

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Science

Differenzierung von Seelachsbeständen mit Hilfe der EPIC-PCR

Master Thesis

Im Masterstudiengang Food Science

Vorgelegt von: Annika Fritsch

Matrikelnummer: 2032799

Hamburg

Am 30. November 2012

Erster Gutachter: Prof. Dr. Jan Fritsche (HAW Hamburg)

Zweiter Gutachter: Dr. Hartmut Rehbein (Max Rubner-Institut Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Max Rubner-Institut Hamburg im Institut für Sicherheit und Qualität von Milch und Fisch betreut und erstellt.

Inhalt

I Zusammenfassung	5
II Abbildungsverzeichnis.....	6
III Tabellenverzeichnis.....	7
IV Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung	10
2 Aufgabenstellung und Aufbau der Arbeit	12
3 Molekulargenetische Grundlagen.....	14
3.1 Struktur der DNS	14
3.2 Transkription der DNS in Proteine	15
3.3 Genetische Variation.....	16
3.4 Variation als Basis für genetische Marker.....	16
4 Molekularbiologische Methoden.....	18
4.1 DNS-Extraktion	18
4.2 Bestimmung des DNS-Gehalts	18
4.3 Polymerase Kettenreaktion	19
4.4 Gelelektrophorese	20
4.5 Restriction-fragment length polymorphism analysis (RFLP).....	22
4.6 Sequenzierung.....	22
4.7 Klonierung.....	24
5 Populationsgenetische Methoden	25
5.1 Das Hardy-Weinberg Modell.....	25
5.2 Untersuchung der genetischen Differenzierung.....	27
5.3 Genetische Differenzierung mit der EPIC-PCR.....	28
6 Seelachs (<i>Pollachius virens</i>).....	35
6.1 Biologie.....	35
6.2 Geographische Verbreitung	36
6.3 Zustand der Bestände	38

6.4	Differenzierung von Seelachsbeständen.....	40
7	Material und Methoden.....	43
7.1	Probenmaterial	43
7.1.1	Herkunft und Auswahl	43
7.1.2	Längenverteilung der untersuchten Seelachse.....	46
7.2	DNS-Extraktion.....	49
7.3	Bestimmung des DNS-Gehalts der Extrakte.....	50
7.4	PCR	51
7.5	Agarose-Gelelektrophorese	52
7.6	Detektion von Polymorphismen	53
7.6.1	Sequenzierung der PCR-Produkte	53
7.6.2	Klonierung der PCR-Produkte	54
7.6.3	RFLP	55
7.7	Statistische Methoden	57
7.7.1	Berechnung der Längenkenndaten.....	57
7.7.2	ELB Algorithmus	57
7.7.3	Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht	58
7.7.4	Test auf Kopplungsungleichgewicht.....	58
7.7.5	Analyse der molekularen Varianz (AMOVA)	59
7.7.6	Berechnung der paarweisen genetischen Distanz	60
7.7.7	Diskriminanzanalyse.....	61
7.7.8	Clusteranalyse	62
8	Ergebnisse	64
8.1	Primertests.....	64
8.2	EPIC-Primer Act 2F/2R.....	68
8.3	EPIC-Primer CalmEX 4F/5R.....	71
9	Auswertung.....	75
9.1	Genetische Differenzierung anhand der Aktin-Marker	75

9.2	Genetische Differenzierung anhand des Calmodulin-Markers.....	79
9.3	Genetische Differenzierung über alle Marker.....	82
10	Diskussion.....	86
11	Fazit.....	92
12	Ausblick.....	94
A	Quellen.....	96
B	Anhang.....	101
B.1	Geräte.....	101
B.2	PC-Programme.....	101
B.3	Chemikalien.....	101
B.3.1	CTAB.....	101
B.3.2	Hoechst- Test.....	102
B.3.3	PCR.....	103
B.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	103
B.3.5	Sequenzierung.....	103
B.3.6	Klonierung.....	104
B.3.7	RFLP.....	105
B.4	Abbildungen und Tabellen.....	106
B.5	Daten-CD.....	123
B.5.1	RFLP Actin.....	123
B.5.2	Sequenzierung Calmodulin.....	123
B.5.3	Länge der untersuchten Seelachse.....	123

I Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung der vom ICES (*International Council for the Exploration of the Sea*) klassifizierten Seelachs-Bestände (*Pollachius virens*) im Nordost-Atlantik mit Hilfe der EPIC-PCR (*Exon primed, Intron-crossing Polymerase Chain Reaction*) untersucht. Die EPIC-PCR ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von Intron-Sequenzen innerhalb phylogenetisch weit verbreiteter Gene. Die Primer binden bei dieser Methode innerhalb der über Spezies-Grenzen hinweg hoch konservierten Exon-Regionen.

Die untersuchten Seelachse stammen aus der Nordsee, der Nordost-Arktis, Island und Ostgrönland. Außerdem wurde eine Probe aus dem Handel hinsichtlich ihrer genetischen Struktur untersucht und geprüft, ob sie sich dem Herkunftsbestand zuordnen lässt.

Nach einem Test von neun verschiedenen EPIC-Primern konnte nur mit zwei Systemen ein zufriedenstellendes Maß an Variabilität innerhalb der amplifizierten Nukleotid-Sequenz festgestellt werden. Bei diesen Primern handelt es sich um Act 2F/2R (Atarhouch *et al.*, 2003) und CalmEX 4F/5R (Chow, 1998). Act 2F/2R bindet in der Exon-Region eines Aktin- und CalmEX 4F/5R innerhalb eines Calmodulin-Gens. Mit dem Primerpaar Act 2F/2R konnten insgesamt bis zu sechs Banden mit einer Länge von 897 bp, 860 bp, 770 bp, 653 bp, 589 bp und 211 bp im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden. Die Banden bei 897 und 860 bp wurden als eigener Marker ausgewertet. Die PCR-Produkte von 154 Seelachsen aus den vier Regionen des Nordost-Atlantiks wurden mit Hilfe einer RFLP (*Restriction fragment length polymorphism analysis*) mit den Restriktionsenzymen Taq α I und HpyCH4IV analysiert. In beiden RFLPs erfolgte die Auswertung anhand drei polymorpher Restriktionsfragmente. Mit dem Primerpaar CalmEX 4F/5R wurde nur ein Locus amplifiziert (587 bp). Dieses Amplifikat wurde direkt sequenziert und in einem multiplen Vergleich der Sequenzen auf SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) untersucht. Es konnten drei SNPs detektiert werden, die für die Untersuchung der genetischen Differenzierung genutzt wurden.

Die genetische Differenzierung über die einzelnen Marker wurde anhand von paarweisen genetischen Distanzen (Nei's D und ϕ_{ST}) sowie einer AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) ausgewertet. Die Analyse über alle Marker erfolgte mit Hilfe einer Diskriminanzanalyse. Alle Bestände weisen ein hohes Maß an genetischer Variation auf, die Variation zwischen den Beständen ist jedoch gering. Weder durch die einzelne noch die multiple Auswertung über alle Marker konnte eine eindeutige Differenzierung der Seelachs-Bestände nachgewiesen werden. Daher war auch keine Klassifizierung der Handelsproben möglich.

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DNS-Doppelhelix	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung des PCR-Prozesses	20
Abbildung 3: Agarose-Gelelektrophorese	21
Abbildung 4: Versuchsaufbau für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
Abbildung 5: Ausschnitt aus der Analyse einer Calmodulin-Intron Sequenz	23
Abbildung 6: Seelachs (<i>Pollachius virens</i>)	36
Abbildung 7: Fanggebiete für Seelachs mit Laichgebieten	37
Abbildung 8: MSC-Siegel.....	40
Abbildung 9: Migrationsraten (in %) von Seelachs.....	41
Abbildung 10: Herkunft der untersuchten Proben	46
Abbildung 11: Durchschnittliche Länge der Fische	48
Abbildung 12: Längenverteilung der Fische	49
Abbildung 13: PCR-Produkt Act 2F/2R im 15% Clean Ge mit Größe der Banden	66
Abbildung 14: RFLP HpyCH4IV	69
Abbildung 15: RFLP Taq α I	70
Abbildung 16: Vergleich der PCR-Ausbeute mit CalmEX 4F/5R	73
Abbildung 17: SNPs innerhalb der Calmodulingen-Sequenz	73
Abbildung 18: Dendrogramm auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (HpyCH4IV).....	76
Abbildung 19: Dendrogramm auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (Taq α I).....	78
Abbildung 20: Dendrogramm auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (CalmEX 4F/5R)	82
Abbildung 21: Diskriminanzanalyse über alle Marker und Proben.....	83
Abbildung 22: Diskriminanzanalyse über alle Marker und Proben < 60 cm.....	84
Abbildung 23: Calmodulin- Gene A-D von <i>Oryzias latipens</i>	90
Abbildung 24: PCR-Produkt IFF 232/233 im Agarosegel	112
Abbildung 25: PCR-Produkt CALMex 4F/5R im Agarosegel	112
Abbildung 26: PCR-Produkte S7 RPEX 1F/2R (oben) und Aktin 2F/2R (unten) im Agarosegel	113

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedeutung der Symbole in der ausgelesenen Nukleotid-Sequenz	23
Tabelle 2: Berechnung der Genotyp-Frequenzen	25
Tabelle 3: Literaturübersicht EPIC-PCR	31
Tabelle 4: Zustand der Seelachsbestände nach ICES	39
Tabelle 5: Probenauswahl	44
Tabelle 6: Kennwerte der Längenverteilung der Seelachse	47
Tabelle 7: Pipettierschema für die Bestimmung des DNS-Gehalts	50
Tabelle 8: PCR-Ansatz laut Herstellerempfehlung	51
Tabelle 9: Einstellung des Thermocyclers für die PCRs	52
Tabelle 10: Sequenzierungsansatz mit Big Dye	53
Tabelle 11: Cycling-Schema für die Sequenzierungsreaktion	53
Tabelle 12: Ansatz für den Verdau von PCR-Produkten	55
Tabelle 13: Verwendete Restriktionsenzyme	56
Tabelle 14: RFLP Elektrophorese	56
Tabelle 15: Aufbau einer AMOVA	60
Tabelle 16: Ergebnisse der Primertests	65
Tabelle 17: Getestete Primersysteme	67
Tabelle 18: Anteil von Proben mit Doppelbande	68
Tabelle 19: Verhältnis zwischen analysierten und auswertbaren Proben	69
Tabelle 20: Ableitung der Herkunft der RFLP-Banden aus den Sequenzen der PCR-Produkte	70
Tabelle 21: Relative Verteilung RFLP- Phänotypen (HpyCH4IV)	71
Tabelle 22: Relative Verteilung RFLP- Phänotypen (Taq α I)	71
Tabelle 23: Verhältnis zwischen analysierten und auswertbaren Proben (Calmodulin-Marker)	72
Tabelle 24: Relative Verteilung der Genotypen innerhalb der Regionen	74
Tabelle 25: Mit dem ELB-Algorithmus errechnete Haplotypen	74
Tabelle 26: Genetische Distanzen (HpyCH4IV)	76
Tabelle 27: Genetische Distanzen (Taq α I)	77
Tabelle 28: AMOVA (HpyCH4IV)	78
Tabelle 29: AMOVA (Taq α I)	79
Tabelle 30: Beobachtete und erwartete Heterozygotie sowie Test auf H-W Gleichgewicht	80
Tabelle 31: Inzuchtkoeffizienten für die einzelnen Bestände und über alle (CalmEX 4F/5R)	81
Tabelle 32: Genetische Distanzen (CalmEX 4F/5R)	81
Tabelle 33: Ergebnisse der AMOVA (CalmEX 4F/5R,)	82
Tabelle 34: Klassifikationsmatrix über alle Marker und Proben	84
Tabelle 35: Klassifikationsmatrix über alle Marker und Proben <60 cm	85
Tabelle 36: Verdünnung der DNS-Extrakte	106

Tabelle 37: Relative Längenverteilung der Seelachse aus der Nordsee Teil 1	110
Tabelle 38: Relative Längenverteilung der Seelachse aus der Nordsee Teil 2	110
Tabelle 39: Relative Längenverteilung der Seelachse aus Ostgrönland	110
Tabelle 40: Relative Längenverteilung der Seelachse aus der Nordostarktis	110
Tabelle 41: Relative Längenverteilung der Seelachse aus Island	111
Tabelle 42: Berechnung der Doppelbande (Act 2F/2R)	111
Tabelle 43: Berechnung der Länge des 175bp Restriktionsfragments (HpyCH4IV)	113
Tabelle 44: Berechnung der Länge des 295 bp Restriktionsfragments (HpyCH4IV)	113
Tabelle 45: Aus Haplotypen (ELB-Algorithmus) rekonstruierte Genotypen (Calmodulin-Marker)	114
Tabelle 46: Codierungstabelle Genotypen (Diskriminanzanalyse)	117
Tabelle 47: Binär codierte Rohdatentabelle für alle Marker	118

IV Abkürzungsverzeichnis

AMOVA	<i>Analysis of Molecular Variance</i>
Bp	<i>Base Pairs</i> (deutsch: Basenpaare)
CTAB-Methode	Cetyltrimethyl-ammonium-Bromid-Methode
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxynucleosidtriphosphate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELB-Algorithmus	Excoffier-, Laval- und Baldingalgorithmus
EPIC	<i>Exon primed, Intron-crossing</i>
EU	Europäische Union
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
HCR	<i>Harvest Control Rule</i>
HT	Hybridisierungstemperatur
ICES	<i>International Council for the Exploration of the Sea</i> (deutsch: Internationaler Rat für Meeresforschung)
MSC	<i>Marine Stewardship Council</i>
MSY	Maximum Sustainable Yield (deutsch: maximaler Dauerertrag)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (deutsch: Polymerase-Kettenreaktion)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism analysis</i>
Rpm	<i>revolutions per minute</i> (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
RNS	Ribonukleinsäure
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (deutsch: Punktmutation)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
UCCH	Universitäres Cancer Center Hamburg
UV	Ultraviolett
WWF	<i>World Wide Fund For Nature</i>
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin

1 Einleitung

Laut der letzten Bewertung der *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) nimmt die Anzahl von durch Überfischung gefährdeten Beständen global gesehen zu. Viele Bestände der zehn weltweit meistgenutzten Fischarten sind entweder an ihrer Kapazitätsgrenze oder bereits übernutzt (FAO, 2012, S. 12).

Vor diesem Hintergrund ist nachhaltiger Fischfang in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus von Verbrauchern gerückt. Laut einer vom *Marine Stewardship Council* (MSC) in Auftrag gegebenen Studie nehmen mehr als die Hälfte der befragten deutschen Verbraucher die Überfischung der Meere als ein bedeutendes Problem wahr. 27 % der Befragten gaben zudem an, Fischereiprodukte ausschließlich aus nachhaltigen Quellen einzukaufen (MSC, 2012). Auf Grund dieser Entwicklung bemühen sich auch große deutsche Einzelhändler verstärkt darum, Fisch aus nachhaltigen Quellen anzubieten. So heißt es auf der Homepage der EDEKA- Gruppe: „Wir beziehen unsere Wildfischprodukte aus nachhaltigen Fischereien und bevorzugen, wenn verfügbar, immer [...] zertifizierte Produkte.“ Ähnliches ist auch in den Internetauftritten anderer Händler zu lesen (Schwarz E-Commerce GmbH & Co. KG, 2012; REWE Markt GmbH, 2012).

Durch die Basis-Verordnung 178/2002 sind Lebensmittelhersteller und –händler zudem gesetzlich verpflichtet, die Rückverfolgbarkeit der von ihnen hergestellten und gehandelten Lebensmittel sicherzustellen. In der Fischerei findet des Weiteren die EU-Verordnung 1005/2008 zur Bekämpfung der illegalen, nicht gemeldeten und unregulierten Fischerei Anwendung. Aus dieser Verordnung ergeben sich umfangreiche Dokumentationspflichten, die die Rückverfolgbarkeit von Fischereiprodukten gewährleisten sollen. Der Bundesverband der deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V., die Interessenvertretung der in Deutschland ansässigen Fischverarbeitungs- und Fischhandelsunternehmen hat darüber hinaus die Initiative „Genauere Fanggebietskennzeichnung für Seefische“ ins Leben gerufen. Danach sollen ab 2010 alle in Deutschland vermarkteten Erzeugnisse der Seefischerei freiwillig mit dem FAO-Fanggebiet und der genauen Herkunftsregion gekennzeichnet werden. Dies soll, über die gesetzliche Regelung hinaus, auch für verarbeitete Fischereierzeugnisse, wie zum Beispiel Fischstäbchen, gelten. Die Kennzeichnung der Herkunftsregion soll dabei, wenn möglich, auf den wissenschaftlich unterscheidbaren Fischbeständen basieren (Bundesverband der deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V., 2012).

Aus diesen neuen Ansprüchen an die Qualität von Fischereiprodukten resultiert ein wachsender Bedarf an wissenschaftlich fundierten Kenntnissen über den Zustand von marinen Ressourcen und sich daraus ableitenden Erkenntnissen für eine nachhaltigere Bewirtschaftung. Gleichzeitig müssen Methoden entwickelt werden, um die Rückverfolgbarkeit und Authentizität von Fischereierzeugnissen zu gewährleisten.

Zunehmend werden molekularbiologische Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von marinen Spezies genutzt (Teletchea, Maudet und Hänni, 2005, S. 364). Einige wichtige Ziele sind dabei der Schutz des Verbrauchers vor Täuschung und gesundheitlichen Risiken sowie die Sicherstellung der korrekten Kennzeichnung der Produkte (Rehbein, 2009, S. 364; Mäde, 2010, S. 121f).

Neben der Differenzierung von Arten ist für Belange der Rückverfolgbarkeit und der Zertifizierung von Fischereierzeugnissen aus nachhaltig bewirtschafteten Beständen jedoch auch die Differenzierung von Populationen einer Spezies beziehungsweise Art von Bedeutung. Die Bedeutung von Kenntnissen über die genetische Struktur von kommerziell genutzten Fischarten wird in der Literatur vor allem hinsichtlich eines angepassten Fischereimanagements diskutiert. Für das Management von Fischereien wird die Population einer Art in Management-Einheiten, die sich an politischen Grenzen orientieren, unterteilt. Diese Einheiten entsprechen nicht notwendigerweise der natürlichen genetischen Struktur der Population. Dadurch werden die statistischen Daten über den Zustand von Fischbeständen unter Umständen falsch zugeordnet, was zu falschen Vorhersagen über die Entwicklung und somit zu Missmanagement führen kann. Die Folgen sind eine niedrigere Produktivität und die Dezimierung lokaler Bestände (Reiss, 2009, S. 362).

2 Aufgabenstellung und Aufbau der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob sich die Seelachs-Bestände im Nordost-Atlantik mit Hilfe einer molekularbiologischen Methode, der EPIC-PCR (*Exon primed, Intron-crossing-Polymerase Chain Reaction*), differenzieren lassen. Dabei steht nicht die Differenzierung der Population hinsichtlich eines nachhaltigeren Fischereimanagements im Mittelpunkt, sondern die Differenzierung der durch den ICES (*International Council for the Exploration of the Sea*, deutsch: Internationaler Rat für Meeresforschung) klassifizierten Bestände zu Rückverfolgbarkeitszwecken. Der ICES ist eine zwischenstaatliche Organisation mit Sitz in Kopenhagen, die die Meeresforschung im Nordost-Atlantik koordiniert. Sie gilt als bedeutendste wissenschaftliche Quelle für alle Fragen bezüglich des Umgangs mit den dort lebenden Ressourcen (Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.), 2012c).

Der Seelachs (*Pollachius virens*) zählt in Deutschland zu den zehn beliebtesten Speisefischen. 2011 wurden 26.602 Tonnen Seelachs verzehrt, das entspricht einem Marktanteil von 2,4%. Die Population im Nordost-Atlantik wird in fünf Bestände unterteilt, die in den vergangenen 10 Jahren als in relativ gutem Zustand bewertet wurden (Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.), 2012b). Für die Analyse der Populationsstruktur sollen aus der Literatur bekannte EPIC-Primer an nordost-atlantischem Seelachs getestet und daraus Analysemethoden entwickelt werden. Auf Basis der entwickelten Methoden werden Fische von verschiedenen Fangorten analysiert. Die Auswertung erfolgt auf Basis von populationsgenetischen Modellen und Kennwerten sowie einer statistischen Analyse der Daten. Es wird außerdem geprüft, ob sich eine im Handel eingekaufte Stichprobe dem Herkunftsbestand zuordnen lässt.

Dazu werden in den ersten Kapiteln die für die Durchführung und Interpretation der Analysen notwendigen theoretischen Grundlagen erläutert. Zunächst werden molekulargenetische Grundlagen und einige wichtige Begriffe aus dem Bereich der Genetik erklärt. Im folgenden Kapitel wird die grundlegende Funktionsweise der verwendeten molekularbiologischen Methoden beschrieben. Anschließend erfolgt eine Darstellung populationsgenetischer Grundlagen sowie der Funktionsweise der EPIC-PCR und ihrer bisherigen Anwendung für die Differenzierung mariner Spezies. Im nächsten Kapitel werden die biologischen Merkmale und die geographische Verbreitung des Seelachses sowie der Zustand der Bestände beschrieben. Des Weiteren werden bisherige Arbeiten zur Differenzierung der Seelachs-Population im Nordost-Atlantik vorgestellt.

Im Anschluss werden die praktische Durchführung der Versuche sowie die verwendeten statistischen Methoden beschrieben. Nach der Erläuterung des Tests sowie der Auswahl der EPIC-Primer erfolgt die Darstellung der Ergebnisse und die Auswertung der durchgeführten Analysen. Abschließend werden die Ergebnisse diskutiert und zusammengefasst. Im Kapitel „Ausblick“ werden zuletzt aus dieser Arbeit abzuleitende Ansatzpunkte für weitere Möglichkeiten zur Differenzierung der Seelachsbestände diskutiert.

3 Molekulargenetische Grundlagen

Unter Molekulargenetik versteht man die Untersuchung der Struktur, Funktion und der Variabilität von Genen auf der molekularen Ebene (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 3).

In diesem Kapitel sollen kurz die Grundlagen aus dem Bereich der molekularen Genetik sowie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Begrifflichkeiten erläutert werden.

3.1 Struktur der DNS

Die DNS (Desoxyribonukleinsäure) ist die Trägerin der Erbinformation. Ihre Struktur lässt sich, ähnlich wie bei Proteinen, in mehreren hierarchischen Stufen beschreiben.

Auf der niedrigsten Stufe steht die spezifische Nukleotid-Sequenz der DNS. Die Nukleotide sind jeweils aus einer Base, einer Desoxyribose und einer Phosphatgruppe aufgebaut. Es werden vier verschiedene Basen unterschieden: Adenin und Guanin sowie Thymin und Cytosin. Adenin und Guanin werden als Purin-Basen, Thymin und Cytosin als Pyrimidin-Basen bezeichnet (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 15).

Als Sekundärstruktur der DNS wird der Aufbau der DNS als Doppelhelix bezeichnet (Abbildung 1). Die einzelnen Nukleotide sind über eine Phosphodiester-Bindung zwischen dem dritten und dem fünften Kohlenstoffatom der Desoxyribose verbunden und bilden so den DNS-Strang. Abgeleitet aus der Bindungsstelle an der Desoxyribose hat jeder DNS-Strang ein 5' und ein 3' Ende. Jeweils zwei DNS-Stränge sind komplementär miteinander verbunden. Die Bindungsstellen bilden hierbei Wasserstoffbrücken zwischen den Basen, wobei jeweils Adenin eine Bindung mit Thymin und Guanin eine Bindung mit Cytosin eingeht. In der Doppelhelix sind die komplementären DNS-Stränge spiralförmig angeordnet (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 16f; Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 1f).

Die Tertiärstruktur der DNS bilden die Chromosomen. Diese Strukturen sind innerhalb der Zelle nur während der Teilung vorhanden. Jedes Chromosom repräsentiert ein DNS-Molekül. Fische sind meist diploid, daher liegt der Chromosomensatz in doppelter Ausführung im Organismus vor (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 9). Auch der Seelachs ist diploid und hat einen Chromosomensatz von $2N=40$ (Froese und Pauly (Hrsg.), 2011).

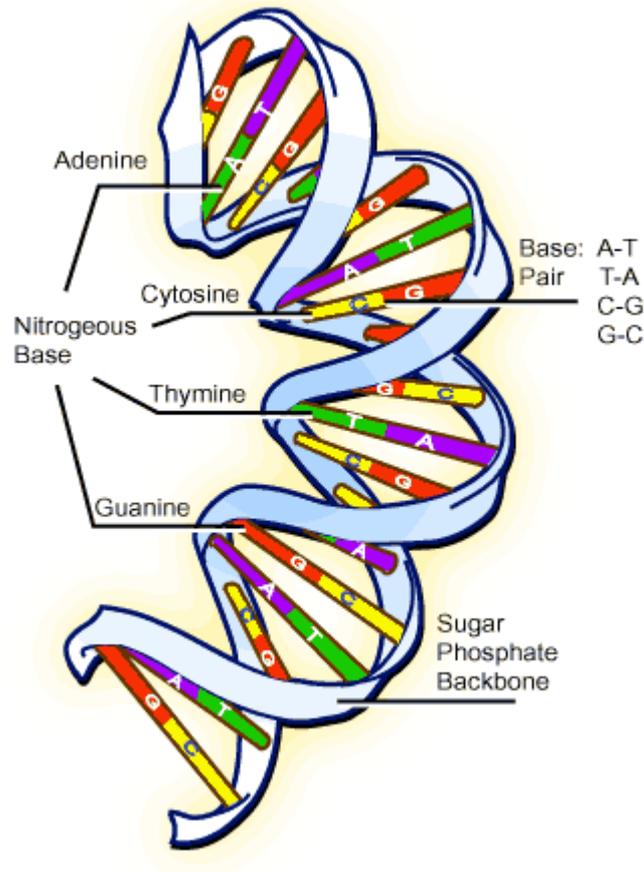


Abbildung 1: DNS-Doppelhelix (Secko, 2003)

3.2 Transkription der DNS in Proteine

Für den Transkriptionsprozess wird die DNS im Zellkern abgelesen und in ein RNS-Molekül übersetzt (Ribonukleinsäure). Die RNS ist strukturell mit der DNS identisch, enthält statt Desoxyribose jedoch die Ribose als Zuckermolekül. Des Weiteren ist die Base Thymin durch Uracil substituiert. Die Transkription findet im Cytoplasma statt. Basis für die Translation von Genen in Proteine ist der genetische Code. Es gibt $4^3 = 64$ mögliche Kombinationen der vier Basen in Form von Triplet-Codes. Es kodieren also immer drei Basen für eine der 20 Aminosäuren. Da es mehr Codes als Aminosäuren gibt, werden die meisten Aminosäuren von mehr als einem Triplet kodiert. Dies wird als Redundanz des genetischen Codes bezeichnet. Zwischen den codierenden Sequenzen der DNS, den sogenannten Exons, liegen nicht-codierende Sequenzen, die Introns. Diese machen zum Beispiel im menschlichen Genom 97 % der DNS aus. Diese Sequenzen werden während der Transkription aus der RNA herausgeschnitten, so dass nur die Exons in Aminosäuren übersetzt werden (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 5).

3.3 Genetische Variation

Vor jeder Zellteilung wird die DNS repliziert. Da die beiden Stränge in der DNS-Doppelhelix komplementär zueinander sind, kann ein Strang zur Replikation eines neuen Gegenstranges genutzt werden. Dieser Prozess findet an beiden Strängen gleichzeitig statt, so dass immer zwei vollständige neue DNS-Stränge entstehen (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 3f). Dieses Prinzip macht sich auch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu Nutze (vgl. Kapitel 4.3). Während des Replikationsprozesses können Fehler beim Einfügen der komplementären Basen passieren. Diese werden als Punktmutationen bezeichnet und sind eine mögliche Quelle für genetische Variation (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 15). Dieses Thema wird ausführlich in Kapitel 3.4 diskutiert.

Wie bereits beschrieben, wird die DNS vor der Zellteilung in Chromosomen strukturiert. Auf jedem Chromosom liegen Gene, die für verschiedene Merkmale codieren. Jedes Gen kann zwei oder mehrere Ausprägungsformen haben, die Allele. Dies wird durch geringfügige Änderungen in der DNS-Sequenz hervorgerufen, die für das Gen codiert. Sind beide Allele eines Gens identisch, so ist der Genotyp homozygot für dieses Merkmal oder Gen. Sind beide Allele verschieden, ist der Genotyp bezogen auf dieses Merkmal heterozygot (Hartl und Clark, 2007, S. 12; Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 5).

Vor der sexuellen Reproduktion diploider Organismen werden haploide Gameten gebildet, in denen die Allele aller Gene der Elterntiere rekombiniert werden. Durch die Vereinigung der Gameten zweier Elterntiere entstehen in der Filialgeneration neue Genotypen (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 11f).

3.4 Variation als Basis für genetische Marker

Wie bereits in Kapitel 3.3 erwähnt, können durch Ablesefehler während der Replikation der DNS Punktmutationen entstehen. Diese sind mögliche Marker für die Differenzierung von Populationen. Punktmutationen (*Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs)) sind Variationen eines einzelnen Nukleotids in der DNS-Sequenz und sind die häufigste Art der genetischen Variation. Es können verschiedene Arten von SNPs auftreten:

- Transition: Austausch einer Purin-Base durch eine andere Purin-Base oder Austausch einer Pyrimidin-Base durch eine andere (vgl. Kapitel 3.1)
- Transversion: Austausch einer Purin- durch eine Pyrimidin-Base
- Insertion beziehungsweise Deletion: Einfügen beziehungsweise Verlust eines Basenpaars.

Transitionen sind die am häufigsten auftretenden SNPs, da sie kinetisch gesehen günstiger sind als Transversionen. Die meisten Punktmutationen können sowohl bi- als auch multiallelisch sein. Zwei Allele an einem Locus sind jedoch der häufigste Fall (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 34f).

Ob ein SNP eine Auswirkung auf den Organismus hat, hängt davon ab, ob er sich in einem codierenden oder nicht codierenden Teil eines Gens befindet (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 18f; Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 34f). Treten SNPs in Exons auf, sind sie meist schädlich für den Organismus und werden durch die natürliche Selektion aus einer Population eliminiert. Auf Grund dessen sind die Exon-Regionen von vielen Genen in hohem Maße konservativ (Brown und Epifanio, 2003, S. 119). Punktmutationen, die in Introns auftreten, werden in der Regel als selektionsneutral angesehen. Da Introns nicht für Proteine codieren, haben SNPs hier meist keine Auswirkungen für den Organismus. Es kommt daher häufig zu einer Akkumulation von SNPs in Intronsequenzen, weshalb sie für die Analyse von genetischer Variabilität von besonderem Interesse sind (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 18f.; Brown und Epifanio, 2003, S. 119; Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 34f.). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass Introns unter anderem regulatorische Funktionen für die Expression bestimmter Gene übernehmen und somit teilweise nicht selektionsneutral sind (Fedorova und Fedorov, 2003, S. 124ff). Ob die Annahme der Selektionsneutralität für eine bestimmte Intronsequenz korrekt ist, kann mit Hilfe eines Tests auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht überprüft werden (vgl. Kapitel 5.1 und 7.7.3).

Die Identifikation von Punktmutationen kann durch den Abgleich der DNS-Sequenzen mehrerer Individuen (vgl. Kapitel 4.6) oder auch durch eine Analyse mit Hilfe von Restriktionsenzymen (RFLP, *Restriction fragment length polymorphism analysis*, vgl. Kapitel 4.5) erfolgen (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 35f.).

4 Molekularbiologische Methoden

In diesem Kapitel soll die grundlegende Funktionsweise der in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden erläutert werden. Die exakte Versuchsdurchführung ist im Kapitel 7 beschrieben.

4.1 DNS-Extraktion

Die Extraktion von DNS aus pflanzlichen oder tierischen Geweben kann auf verschiedene Arten erfolgen. Grundsätzlich ist die Nutzung kommerzieller Kits oder die Anwendung einer konventionellen Methode möglich (Pöpping und Unterberger, 2010, S. 21). Eine häufig verwendete Methode ist die CTAB-Methode nach Rogers und Bendich (1985). Mit Hilfe dieser Methode können mit relativ geringem Zeitaufwand sehr reine DNS-Extrakte gewonnen werden.

Die Extraktion erfolgt in mehreren Schritten. Im ersten Schritt werden die in der Probe vorhandenen Zellen aufgeschlossen und die DNS freigesetzt. Die Lyse der Zellen erfolgt dabei einerseits mechanisch durch ein Homogenisieren und anschließendes Schütteln der Probe. Des Weiteren werden die Zellen durch Proteinase K enzymatisch und durch CTAB chemisch abgebaut. Im nächsten Schritt werden durch die Zugabe von Chloroform die im Extraktionsansatz enthaltenen Proteine gefällt und auf diese Weise entfernt. Anschließend wird der Probe weiteres CTAB zugesetzt, das bei einer Natriumchlorid-Konzentration $< 0,6$ M unlösliche Komplexe mit der DNS bildet, die durch Zentrifugieren sedimentiert werden. So können störende Substanzen von den Nukleinsäuren getrennt und entfernt werden. Im folgenden Schritt wird die DNS durch die Zugabe eines Puffers mit einem Natriumchlorid-Gehalt von 1 M wieder in Lösung gebracht. Unter diesen Bedingungen bildet CTAB Komplexe mit Polysacchariden und Proteinen. Um diese zu entfernen wird die DNS mit Hilfe von Isopropanol gefällt und der Überstand verworfen. Anschließend wird das DNS-Pellet durch Waschen mit Ethanol von Salzen gereinigt. Ethanolreste werden durch Abdampfen oder Trocknen in einer Vakuumzentrifuge entfernt (Pöpping und Unterberger, 2010, S. 21f).

4.2 Bestimmung des DNS-Gehalts

Die Bestimmung der Nukleinsäurequantität erfolgt häufig mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (Bisbenzimidazole) bindet mit hoher Affinität an die DNS-Doppelhelix, zeigt aber kaum Reaktivität mit RNS und eignet sich deshalb gut für die spezifische Bestimmung der DNS-Menge. Des Weiteren verfälschen im DNS-Extrakt

verbliebene Proteine die Messung nicht (Dows und Wilfinger, 1985, S. 538; Pöpping und Unterberger, 2010, S. 26).

Hoechst 33258 adsorbiert Licht (Adsorptionsmaximum: 350 nm, Dows und Wilfinger, 1985, S. 541) und geht dadurch in einen angeregten Zustand über, aus dem er unter Abgabe von längerwelligem Licht (Emissionsmaximum : 455 nm , Dows und Wilfinger , 1985 , S. 541) wieder zurückfällt. Ist der Farbstoff an DNS gebunden, nimmt die Fluoreszenz zu, was mit Hilfe eines Fluorimeters im Vergleich zu einem Standard gemessen werden kann (Pöpping und Unterberger, 2010, S. 26f).

4.3 Polymerase Kettenreaktion

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine der wichtigsten und die am häufigsten eingesetzte Methode in der molekularbiologischen Analytik (Busch und Konrad, 2010, S. 35).

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, eine gewünschte DNS-Sequenz millionenfach zu kopieren. Das Enzym DNS-Polymerase ist in der Lage, DNS-Einzelstränge zu Doppelsträngen zu ergänzen. Dazu wird dem PCR-Reaktionsansatz eine Mischung aus den vier Desoxynucleosidtriphosphaten (jedes enthält eine der vier Basen) (dATP, dCTP, dGTP und dTTP, zusammen dNTPs genannt), die der Polymerase als Material für den zu synthetisierenden Strang dienen, zugesetzt. Des Weiteren werden zwei kurze, einzelsträngige Oligonukleotide benötigt (die Primer), die als Start- beziehungsweise Stoppssequenz für die Polymerase dienen (Busch und Konrad, 2010, S. 36; Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 23f).

Im Wesentlichen läuft die Reaktion in drei Schritten ab (Abbildung 2):

1. Denaturierung der DNS und Auftrennung in die beiden Einzelstränge
2. Anlagerung der Primer an die komplementären DNS-Sequenzen (Hybridisierung)
3. Polymerisierung eines neuen DNS-Strangs durch die Polymerase (Elongation).

Aus der Abbildung wird deutlich, dass erst ab dem zweiten PCR-Zyklus das Zielfragment in der gewünschten Länge amplifiziert werden kann (*Short „target“ product*). Die Primer binden nun an das 5´Ende der neu hergestellten Fragmente und die Amplifikation endet dann mit der Sequenz des anderen Primers. Es werden zwischen 20-40 Zyklen benötigt, um die Zielsequenz gezielt zu vervielfältigen (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 23f).

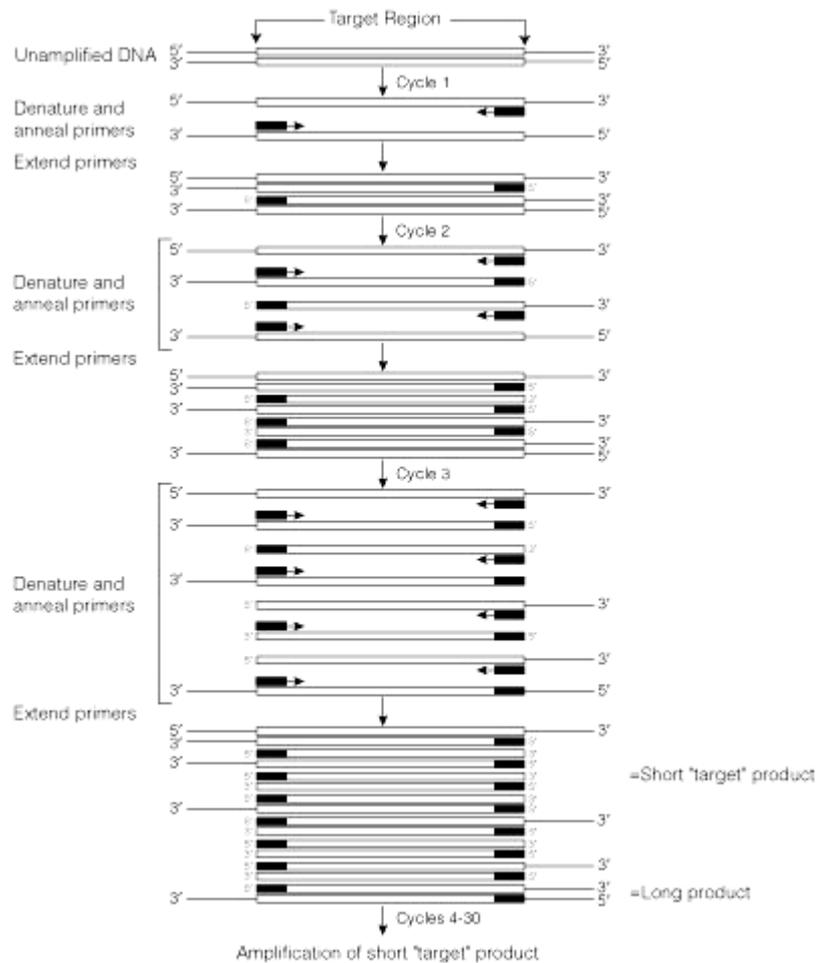


Abbildung 2: Schematische Darstellung des PCR-Prozesses (Promega, 2012)

4.4 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNS-Fragmenten. Der Aufbau ist in Abbildung 3 dargestellt. Durch das Anlegen einer Spannung (2) wandert die negativ geladene DNS von der Kathode (3) in Richtung Anode (4) durch das Gel. Dabei werden die kleineren, schneller durch das Gel migrierenden Fragmente von den größeren, langsamer migrierenden Fragmenten getrennt.

Nach Beendigung des Laufs wird die DNS mit Hilfe von Ethidiumbromid angefärbt. Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht, wodurch die DNS-Fragmente als Banden im Gel sichtbar werden. Anhand von Standards können Fragmente, zum Beispiel PCR-Produkte, hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert werden (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 27f, Jany und Hahn, 1991, S.42).

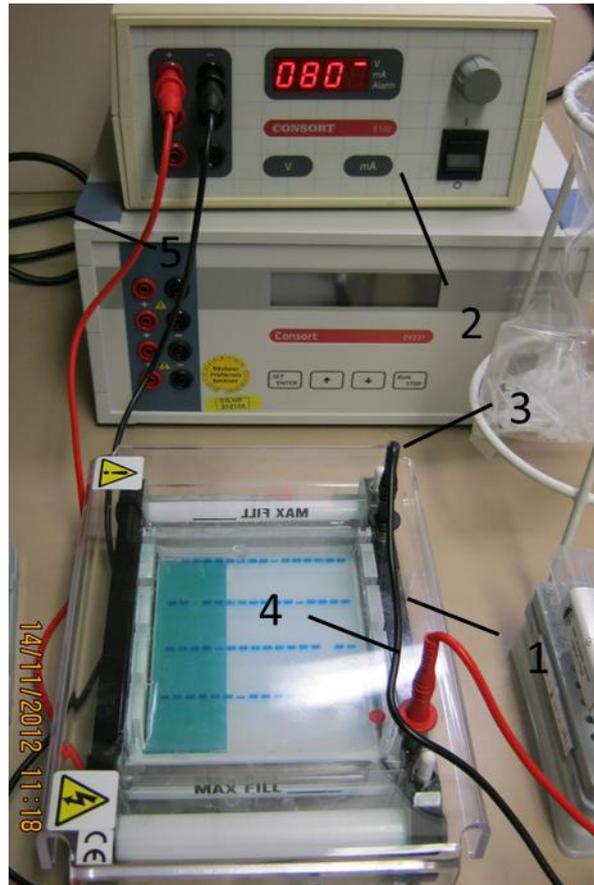


Abbildung 3: Agarose-Gelelektrophorese (eigenes Foto, 1 Elektrophoresekommer, 2 Spannungsquelle, 3 Kathode, 4 Anode)

Eine weitere Möglichkeit zur elektrophoretischen Auftrennung von DNS-Fragmenten ist die Polyacrylamid-Flachbett-Elektrophorese. Polyacrylamidgele haben eine höhere Auflösung als Agarosegele (Westermeier, 2001, S. 261).

Der Versuchsaufbau in der Flachbett-Elektrophoresekommer (1) ist in Abbildung 4 dargestellt. Das Gel (2) liegt dabei auf einer Kühlplatte, die auf 15 °C temperiert wird. Um einen guten Kontakt zwischen der Platte und dem Gel zu gewährleisten, wird ein dünner Film aus Dekan auf die Kühlplatte aufgetragen. Je ein Elektrodenstreifen wird auf der Kathoden- beziehungsweise Anodenseite (3 und 4) des Gels aufgelegt und die Glasplatte mit den beiden Elektroden (5 und 6) auf der Apparatur befestigt. Die Applikation der Proben erfolgt in die Taschen an der Kathodenseite (7). Zusätzlich werden Standards aufgetragen, die, wie bei der Agarose-Gelelektrophorese, der Bestimmung der Fragment-Größe dienen. Anhand der in den Markern enthaltenen Farbstoffe kann außerdem der Fortschritt der Trennung verfolgt werden. Nach der Elektrophorese werden die DNS-Fragmente im Gel mit Silbernitrat gefärbt. Diese Methode ist sensitiver als die Färbung mit Ethidiumbromid (Westermeier, 2001, S. 261).

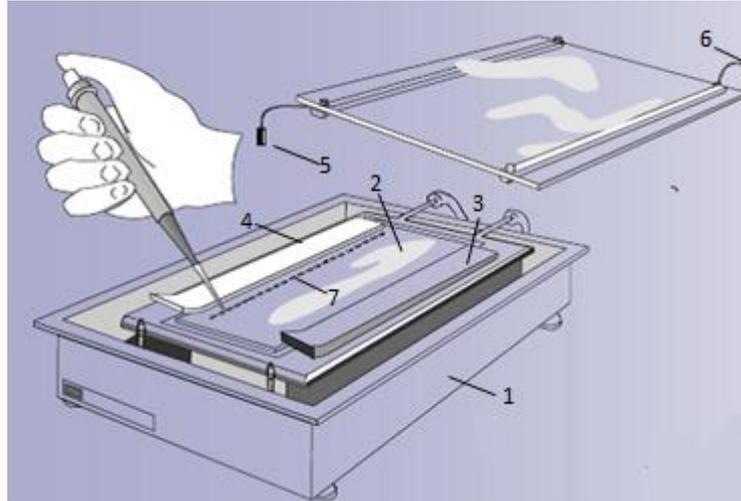


Abbildung 4: Versuchsaufbau für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1 Flachbett-Elektrophoresekammer, 2 Polyacrylamid-Gel, 3 Anode, 4 Kathode, 5 und 6 Elektroden, 7 Probentaschen) (verändert nach EDC, 2012a)

4.5 Restriction-fragment length polymorphism analysis (RFLP)

Bei der RFLP (*Restriction-fragment length polymorphism analysis*) wird nach einer PCR (vgl. Kapitel 4.3) ein Verdau mit Restriktions-Endonukleasen durchgeführt. Die Restriktionsenzyme haben spezifische Erkennungssequenzen, an denen sie die DNS schneiden. Je nach Position und Häufigkeit dieser spezifischen Sequenz in einem PCR-Produkt entstehen unterschiedlich viele und lange Restriktionsfragmente. Die entstehenden Fragmente können mit Hilfe einer Agarose- oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden (vgl. Kapitel 4.4, Rehbein, 2009, S. 371).

Liegen innerhalb einer Sequenz Punktmutationen (vgl. Kapitel 3.4) vor, so entstehen bei der Betrachtung mehrerer Individuen verschiedene Bandenmuster, wenn die Mutationen die Erkennungssequenzen der Enzyme beeinflussen (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 36).

4.6 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wird die genaue Basenabfolge von während der PCR amplifizierten Gensequenzen ermittelt. Das traditionelle Verfahren hierfür ist die Kettenabbruch- Methode nach Sanger (Sanger, Nicklen und Coulson, 1977). Bei dieser Methode werden beide Stränge einzeln sequenziert, indem dem Sequenzierungsansatz jeweils nur einer der in der PCR verwendeten Primer zugesetzt wird. Dem Reaktionsgemisch wird neben der DNS-Polymerase und den vier dNTPs eine kleine Menge ddNTPS (Didesoxynucleosidtriphosphate) zugesetzt. Diese ddNTPs werden von der Polymerase zwar in den DNS-Strang eingebaut, ihnen fehlt jedoch die Bindungsstelle, die ein weiteres Verlängern der Kette an dieser Stelle erlaubt. So entstehen DNS-Fragmente von unterschiedlicher Länge, die alle mit einem ddNTP enden. Diese

Fragmente können elektrophoretisch aufgetrennt und so die Basenabfolge innerhalb der DNS-Sequenz ermittelt werden. Alle ddNTPs sind kovalent an vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gebunden, so dass jede Base anhand ihrer Fluoreszenz-Farbe erkannt werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, alle vier Didesoxyreaktionen gleichzeitig zu analysieren (Sanger, Nicklen und Coulson, 1977, S. 5463f; Beaumont, Boudry, Hoare, 2010, S. 30ff).

In der Abbildung 5 sieht man den Ausschnitt aus einer solchen Analyse. Jeder Peak steht für eine der vier Basen. Liegen mehrere Peaks übereinander, so kann die Base für diese Position in der Nukleotid-Sequenz nicht eindeutig ermittelt werden. Die Kennzeichnung solcher Positionen ist in der Tabelle 1 aufgeschlüsselt.

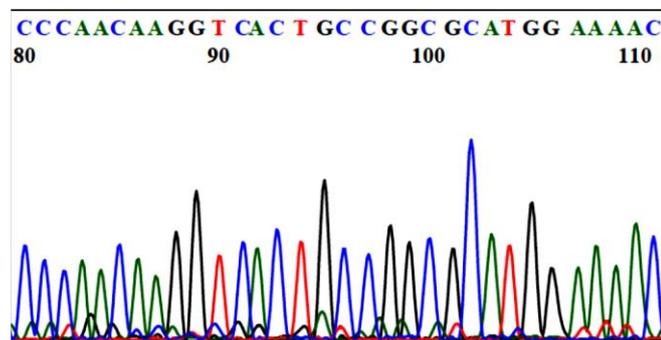


Abbildung 5: Ausschnitt aus der Analyse einer Calmodulin-Intron Sequenz (Eigene Darstellung, A=Adenin, T=Thymin, G=Guanin, C= Cytosin)

Tabelle 1: Bedeutung der Symbole in der aus den Didesoxyreaktionen ausgelesenen Nukleotid-Sequenz

Symbol	Mögliche Basen
R	A/G
Y	C/T
M	A/C
K	G/T
S	G/C
W	A/T
H	A/T/C
B	G/T/C
D	G/A/T
V	G/A/C
N	A/G/T/C

4.7 Klonierung

Die Klonierung ist neben der PCR eine weitere Technik zur Vervielfältigung gewünschter DNS-Sequenzen. Dabei wird das interessierende DNS-Fragment in einen Vektor integriert, der in eine Wirtszelle (meist eine modifizierte Form von *Escherichia coli*) übertragen wird. Die Übertragung des Vektors in die Bakterienzelle erfolgt meist durch einen kurzen Hitzeschock.

Als Vektor dienen in den meisten Fällen Plasmide. Plasmide sind kleine, ringförmige DNS-Moleküle, die während der bakteriellen Reproduktion unabhängig vom bakteriellen Genom vervielfältigt werden. Somit wird auch die in das Plasmid integrierte DNS vervielfältigt.

Die Vermehrung der Bakterien erfolgt auf speziellen Nährböden, in denen unter anderem Ampicillin und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) enthalten ist. Um die Selektion der Klone für den Anwender zu vereinfachen, enthalten die als Vektor verwendeten Plasmide Gene für eine Ampicillin-Resistenz sowie für B-Galaktosidase. Die *Escherichia coli*-Zellen selbst sind nicht Ampicillin-resistent, so dass nur Bakterien auf den Platten wachsen können, die ein Plasmid und somit die Ampicillin-Resistenz aufgenommen haben. Mit Hilfe des Gens für B-Galaktosidase können des Weiteren Bakterienkolonien, die ein DNS-Fragment in das Plasmid integriert haben, von solchen mit nicht-rekombinanter DNS unterschieden werden. Die B-Galaktosidase erzeugt mit dem in den Nährböden enthaltenen X-Gal ein blaues Reaktionsprodukt. Wird rekombinante DNS in das Plasmid integriert, kommt es zur Deaktivierung des B-Galaktosidase-Gens, die Kolonien auf den Platten sind also weiß (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 20f.; Hermey, 2010, S.12).

Neben dem Ziel, DNS zu vervielfältigen, ist es mit der Klonierung möglich, verschiedene in einer PCR entstandene Amplikons zu vereinzeln. Dies ist notwendig, um die verschiedenen PCR-Produkte sequenzieren zu können. Dies ist auch der Grund für die Anwendung dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit.

5 Populationsgenetische Methoden

Als eine Population wird eine Gruppe von Individuen einer Art, die miteinander eine Fortpflanzungsgemeinschaft bilden und räumlich von anderen Individuen der gleichen Art getrennt sind, bezeichnet. Populationsgenetik ist daher die Untersuchung der genetischen Zusammensetzung und der Evolution von Populationen. (Graw, 2010, S. 501f).

Die genetische Variabilität oder die genetische Differenzierung von Populationen kann mit Hilfe populationsgenetischer Modelle und Berechnungen analysiert werden (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 3f). Eine mögliche Anwendung ist beispielsweise die Analyse von Genen und Genomen zur Untersuchung der evolutionären Entwicklung verschiedener Spezies.

5.1 Das Hardy-Weinberg Modell

Eins der wichtigsten Modelle in der Populationsgenetik ist das Hardy-Weinberg Modell. Es wurde im Jahre 1908 von Godfrey Hardy und Wilhelm Weinberg entwickelt. Mit Hilfe dieses Modells kann eine Beziehung zwischen den beobachteten und erwarteten Genotyp-Frequenzen hergestellt werden.

Dem Modell liegen mehrere Annahmen zu Grunde (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 8f):

- Diploide Organismen
- Sexuelle Reproduktion
- Keine überlappenden Generationen
- Betrachtetes Gen hat zwei Allele
- Panmixie (Paarung zwischen allen Individuen gleich wahrscheinlich)
- Große Population (theoretisch: unendlich groß)
- Einfluss von Migration, Selektion und Mutation ist vernachlässigbar

Die Beziehung zwischen Allel- und Genotyp-Frequenz für einen Locus mit zwei Allelen stellt sich unter Annahme des Hardy-Weinberg Modells wie in Tabelle 2 dar (Hartl und Clark, 2007, S. 48f).

Tabelle 2: Berechnung der Genotyp-Frequenzen

Genotyp	AA	Aa	aa
Häufigkeit	p^2	$2 \cdot (p \cdot q)$	q^2
	$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$		

p und q sind die Häufigkeiten der Allele A und a. p^2 ist die Häufigkeit des homozygoten Genotyps AA, $2 \cdot (p \cdot q)$ die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps Aa und q^2 die Häufigkeit des anderen homozygoten Genotyps aa. Anhand der Genotyp-Frequenzen wird die erwartete Anzahl von Individuen je Genotyp errechnet. Diese Erwartungswerte werden mit Hilfe eines statistischen Tests (vgl. Kapitel 7.7.3) mit den tatsächlich beobachteten Genotypen verglichen. So wird geprüft, ob die beobachteten Genotypen in einer Stichprobe von den Erwartungen im Rahmen des Hardy-Weinberg Modells abweichen. Eine signifikante Abweichung kann durch eine Verletzung der oben aufgeführten Modell-Annahmen beobachtet werden (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S.9; Beaumont, Boudry, Hoare, 2010, S. 51f).

Das Hardy-Weinberg Modell stellt die Basis für eine Einschätzung der auf eine Population wirkenden Evolutionsfaktoren dar. Wichtige populationsgenetische Prozesse, die eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Modell bewirken können, sind natürliche Selektion, Mutation, genetische Drift und Migration. Des Weiteren kann es durch die Kopplung von Genen zu einer Abweichung von den erwarteten Allelen kommen.

Natürliche Selektion, also die Auslese von bestimmten Genotypen auf Grund ihres höheren Fortpflanzungserfolgs (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 52), wird im Folgenden nicht näher betrachtet. Dieser Faktor hat für die im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Introns keine Bedeutung, da diese nicht für Proteine codieren und somit selektionsneutral sind (vgl. Kapitel 3.4).

Mutationen wurden im vorherigen Abschnitt bereits als Quelle für genetische Variabilität diskutiert (vgl. Kapitel 3.3 und 3.4). Für die Untersuchung der genetischen Differenzierung im Rahmen dieser Arbeit sind Mutationsprozesse und ihre Effekte auf das Hardy-Weinberg Gleichgewicht jedoch zu vernachlässigen. Der Effekt von Mutationen auf die Allel-Frequenzen einer Population ist nur über sehr lange Zeit hinweg messbar und daher hier in diesem Zusammenhang nicht quantifizierbar (Hallermann und Epifanio, 2003, S. 136f).

Die Veränderung der Allel-Frequenzen innerhalb einer Population auch ohne Selektion, Mutation oder Migration kann durch genetische Drift hervorgerufen werden. Dabei handelt es sich um die zufällige Auslese von bestimmten Genotypen. Dies kann entweder durch die zufällige „Selektion“ bestimmter Gameten oder geschlechtsreifer Tiere, die ein bestimmtes Allel tragen, geschehen. Ein mögliches Szenario ist zum Beispiel eine Umweltkatastrophe, bei der zufällig der Teil einer Population stirbt, der ein bestimmtes Allel trägt. So können Allele ohne biologische Begründung verloren gehen. Die genetische Drift hat in kleinen Populationen einen stärkeren Effekt als in großen (Hallermann, 2003, S. 197f).

Durch Migrationsprozesse kommt es zu einem genetischen Austausch zwischen Populationen, was auch als Genfluss bezeichnet wird. Indikatoren für Genfluss zwischen Populationen sind eine Abweichung von den erwarteten Genotyp-Frequenzen im Rahmen des Hardy-Weinberg Modells oder der sogenannte Wahlund Effekt. Unter dem Wahlund Effekt versteht man einen Überschuss von homozygoten Genotypen innerhalb einer Population (Gharrett und Zhivotovsky, 2003, S. 141f). Im Kapitel 5.2 wird dieses Phänomen noch einmal ausführlich beschrieben.

Liegen Gene auf einem Chromosom sind sie in der Regel gekoppelt und werden gemeinsam vererbt. Unter Annahme des Hardy-Weinberg Modells wird jedoch eine freie Anordnung der Allele aller Gene in den Gameten, also Panmixie, vorausgesetzt. Ist dieses Kriterium nicht erfüllt, kann eine Abweichung von den eigentlich zu erwartenden Genotyp-Frequenzen auftreten, was man als Kopplungsungleichgewicht (*Linkage Disequilibrium*) bezeichnet. Auch zwischen dicht nebeneinander liegenden SNPs wird häufig ein Kopplungsungleichgewicht beobachtet. (Hallermann, Brown und Epifanio, 2003, S. 9; Hartl und Clark, 2007, S. 73f).

5.2 Untersuchung der genetischen Differenzierung

Eine Population ist oft in sogenannte Subpopulationen unterteilt. Die so entstehende Populationsstruktur ist bei vielen Organismen natürlicherweise vorhanden. So organisieren sich zum Beispiel Fische in Schwärmen oder Säugetiere in einem Herdenverband. Dies kann eine Ursache für eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht sein, da die Annahme der Panmixie für die Population nicht zutreffend ist. Die Subpopulationen differenzieren sich daher genetisch (Hartl und Clark, 2007, S. 275).

Eine Möglichkeit, die genetische Populationsstruktur zu beschreiben, ist die sogenannte F-Statistik nach Wright. Mit Hilfe des Fixierungsindex F_{ST} kann die Reduktion der Heterozygotie innerhalb einer Subpopulation relativ zur gesamten Population wie in Formel 1 berechnet werden (Hartl und Clark, 2007, S. 281f).

$$(1) \quad F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

H_T spiegelt die Heterozygotie der Gesamtpopulation und H_S die Heterozygotie der Subpopulation wider.

Eine allgemeinere Definition des F_{ST} lässt sich wie in Formel 2 darstellen (Hudson *et al.*, 1992, S.584).

$$(2) \quad F_{ST} = 1 - \frac{H_W}{H_b}$$

H_W gibt die durchschnittliche Anzahl von paarweisen Unterschieden von Individuen einer Subpopulation und H_b die durchschnittliche Anzahl von paarweisen Unterschieden zwischen Individuen verschiedener Subpopulationen wieder.

Eine weitere Möglichkeit, die genetische Distanz zwischen Populationen zu messen, ist Nei's D , der die durchschnittliche Anzahl von Nukleotid-Unterschieden pro Locus misst. Die Berechnung dieses Werts ist in Kapitel 7.7.6 dargestellt. Im Gegensatz zu F_{ST} (in seiner ursprünglichen Definition nach Wright) basiert dieser Wert nicht auf der Heterozygotie sondern auf der Anzahl von Unterschieden zwischen Haplotypen.

Ist eine Population in mehrere voneinander getrennte Subpopulationen unterteilt, so steigt außerdem die Wahrscheinlichkeit, dass innerhalb der Untergruppen genetische Drift oder Inzucht auftritt. Dies hat zur Folge, dass der Anteil von Homozygoten in der Gesamtpopulation höher liegt, als im Rahmen des Hardy-Weinberg Modells erwartet. Dieses als Wahlund Effekt bezeichnete Phänomen ist außerdem charakteristisch für Populationen, in die Immigration stattfindet (vgl. Kapitel 5.1). Er tritt unabhängig von einer Kreuzung zwischen Individuen der unterschiedlichen Populationen auf. Ein Kennwert für einen Überschuss von homozygoten Genotypen ist der Inzucht-Koeffizient nach Wright (F_{IS}), der sich grundsätzlich wie in Formel 3 errechnen lässt.

$$(3) \quad F_{IS} = 1 - \frac{H_{beob.}}{H_{erw.}}$$

$H_{beob.}$ gibt die beobachtete relative Heterozygotie und $H_{erw.}$ die erwartete relative Heterozygotie unter der Annahme des Hardy-Weinberg Modells wieder. Die Beobachtung des Wahlund Effekts in natürlichen Populationen ist jedoch selten, da der Effekt in den meisten Fällen zu gering ist, um statistisch signifikant zu sein (Gharrett und Zhivotovsky, 2003, S. 142ff).

5.3 Genetische Differenzierung mit der EPIC-PCR

Die genetische Differenzierung der Seelachs-Bestände im Rahmen dieser Arbeit wird mit Hilfe der EPIC-PCR (*Exon primed, Intron-crossing Polymerase Chain Reaction*) untersucht. Im Folgenden soll diese Methode genauer vorgestellt sowie eine Übersicht über bisherige

Untersuchungen von marinen Spezies mit Hilfe der EPIC-PCR gegeben werden. Des Weiteren wird die genetische Herkunft der in dieser Arbeit verwendeten EPIC-Primer, CalmEX 4F/5R und Act 2F/2R erläutert.

Die EPIC-PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von nicht codierenden Intron-Sequenzen innerhalb phylogenetisch weit verbreiteter Gene (Côte-Real, Dixon und Holland, 1994, S. 407). Introns zeichnen sich durch ein hohes Maß an genetischer Variabilität aus. Des Weiteren sind sie selektionsneutral und eignen sich somit als Marker für die genetische Differenzierung von Populationen innerhalb einer Spezies (vgl. Kapitel 3.4)

Die für diese Methode verwendeten Primer sind komplementär zu den in hohem Maße konservierten Exon-Sequenzen, die die interessierenden Intron-Sequenzen einschließen (Lessa, 1992, S. 323; Côte-Real, Dixon und Holland, 1994, S. 407). Die Nukleotid-Sequenz und die Länge der Exons, sowie die Position der Introns können innerhalb von Genen auch zwischen phylogenetisch weit voneinander entfernten Spezies konservativ sein, so dass ein Primerpaar mit verschiedenen Spezies funktionieren kann (Chow, 1998, S. 999; Chow und Hazama, 1998, S. 1255). Daraus ergibt sich der Vorteil, dass für das Design der Primer Datenmaterial aus der Literatur oder einschlägigen Datenbanken herangezogen werden kann (Côte-Real, Dixon und Holland, 1994, S. 407). Ein Nachteil, der sich aus der universellen Einsetzbarkeit der Primer ergibt, ist das Kontaminationsrisiko mit Fremd-DNS. Kontaminationen sind jedoch in der Regel leicht erkennbar, da sich für verschiedene Spezies unterschiedliche Intron-Profile ergeben (Atarhouch *et al.*, 2003, S. 676).

Die EPIC-PCR wurde durch E.P. Lessa bekannt, der 1992 mit Hilfe dieses Verfahrens die Populationsstruktur der Taschenratte (*Thomomys bottae*) untersuchte.

Eine Übersicht zu weiteren Arbeiten hinsichtlich der EPIC-PCR ist in Tabelle 3 dargestellt.

Côte-Real, Dixon und Holland (1994) konnten auf Basis der von Lessa entwickelten Methode zwei für Calmodulin codierende Gene in *Mytilus sp.* (Miesmuscheln) nachweisen. Sie entwickelten daraufhin spezifische Primer für das dritte Intron des Calmodulin I-Gens und untersuchten auf diese Weise die Populationsstruktur von in sechs verschiedenen Regionen gefangenen Miesmuscheln. Fünf der sechs Regionen waren im Hardy-Weinberg Gleichgewicht, weshalb der gefundene Marker als selektionsneutral angesehen wurde. Des Weiteren wurde im Rahmen eines Vergleichs der Allel-Frequenzen eine Isolation einiger Bestände rund um Großbritannien festgestellt.

Chow (1998), Chow und Hazama (1998), Bierne *et al.* (2000), Hassan *et al.* (2002) und Atarhouch *et al.* (2003) entwickelten und testeten in ihren Arbeiten eine Vielzahl von EPIC-Primern an verschiedenen marinen Spezies. Im Rahmen der Arbeiten konnten bei vielen Arten mehrere Allele pro Locus, Längenpolymorphismen sowie mehrere amplifizierte Loci entdeckt werden. So konnten beispielsweise Chow und Hazama (1998) im zweiten Intron des Gens für das Ribosomale S7 Protein in Gelbflossen-Thun vier Allele nachweisen. Hassan *et al.* (2002) entdeckten in vierzehn der siebzehn untersuchten Intron-Sequenzen Längenpolymorphismen mit zwei bis vierzehn Allelen. Die Amplifizierung von mehreren Loci erklärten mehrere Autoren mit der Anwesenheit eines weiteren Gens für das entsprechende Protein beziehungsweise durch die Anwesenheit von Pseudogenen (Hassan *et al.*, 2002, S. 334, Côte-Real, Dixon und Holland, 1994, S. 409, Chow, 1998, S. 1000). Als Pseudogene werden codierende DNS-Sequenzen bezeichnet, die durch Mutationen nicht exprimiert werden können (Hartl und Clark, 2007, S. 346).

In den Arbeiten von Berrebi *et al.* (2004), Rolland *et al.* (2007) und Atarhouch *et al.* (2007) konnte die EPIC-PCR erfolgreich zur Differenzierung von Populationen eingesetzt werden. Berrebi *et al.* (2004) testeten insgesamt 24 verschiedene EPIC-Primer an Korea-Raubkarpfen. Die Differenzierung erfolgte letztlich anhand von fünf polymorphen aber dennoch einfach interpretierbaren Intron-Markern. Die Populationen konnten in vier verschiedene genetische Gruppen unterteilt werden. Diese Differenzierung erfolgte basierend auf der genetischen Distanz zwischen den Gruppen. Rolland *et al.* (2007) konnten in ihrer Arbeit die bereits mit Hilfe anderer Marker nachgewiesene genetische Struktur der Seezunge bestätigen. Innerhalb einer Region wurden Proben zu verschiedenen Zeiten im Jahr gezogen, um die genetische Differenzierung über mehrere Alters-Kohorten hinweg analysieren zu können. Im Mittelmeer weisen die Bestände eine genetische Strukturierung auf, während die Population im Atlantik panmiktisch ist. Die Differenzierung erfolgte auf Basis von Weir und Cockerhams ϕ_{ST} (vgl. Kapitel 7.7.5), einