentsatz an Variationen, deren Wert der Differenzierung (F_{ST}) und ihren P-Werten.

Source of variation	Variance		Percentage of	F_{ST}	P-value
	d.f.	components	variation		
Among groups	6	0,18195	0,16	0,0016	> 0,05
Among population within groups	27	-0,49602	-0,44	-0,00436	> 0,05
Within populations	161	114,16118	100,28	-0,00276	> 0,05
Total	194	113,84711			

Die Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse der AMOVA des Statistikprogramms Arlequin in den untersuchten Gruppen, deren Prozentsatz an Variationen, deren Wert der Differenzierung (F_{ST}) und ihren P-Werten. Nach HOLSINGER & WEIR (2009) reicht der F_{ST} -Wert von 0 – 1, wobei 0 keine Differenzierung und 1 eine vollständige Differenzierung darstellt. Ein F_{ST} -Wert im Bereich von 0,00 – 0,05 zeigt eine geringe Differenzierung, ein F_{ST} -Wert im Bereich von 0,05 – 0,15 eine moderate Differenzierung und eine F_{ST} -Wert > 0,15 zeigt ein hohes Maß an

Differenzierung. Zu sehen ist, dass der F_{ST} -Wert zwischen den Regionen eine kleine genetische Differenzierung ($F_{ST}=0,0016$), zwischen den Populationen innerhalb der Regionen ($F_{ST}=-0,00436$) und innerhalb der Populationen ($F_{ST}=-0,00276$) keine genetische Differenzierung aufweist. Es konnten in den, mit der AMOVA untersuchten, drei Gruppen keine signifikante Werte ($p > 0,05$) ermittelt werden.

Die nachstehende Abbildung zeigt das Ergebnis der PCoA des Statistikprogrammes „GenAlEx“.

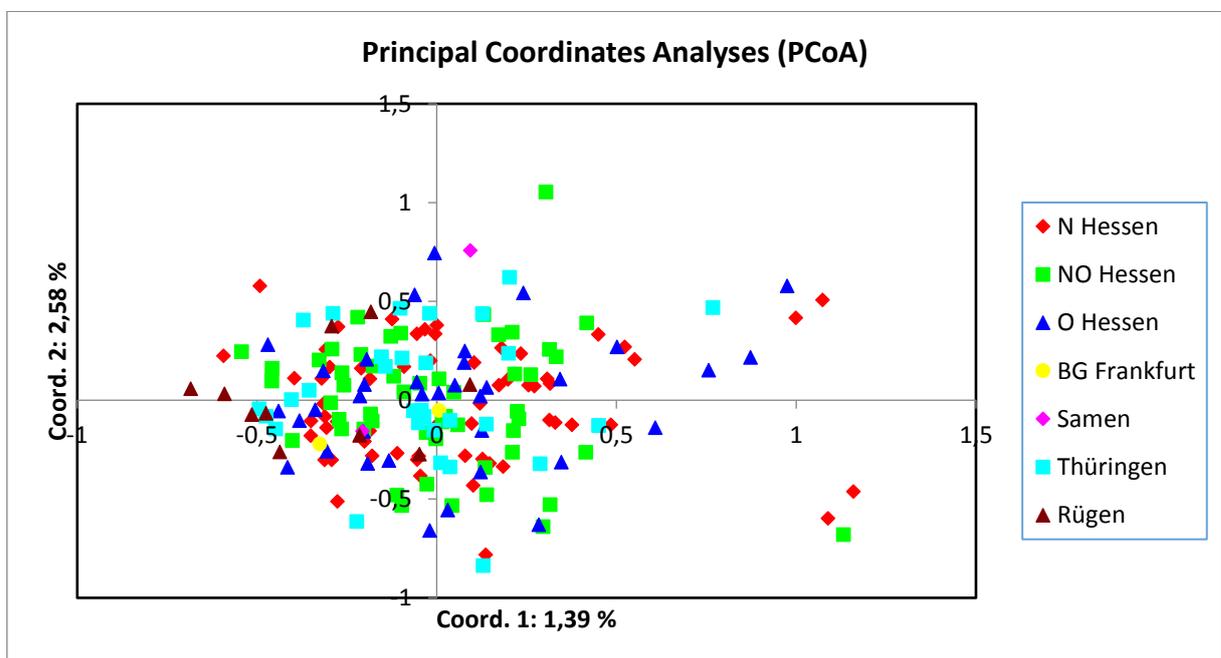


Abbildung 27: Principal Coordinates Analysis (PCoA) aus GenAlEx. Die 195 Proben wurden in die 7 Regionen Nord-, Nordost-, Ost-Hessen, Botanischen Garten Frankfurt, Ort der Samenentnahme, Thüringen und Rügen gegliedert.

In Abbildung 27 ist das Ergebnis der PCoA aus GenAlEx als grafische Darstellung gezeigt. Es ist zu sehen, dass für die PCoA die Daten der Proben nicht in Populationen, sondern in Regionen, wobei Hessen in die Himmelsrichtungen Nord-, Nordost- und Ost-Hessen, unterteilt wurde. Eine weitere Einordnung erfolgte in die Proben aus dem Botanischen Garten Frankfurt, dem Ort der Samenentnahme, Thüringen und Rügen.

Diese Einteilung wurde vorgenommen, damit alle Populationen mit nur einer untersuchten Probe nicht aus der Bewertung herausfallen. Laut der PCoA von GenAlEx ist eine homogene Verteilung der Proben der sieben Regionen ohne etwaige Differenzierungen zu erkennen.

Die nachstehende Tabelle und Abbildung zeigen das Ergebnis des Manteltests des Statistikprogrammes „R“.

Tabelle 28: Ergebnisse des Manteltests mit R. Zu sehen ist der Wert des Manteltests und das Signifikanzniveau.

Mantel statistic r:	0,2629
Significance:	0,01

Laut des Manteltest in R aus Tabelle 28 und der Abbildung 28 ergibt sich mit $r = 0,2629$ eine geringe Korrelation zwischen genetischer und geografischer Distanz. Bei einem Wert von $r = 0$ ist keine Korrelation vorhanden, bei einem Wert von $r = 1/-1$ wäre eine Korrelation zwischen genetischer und geografischer Distanz vorhanden. Es konnte mit den ISSR-Daten im Manteltest von R ein signifikanter Wert ($p < 0,05$) ermittelt werden.

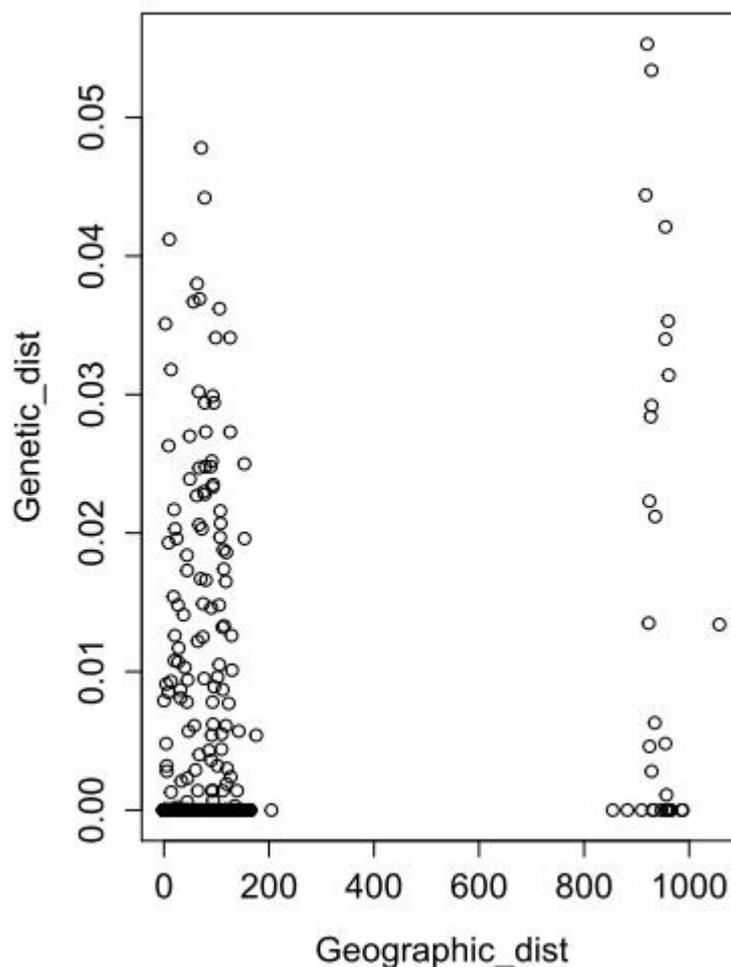


Abbildung 28: Korrelation ($r = 0,2629$) zwischen genetischer und geografischer Distanz der 34 Populationen aus der AFLP-Methode..

Die nachstehenden Abbildungen zeigen das Ergebnis des Statistikprogrammes „STRUCTURE“.

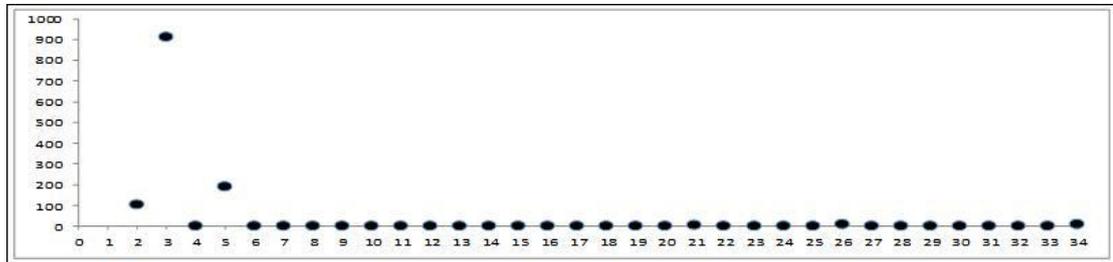


Abbildung 29: Korrektur nach Evanno mit dem Programm STRUCTURE HARVESTER. Auf der X-Achse ist die Anzahl K ($K = 34$ (ergibt sich aus der Annahme von 34 unterschiedlichen Populationen)) und auf der Y-Achse ist Delta K (wahrscheinlichstes K, welches die Populationsstruktur der 195 Proben wiedergeben soll) aufgelistet. Die Analyse ergab mit den Daten der AFLP-Methode $K = 3$ als wahrscheinlichste Cluster.

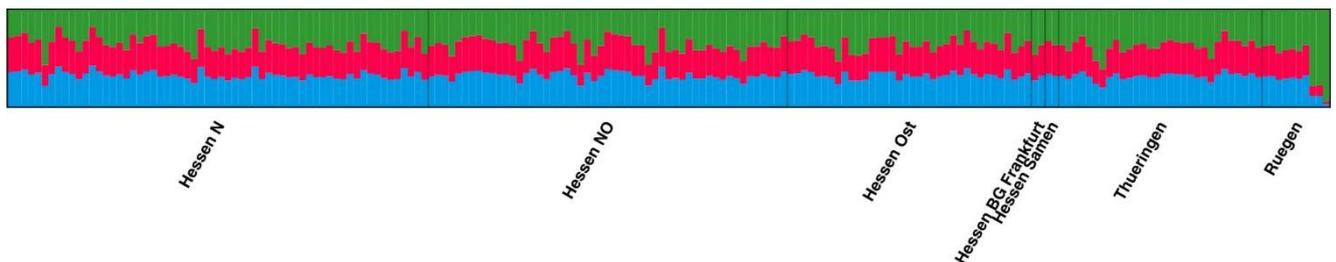


Abbildung 30 Grafische Darstellung der Ergebnisse der Cluster-Analyse ($K = 3$ (zu sehen in den Farben blau, rot und grün)) basierend auf den Daten der AFLP-Methode für *C. calceolus*. Zu sehen sind die 195 Proben (jede Probe wird durch eine einzelne Säule veranschaulicht), die in die 7 Regionen aufgeteilt sind (durch vertikale schwarze Linien getrennt), wobei zwischen den Regionen keine regionenspezifischen Genotypen erkennbar sind. Dargestellt mit Distruct (ROSENBERG 2004).

Die Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen das Ergebnis der Korrektur nach Evanno mit dem Programm STRUCTURE HARVESTER nach der Cluster-Analyse einen Wert für $K = 3$. Zu sehen sind die Anzahl K bzw. 195 Proben (X-Achse) (jede Probe wird durch eine einzelne Säule veranschaulicht), die in die 7 Regionen aufgeteilt sind (durch vertikale schwarze Linien getrennt). Nach Betrachtung der einzelnen Proben der AFLP-Methode lässt sich keine Einteilung der Proben in die 7 Regionen erkennen und demnach sind keine regionenspezifischen Genotypen zu identifizieren.

3.1.5 Vergleich der statistischen Auswertung der Daten der ISSR- und der AFLP-Methode

Bei einem direkten Vergleich der Tabelle 21 und Tabelle 25 ist ersichtlich, dass die H_j -Werte der 34 Populationen nahezu identisch sind sowie gleiche Höhen und Tiefen aufzeigen. Dass dies bei zwei unterschiedlichen Methoden als Resultat erzeugt wurde, zeigt, dass die Arbeit im Labor und die Auswertung der Daten wiederholbar sind.

Um die statistische Auswertung der Daten der ISSR- und AFLP-Methode übersichtlicher darzustellen, erfolgt im folgenden Abschnitt tabellarisch ein direkter Vergleich der verschiedenen Tests in den unterschiedlichen Statistikprogrammen.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass 60 Loci bei der ISSR-Methode und 810 Loci bei der AFLP-Methode aus 195 Proben in 34 Populationen als Ergebnis erzielt werden konnten. Vor diesem Hintergrund der unterschiedlichen Datengrundlage müssen die Ergebnisse der beiden Methoden betrachtet werden.

Zusammenfassend sagt die ISSR-Methode aus, dass die untersuchten Proben zwischen den Regionen eine kleine genetische Differenzierung aufweisen, wobei eine große genetische Differenzierung zwischen den Populationen innerhalb der Regionen und innerhalb der Populationen auftritt. Laut Manteltest in R gibt es keine Korrelationen zwischen der genetischen und geografischen Distanz.

Zusammenfassend für die AFLP-Methode ist zu sehen, dass die untersuchten Proben zwischen den Regionen eine kleine genetische Differenzierung aufweisen, wobei keine genetische Differenzierung zwischen den Populationen innerhalb der Regionen und innerhalb der Populationen auftritt. Laut Manteltest in R gibt es eine geringe Korrelation zwischen der genetischen und geografischen Distanz.

Tabelle 29: Übersicht der Ergebnisse der Methoden ISSR und AFLP

Statistikprogramm	ISSR-Methode (60 Loci)		AFLP-Methode (810 Loci)	
<u>AFLP</u>surv Differenzierung	$F_{ST} = 0,01$	kleine genet. Diff.	$F_{ST} = -0,02$	homogen
<u>Arlequin</u> <u>Amova</u> Differenzierung	Among groups: $F_{ST}:0,03$ $p < 0,05$	kleine genet. Diff. signifikant	Among groups: $F_{ST}:0,001$ $p > 0,05$	kleine genet. Diff. nicht signifikant
	Among Pops within groups $F_{ST}:0,16$ $p < 0,05$	große genet. Diff. signifikant	Among Pops within groups $F_{ST}:-0,004$ $p > 0,05$	homogen nicht signifikant
	Within Pops $F_{ST}:0,19$ $p < 0,05$	große genet. Diff. signifikant	Within Pops $F_{ST}:-0,002$ $p > 0,05$	homogen nicht signifikant
<u>GenAlEx</u> <u>PCoA</u>	nach 7 Regionen unterteilt	homogen	nach 7 Regionen unterteilt	homogen
<u>R</u> <u>Manteltest</u> Signifikanz	$r=0,041$ $p > 0,05$	keine Korrelation nicht signifikant	$r=0,262$ $p < 0,05$	geringe Korrelation signifikant
<u>Structure</u> Differenzierung	$K = 3$	kleine genet. Diff.	$K = 3$	homogen

3.2 Ergebnisse der Samenaussaat

Für die Samenaussaat können keine Ergebnisse geliefert werden, da nach der Aussaat nur eine Quellung der Samen (Abbildung 31), aber keine weitere Keimung in den Sterilröhrchen stattfand. Eine Fehlerbetrachtung folgt in dem entsprechenden Kapitel.



**Abbildung 31: Samen von *C. calceolus* (mit einem Binokular von Leica Z16 APO fotografiert)
(©Andreas Opitz)**

4 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Hypothesen aus dem einleitenden Teil aufgegriffen und diskutiert, danach wird aus den Diskussionsergebnissen als Fazit eine naturschutzfachliche Empfehlung formuliert.

Hypothese 1: Die hessischen Populationen von *C. calceolus* sind hoch divers, da sie am Rand des Verbreitungsareals liegen und als Vorpostenpopulationen Fragmentierung vom Gesamtareal erfahren.

Hypothese 2: Der Kontakt zwischen den hessischen und thüringischen Populationen hat zu einem genetischen Austausch und Homogenisierung der Bestände geführt, während hingegen die Rügener Population aufgrund der die natürlichen Ausbreitungsdistancen überschreitenden räumlichen Distanz isoliert, und damit genetisch eigenständig ist.

Fazit: Kann eine naturschutzfachliche Empfehlung gegeben werden, ob nur naheliegende Populationen für eine Populationsstärkung von *C. calceolus* verwendet werden können, um möglicherweise vorhandene und begonnene genetische Differenzierungsprozesse nicht zu verändern?

4.1 Hypothese 1:

Die hessischen Populationen von *C. calceolus* sind hoch divers, da sie am Rand des Verbreitungsareals liegen und als Vorpostenpopulationen Fragmentierung vom Gesamtareal erfahren.

Wie in meiner Hypothese behauptet und durch Untersuchungen an verschiedenen Pflanzenarten bereits mehrfach untermauert (BROWN et al. 1996, SAGARIN & GAINES 2002, ECKERT et al. 2008, SEXTON et al. 2009, HOU & LOU 2011), befindet sich der genetisch homogenere Pool durch ständigen genetischen Austausch im Zentrum eines Verbreitungsareals. Umso weiter man die Randbereiche des Verbreitungsareals betrachtet, umso diverser wird eine Art in ihrer genetischen Variabilität. Dies steht im Zusammenhang mit dem verringerten Austausch von genetischem Material mit weniger Individuen als im Zentrum eines Verbreitungsareals. In Randbereichen eines Verbreitungsareals treten öfter artspezifische, parapatrische (Prozess der Artbildung infolge von Veränderungen der Umweltbedingungen), lokale Adaptionen auf (BROWN & AMACHER 1999, SAGARIN & GAINES 2002, ECKERT et al. 2008, SEXTON et al. 2009). Speziell SEXTON et al. (2009) beschreiben, dass Randpopulationen während der Adaption an neue Umgebungen eine „Nischenevolution“ durchlaufen und dadurch in der genetischen Differenzierung variabler sind. Da Randpopulationen meist eine fragmentierte Verteilung aufweisen, ist diese variabelere genetische Differenzierung eine Folge von reduziertem Genfluss (SEXTON et al. 2009). ECKERT et al. (2008) beschäftigten sich mit der Annahme, dass Randpopulationen eine geringe genetische Diversität und eine große genetische Differenzierung als Folge von kleinen Populationen und großer geografischer Isolation aufweisen. An 115 Arten in 134 Studien fanden sie heraus, dass der Unterschied zwischen zentralen und peripheren Populationen meistens nicht erheblich groß war. Dennoch stellten sie fest, dass die Populationen im Verbreitungsareal vom Zentrum zur Peripherie einen Rückgang der Diversität innerhalb der Populationen von 64,2 % und eine Erhöhung der Differenzierung zwischen Populationen von 70,2 % aufzeigten (ECKERT et al. 2008). Speziell bei der Art *Daucus carota* L. zeigten die Daten einer Untersuchung von dänischen Populationen von SHIM & JØRGENSEN (2000), dass die genetische Distanz zwischen Populationen am Verbreitungsrand von ihrer geografischen Trennung abhängig ist, wobei eine hohe genetische Diversität innerhalb der Populationen festzustellen war und ausgeprägte genetische Strukturen aufwiesen. Dagegen haben andere Autoren (BRADEEN et al. 2002, RONG et al. 2010) keine oder nur eine schwache genetische Diversität bei *Daucus carota* ermitteln können. KÖNIG et al. (2002) und RASMUSSEN & KOLLMANN (2008) zeigten auch, dass an langlebigen Pflanzen bzw. Gehölzen

eine geringe genetische Diversität innerhalb der Populationen und eine moderat hohe genetische Differenzierung zwischen den untersuchten Populationen auftreten kann.

Hinsichtlich der Art *C. calceolus*, berichteten BRZOSKO et al. (2011) bei Untersuchungen von 32 polnischen Populationen über eine schwache genetische Struktur dieser Populationen. Sie ermittelten eine genetische Differenzierung innerhalb der Populationen von 79,85 %, zwischen den Populationen innerhalb der Regionen von 11,50 % und zwischen den Regionen von 8,66 %. Unter vergleichender Betrachtung zeigen die Ergebnisse der AMOVA aus Arlequin der ISSR-Methode eine große genetische Differenzierung innerhalb der Populationen von 80,47 %, zwischen den Populationen innerhalb der Regionen von 16,11 %. Im Vergleich zu den thüringischen und Rügener Populationen war nur eine geringe genetische Differenzierung zwischen den Regionen von 3,43 % erkennbar. Es ist zu erkennen, dass die beprobten Sprosse innerhalb der Populationen eine große Differenzierung zwischen den Individuen und damit eine hohe Diversität in den Populationen aufweisen. Diese Diversität ist bei BRZOSKO et al. (2011) nur auf Individuen- und weniger auf Populationsebene vorhanden.

Die nicht signifikanten Daten der AFLP-Analyse zeigen nur auf Regionenebene eine kleine und auf Individuen- und Populationsebene hingegen keine genetische Differenzierung. Betrachtet man zusätzlich die Ergebnisse der PCoA der ISSR- und der AFLP-Daten (Abbildung 20 & Abbildung 27), in der die Proben nicht in Populationen, sondern in Regionen (u.a. Nord-, Nordost- und Ost-Hessen) unterteilt wurden, ist eine homogene Verteilung der Proben der sieben Regionen ohne etwaige Differenzierungen zu erkennen. Zieht man noch die Ergebnisse der STRUCTURE-Analyse hinzu, ist nur eine geringe genetische Differenzierung in den einzelnen Proben aus der ISSR-Auswertung erkennbar. Die AFLP-Auswertung zeigte in STRUCTURE eine starke Homogenität der Proben. Beide Auswertungen mit STRUCTURE unterstützen die Ergebnisse der PCoA.

In Bezug auf die Diversität der hessischen Populationen kann geschlossen werden, dass die hessischen Populationen auf Individuenebene zwar hoch divers sind, aber diese Diversität sich nur mäßig auf Populationsebene fortsetzt. Es sollte immer bedacht werden, dass die AMOVA, PCoA und STRUCTURE-Analysen auf der Grundlage aller beprobten Populationen aus Hessen, Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern beruhen. In Anbetracht dieser Tatsache relativiert sich die Bewertung der Diversität auf Populationsebene. Die Ergebnisse der Statistikprogramme zeigen, dass alle Individuen innerhalb der Populationen hoch divers sind. Betrachtet man dagegen die Populationen zueinander, verringert sich die Diversität auf Populationsebene deutlich, weil alle Populationen eine gewisse Diversität aufweisen, und die Populationen dadurch im Vergleich eine gewisse Homogenität zueinander zeigen. Diese

Schlussfolgerung wird auf Regionenebene noch weitergeführt, worauf aber in der 2. Hypothese weiter eingegangen wird.

Die Auswertung der polnischen Populationen von BRZOSKO et al. (2002) und BRZOSKO et al. (2011) unterstützen in meiner Studie die höhere Differenzierung in den hessischen Populationen auf Individuen- und Populationsebene, und die wesentlich geringere Differenzierung auf Regionenebene. AAVIK et al. (2012) befürworten dieses Ergebnis durch Untersuchungen an einer anderen Art. Sie zeigten am Beispiel von *Lychnis flos-cuculi* (L.) CLAIRV., dass molekulare Variationen hauptsächlich innerhalb von Populationen zu finden sind. Ähnliche Werte zeigen auch die Untersuchungen von BRZOSKO et al. (2009), in denen zwischen polnischen und alpinen Populationen von *C. calceolus* keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln waren.

Bezieht man die Studie von CHOCHAI (2014) als Vergleich mit ein, unterstützt auch diese die Ergebnisse meiner Studie. Zu sehen sind Übereinstimmungen der Prozentzahlen innerhalb und zwischen den Populationen.

„The results from the analysis of molecular variance (AMOVA) across all populations, showed that 28% of variation is due to difference among populations, whereas 72% of variation is attributed to difference within populations ($\Phi_{PT} = 0.278, P < 0.01$)” (CHOCHAI 2014).

Es sollte aber bei dem Vergleich beachtet werden, dass in meiner Arbeit zusätzlich die Differenzierung der Regionen ermittelt wurde, weshalb die Daten der AMOVA leicht differenzieren. Obwohl in dieser Arbeit für die Untersuchungen Populationen aus Deutschland und nicht wie bei CHOCHAI (2014) Populationen aus mehreren Ländern Europas (Abbildung 32) herangezogen wurden, sind bemerkenswerte Übereinstimmungen vorhanden.

Zieht man nun die Verbreitungskarte der hessischen Populationen von *C. calceolus* aus den Jahren vor 1990 – 2013 (Abbildung 10, BARTH & OPITZ (2014)) mit in die Auswertung ein, ist deutlich zu erkennen, dass es vor 1990 eine weitere und häufigere Verbreitung des Frauenschuhs in Hessen gab. Durch diese weitere und häufigere Verteilung der Vorkommen in Hessen vor 1990 kann vermutet werden, dass durchaus ein vermehrter Austausch von genetischem Material zwischen den einzelnen Populationen bzw. Individuen aufgrund einer geringeren Entfernungen zwischen den einzelnen Populationen auftrat. Durch den Rückgang der Vorkommen des Frauenschuhs in Hessen auf einzelne, wenige Vorkommen reduzierte sich der Austausch von genetischem Material durch die Bestäuber aufgrund der hohen Entfernungen zwischen den Populationen bzw. dem Wegfall von Bestäuber-Nistplätzen. Die in dieser Studie ermittelte hohe genetische Differenzierung auf Individuenebene und die im Vergleich dazu

geringere genetische Differenzierung auf Populationsebene kann darauf zurückzuführen sein, dass sich das Verbreitungsgebiet von *C. calceolus* noch vor den ersten Dokumentationen in Hessen weiter erstreckte und sich der genetische Austausch zwischen den damaligen Individuen noch heute in der genetischen Differenzierung zwischen den rezenten Individuen in den Populationen zeigt. Dass diese Differenzierung heute noch sichtbar ist, lässt sich anhand des langsamen Lebenszyklus und der meist (zumindest heutigen) vegetativen Vermehrung erklären. Diese Aussage wird dadurch gestützt, dass zwischen den thüringischen und den hessischen Populationen keine so hohe genetische Differenzierung vorhanden ist. Hieraus lässt sich ableiten, dass es zwischen den beiden Regionen vor 1990 zu einem genetischen Austausch über Bestäuber bzw. Diasporenverbreitung gekommen sein kann.

Zwar befinden sich die hessischen Populationen am Verbreitungsrand des gesamten Verbreitungsgebiets von *C. calceolus*, doch entgegen den Erwartungen sind keine gravierenden Differenzierungen zwischen den hessischen Populationen zu erkennen, auch nicht im Vergleich zu den beprobten thüringischen Populationen. Auch die polnischen Populationen von BRZOSKO et al. (2011) zeigten keine Unterschiede im Bezug zum Grad der Differenzierung zueinander, ähnlich wie bei den hessischen Populationen. Nunmehr muss entschieden werden, wie der Rand eines Verbreitungsareals einer Art definiert wird bzw. wo Anfang und Ende des Randbereichs eines Verbreitungsareals liegen. Die Randbereiche eines Verbreitungsareals einer Art verfügen nach ELLSTRAND & ELAM (1993) über eine verminderte genetische Diversität im Gegensatz zu zentralen Populationen in einem Verbreitungsareal. Randbereiche sind, aufgrund eines reduzierten Genflusses in einer fragmentierten Verteilung, Bereiche, in denen spezielle Genotypen vorherrschen, die an bestimmte Umweltbedingungen angepasst sind (REHM et al. 2015). Durch einen reduzierten Genfluss können zufallsbedingte genetische Driteffekte (Flaschenhals-, Gründereffekt), die nicht durch Selektion verursacht werden, auftreten (HEINKEN 2009) und die genetische Diversität zwischen den Populationen in den Randpopulationen verändern (ELLSTRAND & ELAM 1993). Dagegen können in großen Populationen durch einen erhöhten Genfluss Prozesse der natürlichen Selektion dominieren, die positive Auswirkungen auf die Fitness und signifikante Effekte auf die genetische Struktur haben können (BRZOSKO & WRÓBLEWSKA 2003). Basierend auf den Ausführungen von FRANKHAM et al. (2002) schrieben BRZOSKO & WRÓBLEWSKA (2003):

„In other words, the distribution of populations in space dictates the rates of gene flow among them and affects the spatial variation of their genetic composition.“ (BRZOSKO & WRÓBLEWSKA 2003).

Im Gegensatz dazu untersuchte DANNEMANN (2000) an *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae) den Einfluss fragmentierter Verbreitung und unterschiedlicher Populationsgrößen auf die genetische Variation und fand heraus, dass die untersuchte Art nicht durch genetische Zufallsprozesse gefährdet ist. Dies begründet sie - obwohl die Populationen stark fragmentiert und isoliert sind – anhand der Langlebigkeit der einzelnen Pflanzen und der hohen genetischen Diversität innerhalb der Pflanzen. Die hohe genetische Diversität resultiert aus der Selbstinkompatibilität und der Möglichkeit der vegetativen Vermehrung. Damit gelingt kleineren Populationen das Überleben über lange Zeiträume (DANNEMANN 2000, LIENERT 2004).

Entgegen den Erwartungen konnte die Hypothese, dass die hessischen Populationen von *C. calceolus* hoch divers sind, da sie am Rand des Verbreitungsareals liegen und als Vorpostenpopulationen Fragmentierung vom Gesamtareal erfahren, mit den verwendeten Methoden nicht bestätigt werden, da nur eine geringe bis keine genetische Differenzierung zwischen den untersuchten Populationen zu erkennen war. Das könnte bedeuten, dass der Frauenschuh in der Vergangenheit möglicherweise ein westlicheres Verbreitungsgebiet als heute hatte und durch den langsamen Lebenszyklus eine mögliche Anpassung an neue Umweltbedingungen mit den, in dieser Studie, verwendeten Methoden kaum zu erfassen ist.

4.2 Hypothese 2:

Der Kontakt zwischen den hessischen und thüringischen Populationen hat zu einem genetischen Austausch und Homogenisierung der Bestände geführt, während hingegen die Rügener Population aufgrund der die natürlichen Ausbreitungsdistanzen überschreitenden räumlichen Distanz isoliert, und damit genetisch eigenständig ist.

Wie schon in der 1. Hypothese erläutert, zeigen meine ISSR-Ergebnisse der AMOVA für alle untersuchten Regionen zwar eine große genetische Differenzierung innerhalb der Populationen von 80,47 % und zwischen den Populationen innerhalb der Regionen von 16,11 %. Jedoch war nur eine geringe genetische Differenzierung zwischen den Regionen von 3,43 % im Vergleich zu den thüringischen und Rügener Populationen erkennbar. Betrachtet man hingegen die Ergebnisse der AFLP-Methode aus der AMOVA, ist die geringe Differenzierung zwischen den Regionen aus Thüringen, Hessen und von Rügen, wie die ISSR-Ergebnisse erkennen lassen, auch hier zu sehen. Der Unterschied liegt in der Differenzierung innerhalb und zwischen den Populationen, die laut AFLP-Ergebnisse keine genetische Differenzierung aufweisen. Zwar resultieren als Ergebnisse in der AFLP-Methode (810 Loci) ein Vielfaches an Loci als in der ISSR-Methode (60 Loci), jedoch muss auf die Qualität und nicht auf die Quantität der Ergebnisse geachtet werden. Zudem weisen die Auswertungen der AFLP-Daten keine signifikanten Daten und die Daten der ISSR-Methode, im Gegensatz dazu, signifikante Daten auf. Daher werden die Daten der ISSR-Methode als dominierender als die AFLP-Daten eingestuft, wobei dennoch beide Datensätze Einfluss auf die gesamte Auswertung der Ergebnisse haben werden.

Entgegen meiner Erwartungen ergab der Vergleich der Proben in den drei untersuchten Regionen (Regionenebene) nur eine geringe genetische Differenzierung. Für die Zukunft ist es wünschenswert, Proben aus dem Zentrum und weiterer Randproben des Verbreitungsareals zusätzlich zu meinen Ergebnissen zu beproben und zu vergleichen.

Im Gegensatz zur genetischen Variabilität im Zentrum und Randbereich eines Verbreitungsareals, fand DURKA et al. (2016) heraus, dass Arten unterschiedliche genetische Variabilität aufweisen können. Seine Unterteilung von Deutschland in acht Regionen mit der Untersuchung von zweijährigen bis ausdauernden Arten ergab, dass die Differenzierung in den verschiedenen Regionen der unterschiedlichen Arten genetisch variabel oder homogen sein kann. Einige Arten zeigten in den unterschiedlichen Regionen Deutschlands eine hohe genetische Differenzierung und bei anderen Arten gab es kaum eine Differenzierung. Das Interessante an den Ergebnissen ist, dass ausdauerndere Arten eine geringere Differenzierung

in den Regionen aufweisen als kurzlebige Arten. Hierbei muss beachtet werden, dass er zwar ausdauernde Arten gewählt hat, aber keine der untersuchten Pflanzen an das mögliche Alter und den langen Lebenszyklus von *C. calceolus* heranreicht. Daher ist schlussfolgernd zu vermuten, dass bei extrem ausdauernden Arten die genetische Variabilität auf Populations- bzw. Regionenebene weniger divers ist als auf Individuenebene. Einige Beispiele für eine geringe Differenzierung auf Populations- bzw. Regionenebene bei langlebigen Pflanzen kommen in der Forstwissenschaft bei Arten wie *Hippophae rhamnoides* L. (Sanddorn) (BARTISH et al. 1999), *Rosa inodora/canina* L. (JÜRGENS ET AL. 2007) oder *Sorbus aucuparia* L. (RASPÉ & JACQUEMART 1998) vor und sollen charakteristisch für Fremdbestäuber und langlebige Pflanzen sein (HAMRICK & GODT 1989). 7 Jahre später behaupten HAMRICK & GODT (1996), das sogenannte „outcrossing species“ (Auskreuzungs-Arten) zu einer höheren Diversität innerhalb und einer geringeren genetischen Differenzierung zwischen den Populationen tendieren. Sie weisen an holzigen Pflanzen eine geringere genetische Differenzierung zwischen Populationen als bei nicht verholzten Pflanzen nach. Im Gegensatz dazu fanden MANNERS et al. (2013) auch bei der Orchidee *Vanda coerulea* GRIFF ex LINDL. eine hohe genetische Differenzierung auf Individuenebene und eine niedrigere auf Populationsebene. Sie führen diese Verteilung der Differenzierung auf die fehlende Korrelation zwischen der genetischen und geografischen Distanz zurück. Die hohe Differenzierung innerhalb der Populationen lässt die Annahme auf eine regelmäßige Verteilung der kleinen und leichten Samen auf die unterschiedlichen Populationen zu (MANNERS et al. 2013). Wenn man nach dieser Auffassung die drei Regionen betrachtet, wäre einerseits ein Austausch zwischen den hessischen und thüringischen Populationen anhand der Entfernung durchaus denkbar, andererseits ein regelmäßiger Austausch mit den weiter entfernten Rügener Populationen eher unwahrscheinlich aber nicht unmöglich.

Die große Differenzierung auf Individuen- und die niedrigere Differenzierung auf Populationsebenen deutet darauf hin, dass momentan kein bzw. ein spärlicher genetischer Austausch zwischen den einzelnen Populationen in Hessen und Thüringen vorhanden ist, d.h. dass die Bestäuber und/oder die Samen von *C. calceolus* die Strecken zwischen den einzelnen Populationen nicht überwinden können. Wie schon in der 1. Hypothese erläutert, waren früher die Populationen in Hessen und Thüringen in größerer Anzahl vertreten und somit auch die Entfernungen der einzelnen Populationen untereinander geringer. Es ist denkbar, dass dadurch ein Austausch von genetischem Material über Bestäuber und/oder Diasporenverbreitung vorhanden war, welcher heute die hohe Diversität innerhalb der Populationen und die niedrigere Differenzierung zwischen Populationen erklären kann. In den heutigen, weiter entfernten

Restpopulationen ist diese Diversität durch das hohe Alter und den langlebigen Lebenszyklus noch vorhanden, obwohl wahrscheinlich durch den geringen Flugradius der Bestäuber (GATHMANN & TSCHARNTKE 2002) kein Austausch von genetischem Material möglich ist. Zusätzlich ist auch ein Rückgang der Bestäuber zu verzeichnen (WRATTEN et al. 2012, GARIBALDI et al. 2013) und geeignete Nistmöglichkeiten fehlen (WESTRICH 1989, MÜLLER 2012). Eine Verbreitung von Diasporen kann angesichts des geringen Gewichts der Orchideensamen (KULL 1999) extrem von abiotischen Umweltfaktoren abhängen. So berichten ARDITTI & GHANI (2000) von einer möglichen anemochoren Verbreitung von Orchideensamen von 2000 km, MACHON et al. (2003) hingegen nur von wenigen Zentimetern. Man darf in diesem Zusammenhang nicht unberücksichtigt lassen, dass auch die Bodenbedingungen und die entsprechende Mykorrhizierung vorhanden sein müssen, wenn eine Samenausbreitung auf neuen Gebieten erfolgt. Aufgrund der Leichtigkeit der Samen und abiotischen Faktoren ist es nicht auszuschließen, dass eine Fernausbreitung der Orchideensamen möglich ist (FAY et al. 2009).

Betrachtet man dazu im Vergleich die Rügener Population, ist die Entfernung für eine Samenverbreitung zwischen Hessen und Rügen noch größer als zwischen Hessen und Thüringen. Zumal heute wie damals keine dokumentierten weiteren Populationen des Frauenschuhs zwischen Hessen und Rügen zum weiteren genetischen Austausch vorhanden waren, sind die untersuchten hessischen, thüringischen und Rügener Populationen sehr homogen zueinander. Das BFN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ (2008) schreibt über die Rügener Vorkommen von *C. calceolus*:

„Sie wächst hauptsächlich in den Mittelgebirgsregionen bzw. der montanen Stufe der Alpen und kommt dementsprechend vor allem in den Bundesländern Thüringen, Baden-Württemberg, Bayern und Niedersachsen (STERN 2006) vor. In Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern kommt der Frauenschuh nur vereinzelt vor. Die dortigen Vorkommen grenzen sich vom Hauptverbreitungsgebiet als isolierter Bereich ab. Diese Vorkommen stehen im Zusammenhang mit Vorkommen in Südschweden und dem westlichen Polen und erhalten dadurch besondere Bedeutung.“ (BfN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ 2008).

Es konnten in dieser Arbeit keine Hinweise gefunden werden, dass die beprobte Rügener Population sich vom Hauptverbreitungsgebiet in Deutschland als isolierter Bereich abgrenzt und die Aussage des BfN stützt. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die untersuchten Populationen der drei Regionen einen gemeinsamen Ursprung haben und möglicherweise mit den südschwedischen und/oder westpolnischen Vorkommen von *C. calceolus* im Zusammenhang stehen. Aufbauend auf den Aussagen von KAHANDAWALA (2009) schreiben

FAY et al. (2009) über eine starke Homogenität in der Diversität der dänischen Populationen im Zusammenhang seiner Auswertung des britischen Vorkommens. Auch CHOCHAI (2014) schreibt in ihren Haplotypen-Untersuchungen an mehreren europäischen Vorkommen (Abbildung 32), dass die Vorkommen aus Schweden und dem Baltikum Gemeinsamkeiten aufweisen und vermutlich nach der letzten Eiszeit aus Vorkommen des Balkans entstanden sind. Weitere Erkenntnisse würden sich aus einem Vergleich meiner Untersuchungsobjekte mit den Populationen aus Südschweden, Dänemark, Polen, dem Balkan und aus Deutschland ergeben.

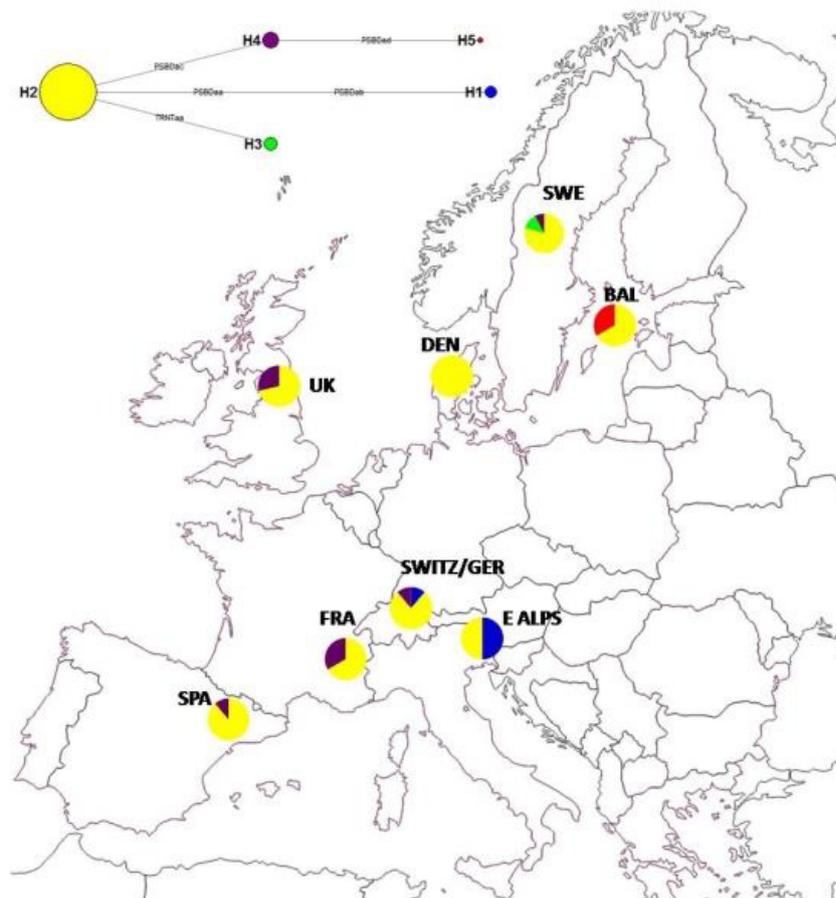


Abbildung 32: Median-Verbindungsnetz für Plastiden Haplotypen (kleines Bild links oben) von *C. calceolus* und Haplotyp Verteilung in West- und Nordeuropa. Farben zeigen Frequenzen von Haplotypen innerhalb jeder Population. UK: Vereinigtes Königreich; SPA: Spanien; FRA: Frankreich; SWITZ / GER: Schweiz / Deutschland; E ALPS: Ostalpen, DEN: Dänemark; BAL: Baltic Inseln; SWE: Schweden. (CHOCHAI 2014)

Die Vegetation der Erde wird ständig bestimmt durch Klimaveränderungen, den Warm- und Eiszeiten. Flora und Fauna passen sich den schmelzenden- bzw. wachsenden Polkappen stetig

an und gewinnen bzw. verlieren Besiedlungsgebiete (COMES & KADEREIT 1998). Mögliche Rückzugsorte für Pflanzen finden sich bei wachsenden Polkappen nur in gemäßigten Gebieten (HEWITT 1996).

Die letzte Eiszeit, die sogenannte Weichsel-Eiszeit bzw. Weichsel-Komplex, endete vor ca. 10000 Jahren (GROSSWALD 1980, KLOSTERMANN 2009) (Abbildung 33). Durch die folgende Warmzeit, in der sich die Flora wieder durch zurückweichende Polkappen weiter im Norden ansiedeln konnte, ist zu vermuten, dass der Frauenschuh sein Verbreitungsareal genauso wie die übrige Flora erweitert hat. Betrachtet man dazu im Vergleich die Abbildung 7 der Verbreitung des Frauenschuhs im Jahre 1986, fallen Unregelmäßigkeiten, aber auch Regelmäßigkeiten auf. Regelmäßigkeiten sind in Russland zu sehen, dort ähneln die Grenzen der skandinavischen Inlandeismassen der Saale- und der Weichsel-Eiszeit teilweise den Grenzen des Verbreitungsgebiets von *C. calceolus*. Unregelmäßigkeiten hingegen gibt es in Skandinavien und den britischen Inseln. Dort befinden sich heute zahlreiche Vorkommen in Schweden und Norwegen (DEVILLERS-TERSCHUREN 1999). Indizien zeigen, dass es in England Vorkommen des Frauenschuhs gab, wobei der letzte rezente Standort in England eine Wiederansiedlung ist (RAMSAY & STEWART 1998). Es zeigt, wie weit sich das Verbreitungsareal in den Norden erstreckte (HULTÉN & FRIES 1986). Es ist nach den Karten zu vermuten, dass es vor 1986 ein weitreichenderes Verbreitungsgebiet des Frauenschuhs gab. Die nur kleine genetische Differenzierung zwischen den rezenten, untersuchten Regionen von *C. calceolus* in den drei Bundesländern lässt annehmen, dass es sich hierbei heute um Reliktorkommen eines größeren Verbreitungsareals, wie es schon von KULL (1988) und KULL & PAAVER (1997) aus anderen Gebieten niedergeschrieben wurde, handelt.

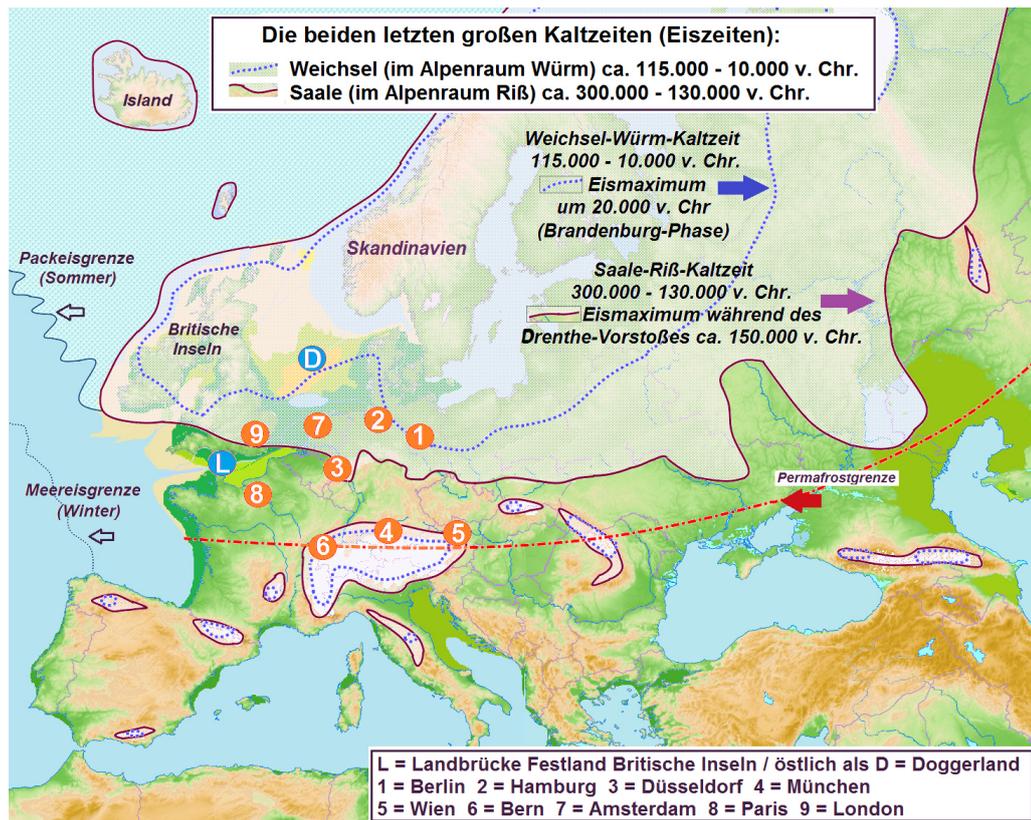


Abbildung 33: Karte der letzten beiden großen Kaltzeiten, der Weichsel- und der Saale-Kaltzeit. Zu sehen sind die Grenzen der vergletscherten Gebiete der jeweiligen Eiszeiten (Quelle: Juschki, wikipedia.de, abgerufen am 22.06.2016).

FAY et al. (2009) schrieb nicht nur über die Homogenität der dänischen Vorkommen. Sie berichten auch über eine höhere Diversität in den schwedischen als in den dänischen Vorkommen und sehen den Grund darin, dass es nach der letzten Eiszeit mehrere Migrationsrouten nach Schweden gab. Die Homogenität der dänischen Vorkommen führen sie auf einen Gründereffekt durch Samenfernausbreitung zurück (FAY et al. 2009).

Auch PEDERSEN et al. (2012) schreiben in ihrer Arbeit über die dänischen Vorkommen von *C. calceolus* und vermuten, dass, anhand der fehlenden genetischen Differenzierung der Vorkommen in Dänemark, nach der Etablierung der Populationen ein genetischer Engpass (Flaschenhalseffekt) auftrat oder dass die Etablierung der rezenten Vorkommen nur aus einer Region nach der Eiszeit erfolgte (Gründereffekt). Der Flaschenhals- und Gründereffekt sind Beispiele für genetische Drift, die allgemein definiert, eine zufällige Veränderung der Allelen beschreibt und unabhängig von der genetischen Fitness entsteht.

Betrachtet man dazu nochmal die Arbeit von CHOCHAI (2014), die vermutet, dass sich der Frauenschuh in Europa nach der Eiszeit aus drei Refugien etablierte, die eine Besiedelung der vergletscherten Gebiete von der iberischen und italienischen Halbinsel und aus dem Balkan ermöglichte, kann dies eventuell eine Begründung sein, warum sich die hessischen,

thüringischen und Rügener Populationen kaum unterscheiden. Dagegen spricht die Aussage von BRZOSKO et al. (2002), in den untersuchten polnischen Populationen keinen Flaschenhals-Effekt feststellen zu können. Hierzu bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen.

KENNEDY & WALKER (2007) stellten in ihren populationsgenetischen Untersuchungen an *Cypripedium reginae* WALTER in vergletscherten und unvergletscherten Bereichen Nordamerikas fest, dass eine höhere genetische Diversität in den untersuchten Populationen in zuvor vergletscherten Gebieten als in unvergletscherten Gebieten auftrat. Sie begründen die hohe Diversität in *C. reginae* in den vergletscherten Gebieten damit, dass nahe der vergletscherten Gebiete genügend Habitate mit *C. reginae* zur Verfügung standen und nach dem Rückzug der Eismassen als Refugien für die Besiedlung der neuentstandenen Lebensräume dienten (KENNEDY & WALKER 2007). WALLACE & CASE (2000) fanden ebenfalls ähnliche Ergebnisse bei ihren Untersuchungen an *Cypripedium parviflorum* SALISB. in vergletscherten und unvergletscherten Gebieten und begründen dies ebenso mit periglazialen Refugien. Diese Verteilung der Diversität steht im Widerspruch zu den meisten Aussagen über populationsgenetische Untersuchungen (BORNBUSCH et al. 1994, CASE 1994, ALLEN et al. 1996, BROYLES 1998, CASE et al. 1998, AAGAARD et al. 1999, BRZOSKO et al. 2011, PEDERSEN et al. 2012, CHOCHAI 2014), die in unvergletscherten Gebieten eine höhere Diversität als in vergletscherten Gebieten oder keine Unterschiede zwischen den Gebieten feststellen konnten. Und auch meine Ergebnisse passen nicht zu den Ergebnissen von KENNEDY & WALKER (2007) und WALLACE & CASE (2000), da nur insgesamt eine geringe Differenzierung zwischen den untersuchten Regionen in Hessen, Thüringen und auf Rügen festgestellt wurde.

Wie CHOCHAI (2014) bestätigt, berichtete schon FAY et al. (2009) über Unterschiede in der genetischen Diversität, nicht nur in den schwedischen Populationen, sondern insgesamt in allen untersuchten Populationen in Europa. Für die genetisch diversen Populationen aus den Alpen und der Schweiz vermuten sie zum einen eine Besiedelung über refugiale Populationen während der Weichseleiszeit in Zentraleuropa und zum anderen nacheiszeitliche Populationsstärkungen von südlichen/südöstlichen Populationen aus unvergletscherten Gebieten (FAY et al. 2009). Wie schon FAY et al. (2009) und CHOCHAI (2014) formulieren, muss es für die Differenzierungen in den Populationen in Europa mehrere Ursprünge geben. Sie vermuten, dass es 2 - 3 Besiedlungswege nach der letzten Eiszeit aus den unvergletscherten Refugien dem Balkan, Italien und der Iberischen Halbinsel gab und diese drei Herkünfte in der rezenten genetischen Diversität der Populationen sichtbar sind (FAY et al. 2009, CHOCHAI 2014).

Einen weiteren Aspekt, der die bereits vorgebrachten Ergebnisse untermauert, weisen die Auswertungen des Manteltests von R für *C. calceolus* auf, der in den drei Regionen keine Korrelationen der genetischen Differenzierung im Zusammenhang mit der geografischen Entfernung nach PRASSE et al. (2010) feststellte. Im Gegensatz zu anderen Arten, die häufig deutliche Muster einer entfernungsabhängigen Differenzierung auf isolierten Standorten aufzeigen.

Die beinahe genetische Homogenität der Rügener mit den hessischen Populationen kann auch nicht durch eine Ansalbung erklärt werden. In den Bundesländern Hessen und Mecklenburg-Vorpommern sind laut den Datenbanken (Floradatenbank Mecklenburg-Vorpommern: 1769 (schriftlich Frau Abdank, LUNG); Datenbank Hessen: 1719 (Frau Berg, HLNUG)) sehr früh Daten von Beständen dokumentiert.

Anhand des langsamen, komplizierten Lebenszyklus (z.B. Samenkeimung mit Mykorrhiza, Protonema, erste Blatt erst nach ca. 4 Jahren, nach ca. 6 – 10 Jahren die erste Blüte, Bestäuberspezifikation, Anemochorie) und der hohen Lebensdauer (ca. 100 Jahre) der Frauenschuhpflanzen könnte man davon ausgehen, dass erheblich weniger Generationen seit dem Ende der letzten Eiszeit vor ca. 10000 Jahren als bei anderen perennierenden (ausdauernden) bzw. pollakanthen (mehrmals blühend) Arten (abgesehen von den Baumarten) entstanden sind. Betrachtet man dabei den Aspekt der Mutationen (ob positiv, negativ oder neutral), bleibt die Mutationsrate im Vergleich zu anderen ausdauernden Arten gleich, wobei die spezifischen Genotypen sich durch die lange Generationsdauer für lange Zeit erhalten. „Die Geschwindigkeit der mutativen Veränderung einer Population hängt [...] sehr von der Geschwindigkeit der Generationsfolge ab“ (JACOB et al. 1994). Hierdurch, sowie durch die niedrige Bestäuberquote, der damit verbundenen niedrigen Befruchtungsquote und der Keimungshilfe durch den Mykorrhiza-Pilz erreicht der Frauenschuh zusätzlich vermutlich eine geringere Etablierung der Samen, wodurch weniger Mutationen ausgeprägt werden, die sich weiter vermehren können. Durch die niedrige Anzahl an Mutationen können die Populationen kaum unterschiedliche genetische Fingerabdrücke entwickeln und alle Populationen sind im Hinblick auf das genetische Material sehr homogen. Die niedrige Anzahl an Mutationen resultiert auch daher, dass die vegetative Vermehrung beim Frauenschuh durch Ausbildung von Rameten (unterirdisch waagrecht wachsende Rhizom, welches jährlich meistens nur einen Trieb ausbildet) meist erfolgreicher ist als die generative und dadurch keine Durchmischung der Gene stattfindet. Ein weiterer Aspekt der generativen Vermehrung ist die genetische

Selbstinkompatibilität (DAUMANN 1968), die keine Selbstbefruchtung innerhalb der Rameten eines Genets zulässt.

Wenn man sich den Stand der aktuellen Populationen in Hessen betrachtet, fällt auf, dass die Anzahl der hessischen Vorkommen seit 2004 langsam aber stetig sinkt. Zwar konnte der dramatische Rückgang (detaillierte Aufzeichnungen seit 2004) mit dem Artenhilfskonzept für den Frauenschuh ab 2007 (BARTH 2007) verlangsamt werden, aber eine Reduzierung der Vorkommens-Anzahl besteht immer noch. Die noch bestehenden hessischen Populationen wurden, soweit es geht, stabilisiert und durch verschiedene Pflegemaßnahmen gestärkt. Der Vergleich der heutigen Daten mit den früheren Daten vor 1990 lässt einen deutlichen Rückgang in den letzten Jahrzehnten erkennen (Abbildung 10). Nicht nur in Hessen ist dieser Rückgang erkennbar. Auch andere Bundesländer mit großen Vorkommen des Frauenschuhs wie Bayern, Baden-Württemberg, Thüringen und Niedersachsen beklagen Rückgänge der Populationen (GARVE 1994, STERN 2006). Die Gründe dafür können vielseitig sein. Verdrängung kann zum einen durch starke Konkurrenz oder spezielle ökologische Veränderungen stattfinden, und/oder zum anderen durch anthropogenes Einwirken, wie z.B. Änderungen von historischen Waldnutzungsformen in den bestehenden Habitaten, beeinflusst werden. Zurück bleiben Reliktvorkommen eines früheren größeren Verbreitungsareals, die mit den verwendeten Methoden gleiches genetisches Material aufweisen.

Die geringe Anzahl an Mutationen kann auch darauf hindeuten, dass der Frauenschuh aufgrund der langen Generationsdauer besondere Reparaturmöglichkeiten von Mutationen (z.B. bei der Replikation) besitzt, aber dafür gibt es noch keine Erkenntnisse und es bedarf in der Hinsicht weiterer Forschung.

Zusammenfassend weisen die statistischen Auswertungen der genetischen Analysen, der aktuelle Stand der Populationen, die Verbreitungskarte von 1986 und die Tatsache des langsamen Lebenszyklus von *C. calceolus* auf die Annahme hin, dass es ein größeres Verbreitungsareal (zu mindestens in den drei untersuchten Regionen) von *C. calceolus* aus Populationen mit hohem genetischem Austausch gegeben haben könnte und die heutigen Standorte (Hessen (GROSSMANN 1976, BARTH & OPITZ 2014), Deutschland (KUTSCHER 1997, KORSCH et al. 2002, VOIGTLÄNDER 2006, GRABNER 2012) und Europa (DEVILLERS-TERSCHUREN 1999)) Reliktvorkommen bilden. Es konnten mit den verwendeten Methoden keine Unterschiede zwischen der Rügener Population und den hessischen und thüringischen Populationen festgestellt werden und damit auch keine erwartete Isolierung der Rügener Population.

4.3 Fazit:

Kann eine naturschutzfachliche Empfehlung gegeben werden, ob nur naheliegende Populationen für eine Populationsstärkung von *C. calceolus* verwendet werden können, um möglicherweise vorhandene und begonnene genetische Differenzierungsprozesse nicht zu verändern?

Um ein Fazit als naturschutzfachliche Empfehlung formulieren zu können, müssen erst einmal potentielle Risiken bedacht werden. Zum Thema Populationsstärkungen bestehen vielschichtige Bedenken, jedoch besteht bei Wissenschaftlern weitestgehend Einigkeit, dass stets regionales Saatgut für eine Populationsstärkung verwendet werden soll um das genetische Erbe einer lokalen Umgebung zu bewahren (LINHART & GRANT 1996, REED & FRANKHAM 2001, SACKVILLE HAMILTON 2001, KAWECKI & EBERT 2004, HEREFORD 2009, JOHNSON et al. 2010, JONES 2013). Wenn das Thema Populationsstärkung näher betrachtet wird, gibt es aber Unstimmigkeiten bei Wissenschaftlern z.B. bei der Entfernung der Quelle des verwendeten Pflanzenmaterials oder der Verwendung von einer oder mehrerer Quellen an Pflanzenmaterial (KAYE 2001, MIJANGOS et al. 2015). Im Weiteren werden einige Meinungen dargeboten um ein umfangreiches Bild für eine naturschutzfachliche Empfehlung zu schaffen.

Wie schon einführend dargestellt, sind die rezenten hessischen Populationen von *C. calceolus* sehr klein, fragmentiert und isoliert, wobei solche Populationen negative Konsequenzen (wie z.B. reduzierter Genfluss zwischen den Populationen) mit sich bringen können (KARRON 1987, FRANKHAM et al. 2002, RASMUSSEN & KOLLMANN 2008). Größere Populationen haben im Allgemeinen ein breiteres Spektrum zur Anpassung an ihre Umwelt als kleinere Populationen (WHITLOCK 2003). Es besteht bei kleinen isolierten Populationen die Gefahr von Inzuchtdepressionen (Erzeugung von Nachkommen von verwandten Individuen und dadurch bedingte Homozygotie) und eine dadurch reduzierte Fitness, die in jeder Lebensphase (z.B. Samenkeimung, Pflanzenwachstum, Blühfähigkeit und Samenproduktion) auftreten kann. RICHARDS (2000) konnte in seinen Studien an *Silene alba* MILL. zeigen, dass Inzuchtdepressionen die Fitness reduzieren können, indem eine niedrigere Samenkeimung festgestellt wurde. Solchen Inzuchtdepressionen in kleinen Populationen kann durch Populationsstärkungen entgegengewirkt werden. Natürlich sollte das Pflanzenmaterial nicht aus der Population stammen in der eine Populationsstärkung vorgenommen wird. Am Beispiel von *Silene alba* wird erfolgreich gezeigt, wie das absichtliche Einbringen von

populationsfremden Genotypen den Inzuchteffekt minimieren kann (RICHARDS 2000). Ebenso schreibt KAYE (2001):

„Populations suffering from inbreeding depression can often benefit from outcrossing with individuals in other populations, which may result in higher heterozygosity, improved health of individuals, and greater population viability.“

Beim Einbringen von lokal-fremdem Pflanzenmaterial in kleine Populationen besteht wiederum die Gefahr von Auskreuzungsdepressionen, bei der die Möglichkeit besteht, dass durch zu starke Einkreuzung der nicht-lokalen Populationen die Fitness reduziert und die Anpassungsfähigkeit, in der zu stärkenden Population an die lokalen Gegebenheiten verloren gehen kann (LYNCH 1991, WASER 1993, STANTON et al. 1997, KELLER et al. 2000, MULLER et al. 2003, HENDRY & TAYLOR 2004, HUGHES et al. 2008, KETTENRING et al. 2014). Aber nach heutigen Meinungen treten Auskreuzungsdepressionen seltener auf als anfangs vermutet (EDMANDS 2007, LEIMU & FISCHER 2008, MIJANGOS et al. 2015). FENSTER & GALLOWAY (2000) führten Kreuzungen an *Chamaecrista fasciculata* (MICHX.) GREENE über drei Generationen mit Individuen aus Entfernungen von 100 m bis 2000 km durch und fanden heraus, dass bei einer Entfernung unter 1000 km aufgrund des Heterosis-Effekt (ausgeprägte Leistungsfähigkeit der F₁-Generation) keine Auskreuzungsdepression und über 1000 km eine Auskreuzungsdepression stattfand. Sie stellten in den Untersuchungen an den Individuen unter 1000 km fest, dass eine kurzfristige positive Wirkung in der Leistung der Nachkommen erkennbar war (Heterosis-Effekt) und diagnostizierten keine längerfristigen negativen Auswirkungen auf die Fitness (FENSTER & GALLOWAY 2000). Dagegen äußerten sich KELLER et al. (2000) dahingehend, dass negative Auswirkungen auch in der F₂-Generation auftreten können. FISCHER & MATTHIES (1998) unterstützten die Arbeit von FENSTER & GALLOWAY (2000) mit ihren Untersuchungen an *Gentianella germanica* (WILLD.) BÖRNER und beobachteten Auskreuzungsdepressionen bei Kreuzungen von weit entfernten Populationen mit kleinen isolierten Populationen. DONATH & ECKSTEIN (2008) fügen, basierend auf den Aussagen von ALLENDORF & LUIKART (2007), hinzu:

„Durch Naturschutzmaßnahmen erhöhter Genfluss kann zum völligen Verlust der lokalen Adaptation führen, insbesondere wenn er von großen, wenig angepassten zu kleinen, lokal angepassten Population stattfindet.“ (DONATH & ECKSTEIN 2008).

Entgegen dieser Aussagen stellten WASER & PRICE (1994) fest, dass Auskreuzungsereignisse auch unter 100 Metern auftreten können. Außerdem ist es von besonderer Bedeutung, dass bei Populationsstärkungen das Habitat der Quelle des Pflanzenmaterials dem der stärkenden

Population ähnelt, sonst kann es ebenso zu Auskreuzungseffekten (MONTALVO & ELLSTRAND 2001) kommen.

Neben der Entfernung der Herkunft des Pflanzenmaterials hängt es auch von der Größe einer Population ab, ob die Individuen stärker oder schwächer von negativen Effekten beeinflusst werden. Wie groß eine Population sein soll, um langfristig überleben zu können, kann nicht pauschal für alle Arten bestimmt werden. Jede Art muss separat beurteilt werden. Es gibt Modellrechnungen zu Populationen, in denen 100-500 Individuen (LIENERT 2004) oder sogar bis zu 1000 Individuen (TRAILL et al. 2007) genannt werden, damit keine negativen genetische Effekte auftreten.

Wenn aber kleine Populationen ausgedehntes klonales Wachstum und starke Reduktionen der sexuellen Fortpflanzung zeigen, können diese Populationen nach HONNAY & BOSSUYT (2005) aber auch sogenannte Restpopulationen sein. Sie mutmaßen, dass ausschließlich längere klonale Wachstumphasen in einer kleinen Population eine monoklonale Population hervorruft und letztendlich zum Aussterben führen kann (HONNAY & BOSSUYT 2005) oder auf das Fehlen der Bestäuberinteraktionen zurückzuführen ist.

Bestäuberinteraktionen sind ein weiterer wichtiger Aspekt im Bezug zu Fragmentierungen von Populationen. Nach Untersuchungen an 4 obligat allogamen Orchideen fand NEWMAN et al. (2013) heraus, dass in fragmentierten Populationen für ausreichend keimfähige Samen die Präsenz geeigneter Bestäuber entscheidend ist. Wobei beachtet werden muss, dass nektarlose Orchideen anfälliger für einen verringerten Genfluss als nektarreiche Orchideen (GIJBELS et al. 2015) sind und, aufgrund der fehlenden Bestäuberinteraktionen in kleinen, isolierten Vorkommen, bei kleinen Populationen auch stärker bzw. schneller negative Effekte ausgebildet werden können (NEWMAN et al. 2013). Dementsprechend sollten in der Umgebung um die Population geeignete Habitate mit Nistplätzen (NILSSON 1979, WESTRICH 1989) im Umkreis von maximal 600 Metern (GATHMANN & TSCHARNTKE 2002) vorhanden sein, um eine hohe Bestäuberquote zu erreichen. Als Ersatz für Habitate mit Nistplätzen könnte man möglicherweise auf Wild- und Sandbienen zugeschnittene sog. Insektenhotels oder große Behälter mit entsprechend sandigen Böden testen, um eventuell eine Ansiedlung von Wild- und Sandbienen zu fördern. Des Weiteren sollten die bisherigen Maßnahmen an den hessischen Populationen wie z.B. Gehölze dezimieren, Offenboden um die Mutterpflanze schaffen, usw., beibehalten werden (BARTH & PLOB 2014).

In Studien der Habitatfragmentierung von Pflanzenarten gibt es insgesamt eine Problematik in der Auswahl der Untersuchungsobjekte. In den meisten Studien sind Arten mit staubförmigen

Diasporen und/oder klonalem Wachstum (und damit potenziell unbegrenzter Lebensdauer) unterrepräsentiert und vermutlich weniger von Habitatfragmentierung betroffen als andere Familien (HEINKEN & WEBER 2013) bzw. es wird ein längerer Zeitraum benötigt, damit genetische Folgen der Populationsfragmentierungen sichtbar werden. Es gibt Arten, die in kleinen Populationen über längere Zeiträume in einer starken Fragmentierung des Habitats überleben können (GARCIA 2008) und trotzdem ein hohes Maß an genetischer Diversität aufweisen wie bei *Ligularia sibirica* (L.) CASS. (Asteraceae) festgestellt wurde (ŠMÍDOVÁ et al. 2011). Aber dennoch gilt allgemein die Meinung, dass eine weitere Fragmentierung das Überleben einer Art und ihrer lokalen Populationen gefährden, die Populationen weiter isolieren und ihre Größe reduzieren wird (LIENERT 2004). Anhand der unterschiedlichen Meinungen ist zu sehen, dass die Sachlage zum Thema Fragmentierung von Populationen (HEINKEN & WEBER 2013), Populationsstärkung und Entfernung des Pflanzenmaterials usw. noch unzureichend ist und stark diskutiert wird.

Wie schon beschrieben, wird aus Beobachtungen nach BARTH & PLOB (2014) ein Rückgang der Populationen des Frauenschuhs in Hessen durch zahlreiche Pflegemaßnahmen verlangsamt. Die hessischen Populationen gehören zum derzeit westlichen Randbereich des Verbreitungsgebietes von *C. calceolus*. Die Randbereiche eines Verbreitungsgebiets von Arten müssen nach REHM et al. (2015) vordringlich erhalten bleiben, weil Individuen in diesen Randpopulationen veränderte Genvariationen durch Anpassung an teilweise verschiedene Umweltbedingungen ausbilden, zum Genpool der gesamten Art beitragen und die geografische Verteilung der Art erhalten und/oder erweitern können. Bei Wegfall der lokal adaptierten Randpopulationen reduziert sich die Fähigkeit der Arten sich anzupassen (REHM et al. 2015). Um den Rückgang der hessischen Populationen noch weiter entgegenzuwirken und Maßnahmen zum Erhalt zu formulieren, wurde mit dieser Studie versucht die genetische Differenzierung zwischen den hessischen Populationen zu erfassen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erste Erkenntnisse zur Problematik, woher geeignetes Pflanzenmaterial für Populationsstärkungen des Frauenschuhs gewonnen werden kann. Anhand der hohen Diversität der Proben innerhalb und zwischen den Populationen konnten mit den verwendeten Methoden keine Differenzierungen zwischen den untersuchten Populationen und keine bis nur geringe Differenzierung zwischen den Regionen festgestellt werden. Der Manteltest lieferte in der Auswertung nur geringe signifikante Korrelationen zwischen den genetischen und den geografischen Daten. Aufgrund der

Ergebnisse dieser Studie und dem ständigen potentiellen Risiko bei der Verwendung von nicht-lokalem Saatgut (Veränderung der genetischen Vielfalt der zu stärkenden Population und der Verlust der Anpassungsfähigkeit) (KAYE 2001, MIJANGOS et al. 2015) ist für eine naturschutzfachliche Empfehlung zu schlussfolgern, dass es nach dieser Studie unproblematisch ist, kleine Populationen in Hessen mit Saatgut bzw. Pflanzenmaterial aus großen Populationen in Hessen zu stärken ohne eine Veränderung möglicher genetischer Differenzierungsprozesse hervorzurufen. Um möglichen Auskreuzungsdepressionen in der zu stärkenden Population entgegenzuwirken, sollten die Spenderpopulationen möglichst aus lokalen Herkünften stammen (DONATH & ECKSTEIN 2008) und wenn möglich aus mehreren Spenderpopulationen verwendet werden. Durch Verwendung von mehreren Spenderpopulationen kann sich die Zahl der Keimungsrate bzw. die Etablierung des Pflanzenmaterials, aufgrund verschiedener möglicher Anpassungen, erhöhen, wobei darauf geachtet werden muss, dass sich die Habitate der Spenderpopulationen und der zu stärkenden Population ähneln (KAYE 2001, MONTALVO & ELLSTRAND 2001, DONATH & ECKSTEIN 2008). Natürlich dürfen dabei Bodenbedingungen (Kalkstein) und Konkurrenzverhalten von *C. calceolus* nicht vernachlässigt werden. Die Problematik der genetischen Selbstinkompatibilität bei kleineren Populationen mit nur einem Genet und mehreren Rameten kann durch Populationsstärkungen mit populationsfremden Saatgut umgangen werden. Zusätzlich sollten im Umkreis von maximal 600 Metern um die Populationen geeignete Habitate mit Nistplätzen für die bestäubenden Bienenarten geschaffen werden, um die Bestäuberquote von *C. calceolus* zu erhöhen.

5 Fehlerbetrachtung und Ausblick

Der teilweise hohe DNA-Gehalt der Blattproben resultiert wahrscheinlich aus einer Mischung der DNA der Pflanze und der DNA von verschiedenen Pilzarten auf dem Blatt.

Es zeigt sich, dass die Proben von Rügen scheinbar den höchsten durchschnittlichen DNA-Gehalt im Vergleich zu den Werten aus Thüringen und Hessen aufweisen. Dabei ist zu beachten, dass die Werte der Proben nicht unbedingt vergleichbar sind, da die Anzahl der hessischen Proben stark variiert (Tabelle 1). Aufgrund der teilweise geringen Größe der hessischen Populationen und der Entnahmebedingungen durften maximal 10 % der Sprosse in einer Population gesammelt werden. Daher wurden 9 Populationen aufgrund der geringen Populationsgröße nicht besammelt. Für weitere Arbeiten sollte versucht werden, die Stichprobensammlung mit den nicht und nur gering besammelten Populationen zu erweitern und zusätzlich von den besammelten Populationen weitere Stichproben zu gewinnen. Die bisher gesammelten Stichproben stehen eingefroren für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Zusätzlich sollten aus Thüringen und von Rügen weitere Proben eingeholt werden. Anhand einer größeren Stichprobengröße würden die Ergebnisse durch weitere genetische Analysen und statistische Auswertungen gestärkt werden.

Eventuell ist die Entfernung von Hessen nach Rügen zu gering, um genetische Unterschiede aufzuzeigen. Bei zukünftigen, fortführenden Arbeiten an *C. calceolus* sollten Populationen aus dem Zentrum und anderer Randpopulationen des Verbreitungsareals, vor allem aus Schweden, Polen und Dänemark untersucht und mit denen in dieser Arbeit verglichen werden. Durch die immense Größe des Verbreitungsgebietes ist zu vermuten, dass vielleicht Unterschiede zu weiter entfernten Populationen aufgezeigt werden können.

Die Tabelle 3 zeigt, dass die Optimierungsphase der ISSR-Methode durch die anfangs hohe Anzahl an unterschiedlichen Primer sehr zeitintensiv war. Die Schwierigkeit bestand in der Auswahl optimaler Primer. In der Literatur gab es keine Angaben über die ISSR-Methode an *C. calceolus*. Wie schon einleitend beschrieben, berichteten viele der an dem Frauenschuh forschenden Wissenschaftler über Schwierigkeiten in der Auswertung, was u.a. am großen Genom des Frauenschuhs (OBERDORFER et al. 1983) liegt und an dem geschützten Status. Anhand des geschützten Status ist es sehr schwierig, an Genehmigungen für das Sammeln von Blattmaterial und Samen zu gelangen. Als Orientierung für brauchbare PCR-Ergebnisse aus der ISSR-Methode diente anfänglich das Protokoll nach DOGAN et al. (2010). Dieses Protokoll wurde an das große Genom von *C. calceolus* angepasst. Dies zeigt sich u.a. in der höheren

Menge an Primer und Taq-Polymerase. Zusätzlich wurden die kompletten Einstellungen für den Cycler optimiert, besonders zu sehen in der Erhöhung der Zyklen und der Dauer der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphasen (Tabelle 2). Die Optimierungen wurden natürlich immer nur mit wenigen Proben durchgeführt um das Probenmaterial nicht aufzubrechen. Bei der Durchführung des optimierten Protokolls aller Proben ist darauf zu achten, dass alle Schritte mit den Proben auf Eis und zügig durchgeführt werden müssen, um eine Schmälerung des Ergebnisses zu verhindern.

Wie schon erwähnt, gab es in der Literatur kaum Untersuchungen über die ISSR-Methode am Frauenschuh. Gleichermäßen verhielt es mit Angaben zur SRAP-Methode an *C. calceolus*. Da es keine Versuche mit der SRAP-Methode am Frauenschuh gab, wurde die Arbeit von JIA-LIN et al. (2014) an *Paphiopedilum micranthum* gewählt um diese Methode an *C. calceolus* zu testen. *C. calceolus* und *Paphiopedilum micranthum* sind nach der Systematik in der Familie der Orchidaceae und Unterfamilie Cyripedioideae eingeordnet und besitzen daher einen höheren Verwandtschaftsgrad als andere Arten. Die ausgewählten beiden Primerkombinationen brachten in der SRAP-Versuchsdurchführung keine brauchbaren Ergebnisse. Aus zeitlichen Gründen wurde die SRAP-Methode mit *C. calceolus* abgebrochen. Durch weitere Optimierungsversuche und die Bearbeitung von weiteren Primerkombinationen in zukünftigen Forschungsarbeiten könnten mit *C. calceolus* Ergebnisse erzielt werden.

In der ISSR- und der AFLP-Methode muss darauf geachtet werden, wie die Ergebnisse der ISSR und AFLP gewichtet werden. WINK (2011) schreibt zur ISSR-Methode, im Vergleich zur AFLP-Methode, z.B.: „sie liefert gleiche oder sogar größere Informationen“. Dies liegt daran, dass in der ISSR-Methode die Primersequenz einem bestimmten Abschnitt auf dem DNA-Strang entspricht. Wohingegen in der AFLP-Methode Primer verwendet werden, die nur an die Primerbindungsstellen der Adaptoren binden können, die wiederum nur wahllos an der DNA ligieren (WINK 2011). Dadurch könnten trotz großer Datenmengen aus der AFLP-Methode nur nichtcodierende Regionen der DNA amplifiziert wurden sein und die Aussagekraft der Daten schmälern.

Die Gel-Elektrophorese zeigte ein weiteres Problem auf. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Puffer und das Agarosegel stets erneuert werden. Der gebrauchte Puffer reagierte oft mit dem Agarosegel und schließlich resultierte es in der Vernichtung der Ergebnisse.

Bei der Aussaat und den Kontrollen der Samen ist kaum Schimmelbildung aufgetreten. Das dennoch keine Samen zur Keimung kamen, lässt vermuten, dass das Reifestadium der gesammelten Kapseln schon zu weit vorangeschritten war. Nur unreife, grüne Kapseln sind für

eine Samenkeimung ohne Mykorrhiza-Pilz nutzbar, weil die Testa der Samen in diesem Stadium noch nicht hydrophob ist und eine Nährstoffaufnahme ohne Pilz möglich ist (LIGHT & MACCONAILL 1998, RAMSAY & STEWART 1998, SHEFFERSON et al. 2007). Wahrscheinlich kamen die Samen von *C. calceolus* durch das Überschreiten des Reifestadiums beim Sammeln nicht zur Keimung.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur genetischen Differenzierung und zu wissenschaftsbasierten Aussagemöglichkeiten zur Populationsstärkung von *C. calceolus* gewonnen werden. Die verwendeten Methoden der ISSR und AFLP zeigten eine homogene Verteilung (AFLP) bis geringe Differenzierung (ISSR) in den untersuchten Proben der drei Bundesländer. In der SRAP-Methode konnten jedoch keine Ergebnisse zur genetischen Diversität des Frauenschuhs erzielt werden. Die signifikanten Werte der ISSR-Daten (AMOVA) zeigten eine große genetische Differenzierung auf Individuen- und Populationsebene, aber nur eine kleine Differenzierung auf Regionenebene. Die nicht signifikanten Werte der AFLP-Daten (AMOVA) zeigten keine genetische Differenzierung auf Individuen- und Populationsebene, und nur eine kleine Differenzierung auf Regionenebene. Keine (ISSR, nicht signifikant) bis eine geringe Korrelation (AFLP, signifikant) ergab sich aus der Berechnung zwischen der genetischen mit der geografischen Distanz (Manteltest). Resultierend daraus, zeigt sich eine Diversität innerhalb der Populationen und zwischen den Populationen innerhalb der Regionen (Hessen, Thüringen, Mecklenburg-Vorpommern). Zwischen den Regionen hingegen zeigte sich nur eine geringe Diversität.

Das Thema Populationsstärkung von *C. calceolus* wird in Hessen und anderen Bundesländern schon seit Langem kontrovers diskutiert. Bei diesem Thema zögern Behörden und Botaniker, weil nur wenige Daten über die genetische Diversität des Frauenschuhs bekannt sind. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass anhand der verwendeten genetischen Methoden keine relevanten Unterschiede zwischen den Regionen vorliegen und Populationsstärkungen von *C. calceolus* in Hessen mit Samen aus anderen Populationen in Hessen möglich sind.

7 Literaturverzeichnis

- AAGAARD, J. E., HARROD, R. J. & SHEA, K. L. (1999): Genetic Variation Among Populations of the Rare Clustered Lady-slipper Orchid (*Cypripedium fasciculatum*) from Washington State, USA. – *Natural Areas Journal* 19 (3): 234–238.
- AAVIK, T., EDWARDS, P. J., HOLDEREGGER, R., GRAF, R. & BILLETER, R. (2012): Genetic consequences of using seed mixtures in restoration. A case study of a wetland plant *Lychnis flos-cuculi*. – *Biological Conservation* 145 (1): 195–204.
- ACHTELIK, G. (2006): Molekularbiologische Analyse der genetischen Diversität des *Melitaea athalia/celadussa*-Komplexes (Lepidoptera: *Nymphalidae*) unter Anwendung der ISSR-PCR auf Art-, Unterart- und Populationsebene. – Ruhr-Universität Bochum.
- ALLEN, G. A., ANTOS, J. A., WORLEY, A. C., SUTTILL, T. A. & HEBDA, R. J. (1996): Morphological and genetic variation in disjunct populations of the avalanche lily *Erythronium montanum*. – *Canadian Journal of Botany* 74 (3): 403–412.
- ALLENDORF, F. W. & LUIKART, G. (2007): Conservation and the genetics of populations. – Blackwell, Oxford. 642 pp.
- ANTONELLI, A., JOHAN DAHLBERG, C., CARLGREN, K. H. I. & APPELQVIST, T. (2009): Pollination of the Lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus*) in Scandinavia—taxonomic and conservational aspects. – *Nordic Journal of Botany* 27 (4): 266–273.
- ARDITTI, J. & GHANI, A. K. A. (2000): Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. – *New Phytologist*: 367–421.
- BARTH, U. M. (2007): Artenhilfskonzept für *Cypripedium calceolus* (Frauenschuh) in Hessen. – Unveröffentlichtes Gutachten im Auftrag des Landes Hessen, vertreten durch Hessen-Forst-Forsteinrichtung und Naturschutz.
- BARTH, U. M. & OPITZ, A. (Edit.) (2014): Der Frauenschuh in Hessen. 1. Aufl. – Hessen-Forst - Servicezentrum für Forsteinrichtung und Naturschutz, Gießen. 27 pp.
- BARTH, U. M. & PLOB, E. (2014): Landesmonitoring 2013 des Frauenschuh (*Cypripedium calceolus*) in Hessen (Art des Anhangs II der FFH-Richtlinie). 1. Aufl. – Hessen-Forst - Servicezentrum für Forsteinrichtung und Naturschutz, Gießen.
- BARTISH, I. V., JEPPSSON, N. & NYBOM, H. (1999): Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. – *Molecular ecology* 8 (5): 791–802.
- BENHAM, J., JEUNG, J.-U., JASIENIUK, M., KANAZIN, V. & BLAKE, T. (1999): Genographer: a graphical tool for automated fluorescent AFLP and microsatellite analysis. – *Journal of Agricultural Genomics* 4 (3).
- BENNETT, M. D., BHANDOL, P. & LEITCH, I. J. (2000): Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses—807 New Estimates. – *Annals of Botany* 86 (4): 859–909.
- BENNETT, M. D. & LEITCH, I. J. (1997): Nuclear DNA amounts in angiosperms—583 new estimates. – *Annals of Botany* 80 (2): 169–196.
- BFN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ (2008): Managementempfehlungen für Arten des Anhangs IV der FFH-Richtlinie. Frauenschuh - *Cypripedium calceolus*. Verbreitung des Frauenschuhs inklusive Hinweise auf Schwerpunktorkommen. <http://www.ffh-anhang4.bfn.de/ffh-anhang4-frauenschuh.html> (29.05.16).

- BFN - BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ /BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT (2013): Nationaler Bericht Deutschlands nach Art. 17 FFH-Richtlinie; basierend auf Daten der Länder und des Bundes. Datengrundlage: Verbreitungsdaten der Bundesländer und des BfN. www.bfn.de/0316_bericht2013.html (25.05.2016).
- BILZ, M., KELL, S. P., MAXTED, N. & LANSDOWN, R. V. (Edit.) (2011): European Red List of Vascular Plants. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- BMUB - BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT, NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT (2007): Biologische Vielfalt in Deutschland - Bericht über den Zustand von Arten und Lebensräumen nach der EU-Naturschutzrichtlinie (FFH-Richtlinie). Online verfügbar unter: <http://www.bmub.bund.de/themen/natur-arten-tourismussport/naturschutz-biologische-vielfalt/natura-2000/biologische-vielfalt-in-deutschland-bericht-ueber-den-zustand-von-arten-und-lebensraeumen-nach-der-eu-naturschutzrichtlinie-ffh-richtlinie/> (18.05.2016).
- BORNBUSCH, A. H., SWENDER, L. A. & HOOGERWERF, D. L. (1994): Genetic variation in Massachusetts populations of *Cypripedium arietinum* R. Brown in Ait. and *C. acaule* Ait. (Orchidaceae). – *Rhodora*: 354–369.
- BRADEEN, J. M., BACH, I. C., BRIARD, M., LE CLERC, V., GRZEBELUS, D., SENALIK, D. A. & SIMON, P. W. (2002): Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild *Daucus* populations reveals a genetically nonstructured composition. – *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127 (3): 383–391.
- BROWN, J. H., STEVENS, G. C. & KAUFMAN, D. M. (1996): The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. – *Annual review of ecology and systematics*: 597–623.
- BROWN, R. W. & AMACHER, M. C. (1999): Selecting plant species for ecological restoration: a perspective for land managers. – *Proceedings: Revegetation with native species*. Ogden, UT, USA: US Department of Agriculture Forest Service, Rocky Mountain Research Station: 1–16.
- BROYLES, S. (1998): Postglacial migration and the loss of allozyme variation in northern populations of *Asclepias exaltata* (Asclepiadaceae). – *American Journal of Botany* 85 (8): 1091.
- BRUNZEL, S. (2009): „Erhaltung und Vermarktung `vergessener` Zier- und Arzneipflanzen sowie stark gefährdeter Anhang-II-Pflanzenarten der FFH- Richtlinie der Europäischen Union (23.09.16).
- BRUNZEL, S. (2010): Ex-situ-Kultivierung und In-situ-Management als Beitrag zum Artenschutz. Am Beispiel von Frauenschuh (*Cypripedium calceolus*), Sumpf-Gladiole (*Gladiolus palustris*), Böhmischer Enzian (*Gentianella bohemica*) und Karpaten-Enzian (*Gentianella lutescens*). – *Naturschutz und Landschaftsplanung* 42 (5): 148–156.
- BRZOSKO, E., RATKIEWICZ, M. & WRÓBLEWSKA, A. (2002): Allozyme differentiation and genetic structure of the Lady's slipper (*Cypripedium calceolus*) island populations in north-east Poland. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 138 (4): 433–440.
- BRZOSKO, E., WRÓBLEWSKA, A., RATKIEWICZ, M., TILL-BOTTRAUD, I., NICOLE, F. & BARANOWSKA, U. (Edit.) (2009): Genetic diversity of *Cypripedium calceolus* at the edge and in the centre of its range in Europe. 46. Aufl. – *BioOne*. 201–214.
- BRZOSKO, E., WRÓBLEWSKA, A., TAŁAJ, I. & WASILEWSKA, E. (2011): Genetic diversity of *Cypripedium calceolus* in Poland. – *Plant Systematics and Evolution* 295 (1-4): 83–96.
- BRZOSKO, E. & WRÓBLEWSKA, A. D. (2003): Genetic variation and clonal diversity in island *Cephalanthera rubra* populations from the Biebrza National Park, Poland. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 143 (1): 99–108.

- BUDAK, H., SHEARMAN, R. C., PARMAKSIZ, I., GAUSSOIN, R. E., RIORDAN, T. P. & DWEIKAT, I. (2004): Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. – *Theoretical and applied genetics* 108 (2): 328–334.
- CAI, X., FENG, Z., ZHANG, X., XU, W., HOU, B. & DING, X. (2011): Genetic diversity and population structure of an endangered Orchid (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) from China revealed by SRAP markers. – *Scientia Horticulturae* 129 (4): 877–881.
- CASE, M. A. (1994): Extensive variation in the levels of genetic diversity and degree of relatedness among five species of *Cypripedium* (Orchidaceae). – *American Journal of Botany*: 175–184.
- CASE, M. A., MLODOZENIEC, H. T., WALLACE, L. E. & WELDY, T. W. (1998): Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky lady's slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae). – *American Journal of Botany* 85 (12): 1779–1786.
- CHASE, M. W., CAMERON, K. M., BARRETT, R. L. & FREUDENSTEIN, J. V. (2003): DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. – *Orchid conservation* 69: 89.
- CHASE, M. W. & HILLS, H. H. (1991): Silica Gel. An Ideal Material for Field Preservation of Leaf Samples for DNA Studies. – *Taxon* 40 (2): 215.
- CHOCHAI, A. (2014): Phylogenetics, genome size evolution and population genetics of slipper orchids in the subfamily cypridioideae (orchidaceae).
- COMES, H. P. & KADEREIT, J. W. (1998): The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. – *Trends in plant science* 3 (11): 432–438.
- COZZOLINO, S. & WIDMER, A. (2005): Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? – *Trends in Ecology & Evolution* 20 (9): 487–494.
- CRIBB, P. (1997): *The genus Cypripedium*. – Timber Press.
- CRIBB, P. (2014): Slipper orchids in art and science. – *Lankesteriana* 13 (3).
- DANNEMANN, A. (2000): Der Einfluss von Fragmentierung und Populationsgröße auf die genetische Variation und Fitness von seltenen Pflanzenarten am Beispiel von *Biscutella laevigata* (Brassicaceae).
- DARWIN, C. (1862): The various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects.
- DAUMANN, E. (1968): Zur Bestäubungsökologie von *Cypripedium calceolus* L. – *Österreichische Botanische Zeitschrift* 115 (4-5): 434–446.
- DEN VIRTUELLA FLORAN: Verbreitung von *Cypripedium calceolus* auf der Nordhalbkugel. <http://linnaeus.nrm.se/flora/mono/orchida/cypri/cyprcal.html> (25.05.2016).
- DER RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (1992): RICHTLINIE 92/43/EWG DES RATES vom 21. Mai 1992 zur Erhaltung der natürlichen Lebensräume sowie der wildlebenden Tiere und Pflanzen. – *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, Reihe L* 206: 7–50.
- DEVILLERS-TERSCHUREN, J. (1999): Action plan for *Cypripedium calceolus* in Europe. – Council of Europe.
- DING, G., ZHANG, D., DING, X., ZHOU, Q., ZHANG, W. & LI, X. (2008): Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* based on SRAP analysis. – *Plant Systematics and Evolution* 276 (3-4): 149–156.

- DINIZ-FILHO, J. A. F., SOARES, T. N., LIMA, J. S., DOBROVOLSKI, R., LANDEIRO, V. L., TELLES, MARIANA PIRES DE CAMPOS, RANGEL, T. F. & BINI, L. M. (2013): Mantel test in population genetics. – *Genetics and Molecular Biology* 36 (4): 475–485.
- DIXON, P. (2003): VEGAN, a package of R functions for community ecology. – *Journal of Vegetation Science* 14 (6): 927–930.
- DOGAN, B., DURAN, A., BAGCI, Y., DINC, M., MARTIN, E., CETIN, O. & OZTURK, M. (2010): Phylogenetic relationships among the taxa of the genus *Johrenia* DC.(Apiaceae) from Turkey based on molecular method. – *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy* 17 (2): 113–120.
- DONATH, W. T. & ECKSTEIN, R. L. (2008): Bedeutung genetischer Faktoren für die Wiederansiedlung seltener Pflanzengemeinschaften – Genetische Diversität in der Praxis des Naturschutzes. – *Naturschutz und Landschaftsplanung* 40: 21–25.
- DURKA, W., MICHALSKI, S. G., BERENDZEN, K. W., BOSSDORF, O., BUCCHAROVA, A., HERMANN, J., HÖLZEL, N. & KOLLMANN, J. (2016): Genetic differentiation within multiple common grassland plants supports seed transfer zones for ecological restoration. – *Journal of Applied Ecology*.
- EARL, D. A. & VONHOLDT, B. M. (2012): STRUCTURE HARVESTER. A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. – *Conservation Genet Resour* 4 (2): 359–361.
- ECCARIUS, W. (2009): Orchideengattung *Cypripedium*. – *EchinoMedia*.
- ECCARIUS, W. (2010): Zur Geschichte des Frauenschuhs (*Cypripedium calceolus*) - von den Anfängen bis Carl von LINNÉ (1707-1778) (67): 16–19.
- ECKERT, C. G., SAMIS, K. E. & LOUGHEED, S. C. (2008): Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. – *Molecular ecology* 17 (5): 1170–1188.
- EDMANDS, S. (2007): Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. – *Molecular ecology* 16 (3): 463–475.
- ELLENBERG, H., WEBER, H. E., DULL, R., WIRTH, V., WERNER, W. & PAULISSEN, D. (1991): Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. – *Scripta Geobotanica* 18: 248.
- ELLSTRAND, N. C. & ELAM, D. R. (1993): Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. – *Annual review of ecology and systematics*: 217–242.
- ERNEBERG, M. & HOLM, B. (1999): Bee size and pollen transfer in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). – *Nordic Journal of Botany* 19 (3): 363–367.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software structure. A simulation study. – *Mol Ecol* 14 (8): 2611–2620.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. (2010): Arlequin suite ver 3.5. A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. – *Molecular Ecology Resources* 10 (3): 564–567.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. (1992): Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. – *Genetics* 131 (2): 479–491.

- FAY, M. F., BONE, R., COOK, P., KAHANDAWALA, I. M., GREENSMITH, J., HARRIS, S., PEDERSEN, H. A. E., INGROUILLE, M. J. & LEXER, C. (2009): Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. – *Ann. Bot.* 104 (3): 517–525.
- FAY, M. F., COWAN, R. S. & LEITCH, I. J. (2005): The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. – *Ann. Bot.* 95 (1): 237–246.
- FENSTER, C. B. & GALLOWAY, L. F. (2000): Inbreeding and outbreeding depression in natural populations of *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). – *Conservation Biology* 14 (5): 1406–1412.
- FISCHER, M. & MATTHIES, D. (1998): RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). – *American Journal of Botany* 85 (6): 811.
- FRANKHAM, R., BRISCOE, D. A. & BALLOU, J. D. (2002): Introduction to conservation genetics. – Cambridge University Press.
- FROSCH, W. (1982): Beseitigung der durch die innere Hülle bedingten Keimhemmung bei europäischen Orchideen. – *Orchidee* 33 (4): 145–146.
- FUCHS, A. & ZIEGENSPECK, H. (1926): Entwicklungsgeschichte der Axen der einheimischen Orchideen und ihre Physiologie und Biologie. 1. Teil. *Cypripedium, Helleborine, Limodorum, Cephalantera*. [Sonderdr.]. – Mez, Königsberg. S. 165 - 260.
- GARCIA, M. B. (2008): Life history and population size variability in a relict plant. Different routes towards long-term persistence. – *Diversity and Distributions* 14 (1): 106–113.
- GARIBALDI, L. A., STEFFAN-DEWENTER, I., WINFREE, R., AIZEN, M. A., BOMMARCO, R., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., CARVALHEIRO, L. G., HARDER, L. D. & AFIK, O. (2013): Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. – *Science* 339 (6127): 1608–1611.
- GARVE, E. (1994): Atlas der gefährdeten Farn- und Blütenpflanzen in Niedersachsen und Bremen: Kartierung 1982-1992. – Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, Abt. Naturschutz.
- GATHMANN, A. & TSCHARNTKE, T. (2002): Foraging ranges of solitary bees. – *Journal of animal ecology* 71 (5): 757–764.
- GEBAUER, G., PREISS, K. & GEBAUER, A. C. (2016): Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. – *New Phytologist*.
- GEORGE, S., SHARMA, J. & YADON, V. L. (2009): Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. – *American Journal of Botany* 96 (11): 2022–2030.
- GIJBELS, P., HERT, K. de, JACQUEMYN, H. & HONNAY, O. (2015): Reduced fecundity and genetic diversity in small populations of rewarding versus deceptive orchid species: a meta-analysis. – *Plant Ecology and Evolution* 148 (2): 153–159.
- GODWIN, I. D., AITKEN, E. A. B. & SMITH, L. W. (1997): Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. – *Electrophoresis* 18 (9): 1524–1528.
- GRABNER, U. (2012): Frauenschuh *Cypripedium calceolus*. Orchidee des Jahres 1996 und 2010. http://www.aho-bayern.de/taxa/cy_calc.html (24.08.16).
- GRELL, E. (2010): Duft und natürliche Bestäubung von *Cypripedien: Cypripedium calceolus*. – *Orchideen Zeitschrift* (1): 28–32.

- GROSSMANN, H. (1976): Flora vom Rheingau: ein Verzeichnis der Blütenpflanzen und Farne sowie ihrer Fundorte. – Senckenberg-Buch 55; Kramer, W. Frankfurt/M. 1.
- GROSSWALD, M. G. (1980): Late Weichselian ice sheet of northern Eurasia. – Quaternary Research 13 (1): 1–32.
- GUO, Y.-Y., LUO, Y.-B., LIU, Z.-J. & WANG, X.-Q. (2012): Evolution and biogeography of the slipper orchids: Eocene vicariance of the conduplicate genera in the Old and New World tropics. – PloS one 7 (6): e38788.
- GUPTA, M., CHYI, Y.-S., ROMERO-SEVERSON, J. & OWEN, J. L. (1994): Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. – Theoretical and applied genetics 89 (7-8): 998–1006.
- HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. (1989): Allozyme diversity in plant species. In 'Plant population genetics, breeding and genetic resources'. (Eds.: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, B.S. Weir) pp. 43–63.
- HAMRICK, J. L. & GODT, M. J. (1996): Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. – Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 351 (1345): 1291–1298.
- HÄNSEL, R., KELLER, K., RIMPLER, H. & SCHNEIDER, G. (Edit.) (1992): Drogen A-D. 5., vollständig neubearbeitete Auflage. – Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l. 1209 pp.
- HEIN, C. & MEYSEL, F. (2010): Verbreitung, Ökologie, Gefährdung und Management des Frauenschuh (*Cypripedium calceolus* L., Orchidaceae) in Sachsen-Anhalt. – Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid.(Koblenz) 27 (1): 6–50.
- HEINKEN, T. (2009): Populationsbiologische und genetische Konsequenzen von Habitatfragmentierung bei Pflanzen – wissenschaftliche Grundlagen für die Naturschutzpraxis. – Tuexenia 29: 305–329.
- HEINKEN, T. & WEBER, E. (2013): Consequences of habitat fragmentation for plant species: Do we know enough? – Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 15 (4): 205–216.
- HEINRICH, W. & LORENZ, R. (1996): Frauenschuh (*Cypripedium calceolus* L.): die Orchidee des Jahres 1996. – Ber. Arbeitskr. Heim. Orch 13 (1): 61–93.
- HEINRICH, W., VOELCKEL, H., DIETRICH, H., FELDMANN, R., GEITHNER, A., KÖGLER, V., RODE, P. & WESTHUS, W. (2014): Thüringens Orchideen. – Arbeitskreis Heimische Orchideen Thüringen e.V, Uhlstädt-Kirchhasel. 864 pp.
- HEMM, K. (2008): Rote Liste der Farn- und Samenpflanzen Hessens. – Hessisches Ministerium für Umwelt, ländlichen Raum und Verbraucherschutz.
- HENDRY, A. P. & TAYLOR, E. B. (2004): How much of the variation in adaptive divergence can be explained by gene flow? an evaluation using lake-stream stickleback pairs. – Evolution 58 (10): 2319–2331.
- HEREFORD, J. (2009): A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs. – The American Naturalist 173 (5): 579–588.
- HEWITT, G. M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. – Biological journal of the Linnean Society 58 (3): 247–276.

- HOLLINGSWORTH, M. L., HOLLINGSWORTH, P. M., JENKINS, G. I., BAILEY, J. P. & FERRIS, C. (1998): The use of molecular markers to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae). – *Molecular ecology* 7 (12): 1681–1691.
- HOLSINGER, K. E. & WEIR, B. S. (2009): Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. – *Nature Reviews Genetics* 10 (9): 639–650.
- HONNAY, O. & BOSSUYT, B. (2005): Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? – *Oikos* 108 (2): 427–432.
- HOU, Y. & LOU, A. (2011): Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). – *PloS one* 6 (9): e24497.
- HUGHES, A. R., INOUE, B. D., JOHNSON, M. T. J., UNDERWOOD, N. & VELLEND, M. (2008): Ecological consequences of genetic diversity. – *Ecology letters* 11 (6): 609–623.
- HULTÉN, E. & FRIES, M. (1986): Atlas of North European vascular plants (North of the Tropic of Cancer), Vols. I-III. – Koeltz scientific books.
- IRMISCH, T. (1853): Morphologie und Biologie der Orchideen. – A. Abel, Leipzig, Germany.
- JACOB, F., JÄGER, E. J. & OHMANN, E. (1994): Botanik. 4. Aufl. – Gustav Fischer Verlag, Jena.
- JACQUEMYN, H., BRYNS, R., VANDEPITTE, K., HONNAY, O., ROLDÁN-RUIZ, I. & WIEGAND, T. (2007): A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. – *New Phytologist* 176 (2): 448–459.
- JAGEL, A. & MARGENBURG, B. (2011): Frauenschuh–*Cypripedium calceolus* (Orchidaceae), Orchidee des Jahres 2010. – *Jahrbuch des Bochumer Botanischen Vereins*. Bd. 2,: 187–191.
- JÄGER, E. J., WESCHE, K., RITZ, C., MÜLLER, F. & WELK, E. (2013): Rothmaler-Exkursionsflora von Deutschland, Gefäßpflanzen: Atlasband. – Springer-Verlag.
- JARVIS, C. & CRIBB, P. (2009): Linnaean sources and concepts of orchids. – *Annals of Botany* 104 (3): 365–376.
- JERSÁKOVÁ, J., JOHNSON, S. D. & KINDLMANN, P. (2006): Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. – *Biological Reviews* 81 (02): 219–235.
- JESCHKE, L. (1964): Die Vegetation der Stubnitz (Naturschutzgebiet Jasmund auf der Insel Rügen). – Institut für Landesforschung und Naturschutz Halle/Saale.
- JIA-LIN, H., SHU-YUN L.I. & HONG, H. U. (2014): ISSR and SRAP Markers Reveal Genetic Diversity and Population Structure of an Endangered Slipper Orchid *Paphiopedilum micranthum* (Orchidaceae).
- JOHNSON, R., STRITCH, L., OLWELL, P., LAMBERT, S., HORNING, M. E. & CRONN, R. (2010): What are the best seed sources for ecosystem restoration on BLM and USFS lands? – *Native Plants Journal* 11 (2): 117–131.
- JONES, T. A. (2013): When local isn't best. – *Evolutionary applications* 6 (7): 1109–1118.
- JÜRGENS, A. H., SEITZ, B. & KOWARIK, I. (2007): Genetic differentiation of *Rosa canina* (L.) at regional and continental scales. – *Plant Systematics and Evolution* 269 (1-2): 39–53.
- KADEREIT, J. W., KÖRNER, C., KOST, B. & SONNEWALD, U. (2014): Strasburger– Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften. – Springer-Verlag.
- KAHANDAWALA, I. M. (2009): Genome size evolution and conservation genetics of *Cypripedium* (Orchidaceae).

- KARRON, J. D. (1987): The pollination ecology of co-occurring geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). – *Biological Conservation* 39 (3): 179–193.
- KAWECKI, T. J. & EBERT, D. (2004): Conceptual issues in local adaptation. – *Ecology letters* 7 (12): 1225–1241.
- KAYE, T. N. (2001): Common ground and controversy in native plant restoration: the SOMS debate, source distance, plant selections, and a restoration-oriented definition of native. – *Native plant propagation and restoration strategies*. Corvallis (OR): Nursery Technology Cooperative and Western Forestry and Conservation Association. p: 5–12.
- KELLER, M., KOLLMANN, J. & EDWARDS, P. J. (2000): Genetic introgression from distant provenances reduces fitness in local weed populations. – *Journal of Applied Ecology* 37 (4): 647–659.
- KENNEDY, A. H. & WALKER, G. L. (2007): The population genetic structure of the showy lady's-slipper orchid (*Cypripedium reginae* Walter) in its glaciated and unglaciated ranges. – *Castanea* 72 (4): 248–261.
- KETTENRING, K. M., MERCER, K. L., REINHARDT ADAMS, C. & HINES, J. (2014): Application of genetic diversity–ecosystem function research to ecological restoration. – *Journal of Applied Ecology* 51 (2): 339–348.
- KLEMPERER, G. & ROST, E. (1929): *Handbuch der Allgemeinen und Speziellen Arzneiverordnungslehre für Ärzte. Mit Besonderer Berücksichtigung der Deutschen Arzneimittel-Gesetzgebung. Fünfzehnte Gänzlich Umgearbeitete Auflage.* – Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l. 944 pp.
- KLINGENSTEIN, F., VON DEN DRIESCH, M. & LOBIN, W. (2002): Bedeutung und Aktivitäten der Botanischen Gärten im ex-situ-und in-situ-Artenschutz in Deutschland auf Grundlage der Biodiversitäts-Konvention. – Scherer-Lorenzen, M.[Bearb.]: *Analyse der Artenschutzprogramme für Pflanzen in Deutschland.*-Schriftenreihe f. Vegetationskunde 36: 139–150.
- KLOSTERMANN, J. (2009): *Das Klima im Eiszeitalter. Mit 7 Tabellen. 2., völlig neu bearb. Aufl.* – Schweizerbart, Stuttgart.
- KÖNIG, A. O., ZIEGENHAGEN, B., VAN DAM, B. C., CSAIKL, U. M., COART, E., DEGEN, B., BURG, K., VRIES, S. M. de & PETIT, R. J. (2002): Chloroplast DNA variation of oaks in western Central Europe and genetic consequences of human influences. – *Forest Ecology and Management* 156 (1): 147–166.
- KORSCH, H., WESTHUS, W. & ZÜNDORF, H.-J. (2002): *Verbreitungsatlas der Farn-und Blütenpflanzen Thüringens.* – Weissdorn-Verlag.
- KULL, T. (1988): Identification of clones in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). – *Á Proc. Est. Acad. Sci. Biol* 37.
- KULL, T. (1995): Genet and ramet dynamics of *Cypripedium calceolus* in different habitats. – *Abstracta Botanica*: 95–104.
- KULL, T. (1998): Fruit-set and recruitment in populations of *Cypripedium calceolus* L. in Estonia. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 126 (1-2): 27–38.
- KULL, T. (1999): *Cypripedium calceolus* L. – *Journal of Ecology* 87 (5): 913–924.
- KULL, T. & KULL, K. (1991): Preliminary results from a study of populations of *Cypripedium calceolus* in Estonia: 69–76.

- KULL, T. & PAAVER, T. (1997): Patterns of Aspartate Aminotransferase Variation in Relation to Population Size, Founder Effect, and Phylogeographic. - In Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Biology and Ecology. Vol. 46. – Estonian Academy Publishers. 4-11.
- KUTSCHER, M. (1997): Die Orchideen der Insel Rügen. – Ber. Arbeitskrs. Heim. Orchid. 14 (1): 83–101.
- LEIMU, R. & FISCHER, M. (2008): A meta-analysis of local adaptation in plants. – PloS one 3 (12): e4010.
- LEITCH, I. J., KAHANDAWALA, I. M., SUDA, J., HANSON, L., INGROUILLE, M. J., CHASE, M. W. & FAY, M. F. (2009): Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. – Ann. Bot. 104 (3): 469–481.
- LI, G. & QUIROS, C. F. (2001): Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. – Theoretical and applied genetics 103 (2-3): 455–461.
- LI, X. Y., LI, J., ZHAO, Z. J., YANG, F., FU, Q. W., LIU, H. S., WANG, D. D., YANG, Y. C. & WANG, R. Y. (2014): Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) for studying genetic diversity and population structure of plants and other living organisms: a protocol. – The Journal of Animal & Plant Sciences 24 (5): 1478–1486.
- LIENERT, J. (2004): Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations—a review. – Journal for nature conservation 12 (1): 53–72.
- LIESEBACH, H. (2012): Genotypisierung mit nuklearen Mikrosatellitenmarkern—Möglichkeiten der Datenauswertung am Beispiel von Buchenpopulationen (*Fagus sylvatica* L.) aus einem Herkunftsversuch. – Landbauforsch 62 (4): 221–236.
- LIGHT, M. H. & MACCONAILL, M. (1998): Factors affecting germinable seed yield in *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Willd.) Correll and *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae). – Botanical Journal of the Linnean Society 126 (1-2): 3–26.
- LINHART, Y. B. & GRANT, M. C. (1996): Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. – Annual review of ecology and systematics: 237–277.
- LOHR, M. (2013): Zur Bestäubungsökologie des Frauenschuh (*Cypripedium calceolus*) im Weserbergland (Orchidaceae Insecta: Hymenoptera).
- LORENZ, R. (2010): Die Orchideen der FFH-Richtlinie 92/43/EWG (Anhang II und IV) in Südtirol (Italien). – Gredleriana 10: 137–162.
- LUCKE, E. (1982): Samenstruktur und Samenkeimung europäischer Orchideen nach Veyret sowie weitere Untersuchungen. – Orchidee (33): 8–14.
- LUDWIG, G., MAY, R. & OTTO, C. (2007): Verantwortlichkeit Deutschlands für die weltweite Erhaltung der Farn-und Blütenpflanzen: vorläufige Liste. – BfN Bonn–Bad Godesberg.
- LUDWIG, G., SCHNITTLER, M. & VOLLMER, I. (1996): Rote Liste gefährdeter Pflanzen Deutschlands. – Bundesamt für Naturschutz Bonn-Bad Godesberg.
- LYNCH, M. (1991): The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. – Evolution: 622–629.
- LYNCH, M. & MILLIGAN, B. G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. – Molecular ecology 3 (2): 91–99.
- MACHON, N., BARDIN, P., MAZER, S. J., MORET, J., GODELLE, B. & AUSTERLITZ, F. (2003): Relationship between genetic structure and seed and pollen dispersal in the endangered orchid *Spiranthes spiralis*. – New Phytologist 157 (3): 677–687.

- MALMGREN, S. (1992): Large scale asymbiotic propagation of *Cypripedium calceolus*-plant physiology from a surgeon's point of view. – Botanic gardens Micropropagation news.
- MANNERS, V., KUMARIA, S. & TANDON, P. (2013): SPAR methods revealed high genetic diversity within populations and high gene flow of *Vanda coerulea* Griff ex Lindl (Blue Vanda), an endangered orchid species. – Gene 519 (1): 91–97.
- MARIETTE, S., LE CORRE, V., AUSTERLITZ, F. & KREMER, A. (2002): Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. – Molecular ecology 11 (7): 1145–1156.
- MCGREGOR, C. E., LAMBERT, C. A., GREYLING, M. M., LOUW, J. H. & WARNICH, L. (2000): A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. – Euphytica 113 (2): 135–144.
- MIJANGOS, J. L., PACIONI, C., SPENCER, P. & CRAIG, M. D. (2015): Contribution of genetics to ecological restoration. – Molecular ecology 24 (1): 22–37.
- MONTALVO, A. M. & ELLSTRAND, N. C. (2001): Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae). – American Journal of Botany 88 (2): 258–269.
- MÜLHARDT, C. (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. – Springer.
- MULLER, M.-H., PROSPERI, J. M., SANTONI, S. & RONFORT, J. (2003): Inferences from mitochondrial DNA patterns on the domestication history of alfalfa (*Medicago sativa*). – Molecular ecology 12 (8): 2187–2199.
- MÜLLER, C. M., KRÖNING, P., WISSEMANN, V. & GEMEINHOLZER, B. (2016): Kann genetische Diversität in Botanischen Gärten ex-situ bewahrt werden? - In Treffpunkt Biologische Vielfalt XV. Interdisziplinärer Forschungsaustausch im Rahmen des Übereinkommens über die biologische Vielfalt. – Bundesamt für Naturschutz, Bonn. Online-Ressource.
- MÜLLER, H. (1873): Die Befruchtung der Blumen durch Insekten und die gegenseitigen Anpassungen beider: ein Beitrag zur Erkenntniss des ursächlichen Zusammenhanges in der organischen Natur. – Engelmann.
- MÜLLER, K. (2012): Die Bedeutung von Blühflächen und Magerrasen als Nisthabitat für Insekten unter besonderer Berücksichtigung bodennistender Bienen. – Bachelor-Thesis, angefertigt am Lehrstuhl für Tierökologie und Tropenbiologie im Studiengang Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- NEWMAN, B. J., LADD, P., BRUNDRETT, M. & DIXON, K. W. (2013): Effects of habitat fragmentation on plant reproductive success and population viability at the landscape and habitat scale. – Biological Conservation 159: 16–23.
- NICOLE, F., BRZOSKO, E. & TILL-BOTTRAUD, I. (2005): Population viability analysis of *Cypripedium calceolus* in a protected area: longevity, stability and persistence. – Journal of Ecology 93 (4): 716–726.
- NILSSON, L. A. (1979): Anthecological studies on the Lady's Slipper, *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). – Bot. Notiser 132 (3): 329–347.
- NITSCH, J. P. & NITSCH, C. (1969): Haploid plants from pollen grains. – Science 163 (3862): 85–87.
- NYBOM, H. (2004): Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. – Molecular ecology 13 (5): 1143–1155.

- OBERDORFER, E., MÜLLER, T. & KORNECK, D. (1983): Pflanzensoziologische Exkursionsflora. 5., überarb. und erg. Aufl. – Ulmer, Stuttgart. 1051 pp.
- OKSANEN, J., KINDT, R., LEGENDRE, P., O’HARA, B. & STEVENS, M. H. H. (2008): The vegan package. – Community ecology package 10.
- PEAKALL, R. O. & SMOUSE, P. E. (2006): genalex 6. Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. – Mol Ecol Notes 6 (1): 288–295.
- PEDERSEN, H. A. E., RASMUSSEN, H. N., KAHANDAWALA, I. M. & FAY, M. F. (2012): Genetic diversity, compatibility patterns and seed quality in isolated populations of *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). – Conservation Genetics 13 (1): 89–98.
- PEMBERTON, R. W. (2013): Pollination of slipper orchids (Cypripedioideae): a review. – Lankesteriana.
- POTTS, S., ROBERTS, S., DEAN, R., MARRIS, G., BROWN, M., JONES, R., NEUMANN, P. & SETTELE, J. (2010): Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. – J. of Api. Res 49 (1): 15.
- PRASSE, R., KUNZMANN, D. & SCHRÖDER, R. (2010): Entwicklung und praktische Umsetzung naturschutzfachlicher Mindestanforderungen an einen Herkunftsnachweis für gebietseigenes Wildpflanzensaatgut krautiger Pflanzen: Abschlussbericht. – Univ., Inst. für Umweltplanung.
- PRENDERGAST, G. (2010): In vitro-Vermehrung von *Cypripedium calceolus*. – Orchideen Zeitschrift (1): 42–45.
- PRIMACK, R. & STACY, E. (1998): Cost of reproduction in the pink lady's slipper orchid (*Cypripedium acaule*, Orchidaceae): an eleven-year experimental study of three populations. – American Journal of Botany 85 (12): 1672–1679.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. – Genetics 155:945–959.
- PRITZEL, G. A. (1882): Die deutschen Volksnamen der Pflanzen: neuer Beitrag zum deutschen Sprachschätze. – Cohen.
- RAMSAY, M. M. & STEWART, J. (1998): Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. – Botanical Journal of the Linnean Society 126 (1-2): 173–181.
- RASMUSSEN, K. K. & KOLLMANN, J. (2008): Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree (*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction. – Conservation Genetics 9 (6): 1533–1539.
- RASPÉ, O. & JACQUEMART, A.-L. (1998): Allozyme diversity and genetic structure of European populations of *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae: Maloideae). – Heredity 81 (5): 537–545.
- REED, D. H. & FRANKHAM, R. (2001): How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? a meta-analysis. – Evolution 55 (6): 1095–1103.
- REHM, E. M., OLIVAS, P., STROUD, J. & FEELEY, K. J. (2015): Losing your edge: climate change and the conservation value of range-edge populations. – Ecology and Evolution 5 (19): 4315–4326.
- REINHARD, H. R., GÖLZ, P., PETER, R. & WILDERMUTH, H. (1991): Die Orchideen der Schweiz und angrenzender Gebiete. – Fotorotar AG, Druck + Verlag.

- RICHARDS, C. M. (2000): Genetic and demographic influences on population persistence: gene flow and genetic rescue in *Silene alba*. – Conservation Biology Series-Cambridge-: 271–292.
- ROBERTS, D. L. & DIXON, K. W. (2008): Orchids. – Current Biology 18 (8): R325-R329.
- RONG, J., JANSON, S., UMEHARA, M., ONO, M. & VRIELING, K. (2010): Historical and contemporary gene dispersal in wild carrot (*Daucus carota* ssp. *carota*) populations. – Annals of Botany: 285–296.
- ROSENBERG, N. A. (2004): DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. – Molecular Ecology Notes 4 (1): 137–138.
- SACKVILLE HAMILTON, N. R. (2001): Is local provenance important in habitat creation? A reply. – Journal of Applied Ecology 38 (6): 1374–1376.
- SADOVSKÝ, O. (1973): Orchideen im eigenen Garten. 3. Aufl. – BLV-Verlagsgesellschaft, München, Bern, Wien. 159 S.
- SAGARIN, R. D. & GAINES, S. D. (2002): The ‘abundant centre’ distribution: to what extent is it a biogeographical rule? – Ecology letters 5 (1): 137–147.
- SCHMALLE, H. & HAUSEN, B. M. (1979): A new sensitizing quinone from lady slipper (*Cypripedium calceolus*). – Naturwissenschaften 66 (10): 527–528.
- SEXTON, J. P., MCINTYRE, P. J., ANGERT, A. L. & RICE, K. J. (2009): Evolution and ecology of species range limits.
- SEYBOLD, S. (2011): Schmeil-Fitschen—Die Flora Deutschlands und der angrenzenden Länder. – Quelle & Meyer, Wiebelsheim.
- SHARMA, S. K., KUMARIA, S., TANDON, P. & RAO, S. R. (2013): Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). – J. Plant Biochem. Biotechnol. 22 (2): 250–255.
- SHEFFERSON, R. P., KULL, T. & TALI, K. (2005a): Adult whole-plant dormancy induced by stress in long-lived orchids. – Ecology 86 (11): 3099–3104.
- SHEFFERSON, R. P., TAYLOR, D. L., WEISS, M., GARNICA, S., MCCORMICK, M. K., ADAMS, S., GRAY, H. M., MCFARLAND, J. W., KULL, T. & TALI, K. (2007): The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids. – Evolution 61 (6): 1380–1390.
- SHEFFERSON, R. P., WARREN, R. J. & PULLIAM, H. R. (2014): Life-history costs make perfect sprouting maladaptive in two herbaceous perennials. – Journal of Ecology 102 (5): 1318–1328.
- SHEFFERSON, R. P., WEISS, M., KULL, T. & TAYLOR, D. L. (2005b): High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. – Mol. Ecol. 14 (2): 613–626.
- SHIM, S. I. & JØRGENSEN, R. B. (2000): Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. – Theoretical and applied genetics 101 (1-2): 227–233.
- ŠMÍDOVÁ, A., MÜNZZBERGOVÁ, Z. & PLAČKOVÁ, I. (2011): Genetic diversity of a relict plant species, *Ligularia sibirica* (L.) Cass. (Asteraceae). – Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants 206 (2): 151–157.
- SOMERVILLE, C. & SOMERVILLE, S. (1999): Plant functional genomics. – Science 285 (5426): 380–383.

- STANTON, M. L., GALEN, C. & SHORE, J. (1997): Population structure along a steep environmental gradient: consequences of flowering time and habitat variation in the snow buttercup, *Ranunculus adoneus*. – *Evolution*: 79–94.
- STERN, W. (2006): Der Frauenschuh (*Cypripedium calceolus* L.) in Niedersachsen. – Arbeitskreis Heimische Orchideen Niedersachsen e. V.: 25 Jahre AHO Niedersachsen: 23–27.
- STORCH, V., WELSCH, U. & WINK, M. (2013): Evolutionsbiologie. 3., überarb. und aktual. Aufl. – Springer Berlin, Berlin. 579 pp.
- TACKENBERG, O. (2001): Methoden zur Bewertung gradueller Unterschiede des Ausbreitungspotentials von Pflanzenarten.
- THOMÉ, O. W. (1885): Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz.
- TRAILL, L. W., BRADSHAW, C. J. A. & BROOK, B. W. (2007): Minimum viable population size: a meta-analysis of 30 years of published estimates. – *Biological Conservation* 139 (1): 159–166.
- TSUMURA, Y., OHBA, K. & STRAUSS, S. H. (1996): Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). – *Theoretical and applied genetics* 92 (1): 40–45.
- VAN GROENENDAEL, J. M., KLIMES, L., KLIMESOVA, J. & HENDRIKS, R. J. (1996): Comparative ecology of clonal plants. – *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 351 (1345): 1331–1339.
- VEKEMANS, X. (2002): AFLP-surf version 1.0. – Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium 16.
- VOIGTLÄNDER, U. (2006): Botanisches Artenmonitoring von FFH-Arten. Jahresbericht 2006 an das Umweltministerium Mecklenburg-Vorpommern. – SALIX-Kooperationsbüro für Umwelt und Landschaftsplanung, Waren: 56.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRITERS, A., POT, J., PALEMAN, J., KUIPER, M. & ZABEAU, M. (1995): AFLP. A new technique for DNA fingerprinting. – *Nucl Acids Res* 23 (21): 4407–4414.
- WALLACE, L. E. & CASE, M. A. (2000): Contrasting allozyme diversity between northern and southern populations of *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae): implications for Pleistocene refugia and taxonomic boundaries. – *Systematic Botany* 25 (2): 281–296.
- WANG, H.-Z., FENG, S.-G., LU, J.-J., SHI, N.-N. & LIU, J.-J. (2009a): Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. – *Scientia Horticulturae* 122 (3): 440–447.
- WANG, H.-Z., WU, Z.-X., LU, J.-J., SHI, N.-N., ZHAO, Y., ZHANG, Z.-T. & LIU, J.-J. (2009b): Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. – *Genetica* 136 (3): 391–399.
- WASER, N. M. (1993): Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. – *The natural history of inbreeding and outbreeding*: 173–199.
- WASER, N. M. & PRICE, M. V. (1994): Crossing-distance effects in *Delphinium nelsonii*: outbreeding and inbreeding depression in progeny fitness. – *Evolution*: 842–852.
- WEINERT, M. (1992): Keimungsfördernde Faktoren bei schwerkeimenden europäischen Orchideen: 2. Eine verfeinerte Methode der Samen-Vorssaatsbehandlung mit Natriumhypochlorit und Überprüfung der Vitalität mit Tetrazoliumchlorid*. – *Die Orchidee* (43 (6)): 287–293.

- WEISING, K., NYBOM, H., WOLFF, K. & KAHL, G. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. Second Edition. – CRC press.
- WESTRICH, P. (1989): Die Wildbienen Baden-Württembergs. – Ulmer, Stuttgart.
- WHITLOCK, M. C. (2003): Fixation probability and time in subdivided populations. – *Genetics* 164 (2): 767–779.
- WINK, M. (2011): Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen. – John Wiley & Sons.
- WOLFE, A. D., XIANG, Q. & KEPHART, S. R. (1998): Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. – *Molecular ecology* 7 (9): 1107–1125.
- WRATTEN, S. D., GILLESPIE, M., DECOURTYE, A., MADER, E. & DESNEUX, N. (2012): Pollinator habitat enhancement: benefits to other ecosystem services. – *Agriculture, Ecosystems & Environment* 159: 112–122.
- WRIGHT, S. (1978): Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations. – University of Chicago Press.
- XIN, Q., QUANJIAN, L. I., JINGJING, L., CAIXIA, W. & MIN, T. (2013): Genetic diversity of endangered wild *Cypripedium japonicum* populations: An AFLP analysis.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. & LABUDA, D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. – *Genomics* 20 (2): 176–183.

8 Danksagung

Lieber Volker! Wir kennen uns nun schon seit 9 Jahren. Ich möchte Dir für deine Unterstützung in den Jahren „vielen Dank“ sagen. Zuerst haben wir uns kennengelernt als ich noch ein Diplomand war und weiterhin hast du mich in deine Arbeitsgruppe aufgenommen. Vor allem möchte ich Dir für deinen kleinen „Schubs“ danken, zu promovieren. In dieser Zeit hast du mich als Doktorvater stets unterstützt und gezeigt, dass ich es schaffen kann. Auch für deine zwischenmenschliche Seite bin ich Dir sehr dankbar. Du hattest immer ein offenes Ohr für mich. Vielen Dank!

Liebe Birgit! Dir möchte ich auch oftmals danken, dass du mich stets bei Fragen zu Methoden und speziellen Auswertungen unterstützt hast. Deinen Rat konnte ich immer einholen, trotz deiner knappen Zeit. Für deine Unterstützung und dein Vertrauen möchte ich Dir herzlich danken. Des Weiteren möchte ich Dir meinen Dank aussprechen, dass du meine Arbeit als 2. Gutachterin beurteilst.

Lieber Adriaan! Wir kennen uns schon seit dem Jahr 2005, als ich noch als Hilfskraft in deinen Praktika mithelfen durfte und dadurch viel Wissenswertes mitnahm. Auch Dir danke ich für die gemeinsame Zeit und für die Bereitschaft als einer meiner Prüfer zu fungieren.

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. Schnell! Auch Ihnen möchte ich natürlich meinen herzlichen Dank aussprechen für ihre spontane Bereitschaft als Prüferin in meiner Prüfungskommission zu fungieren.

Danken möchte zusätzlich Uwe Barth, Volker Kögler, Lothar Finke und Anja Abdank, die mir bei der Materialbeschaffung hilfreich zur Seite standen. Ein Dank geht auch an Herrn Keller, der mich in den Methoden der Aufzucht stets unterstützt hat.

Lieber Christian, liebe Tanja! Ein großes Dankeschön geht auch an euch. Auf eure Unterstützung von Beginn meines Vorhabens bis zum Ende konnte ich stets zählen. Dadurch konnte ich den Spagat zwischen beiden Arbeitsstellen immer meistern. Vielen herzlichen Dank.

Liebe AG! Für die täglich freundliche Atmosphäre möchte ich euch allen danken. Mein Dank geht daher an Stefan Balsler, Martin de Jong, Reiner Dern, Ghalia Esklual, Stefanie Eschenbrenner, André Fichtner, Jens Föllner, Dietmar Haffer, Stefanie J. Jung, Alexandra Kellner, Helene Krufczik, Elke Magel, Annalena Mehl, Christina Müller, Sabine Mutz, Andreas Reh, Jutta Reiker, Sebastian Stille und Thomas Wagner. Neben unseren äußerst witzigen Mittagspausen werde ich die gemeinsamen Exkursionen, Kinoabende und Weihnachtsfeiern vermissen. Ein besonderer Dank geht hierbei an Christina, deren Rat ich immer einholen konnte. Vielen Dank, liebe AG!

Liebe Familie! Liebe Mutti, lieber Vati! Lieber Bruder! Egal was war, ihr habt immer zu mir gehalten! Ob Höhen oder Tiefen, ihr wart stets dabei! Auf eure Unterstützung und Hilfe konnte ich jederzeit zählen. Ihr habt mich immer aufgebaut, wenn es im Leben mal nicht so lief wie es soll. Ich bin sehr froh, dass ich diesen schönen und wunderbaren Moment mit euch teilen darf. Vielen Dank für alles!

Liebe Anna Lena! Der letzte Dank geht an Dich, meine Verlobte! Du hast immer an mich geglaubt und mich unterstützt. Du warst da und standst mir zur Seite, auch wenn ich Zweifel hatte. Du teilst mit mir neben den Sorgen auch die unzähligen schönen Momente im Leben. Ich genieße jede Sekunde mit Dir! Ich danke dir von ganzem Herzen!!

9 Versicherung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift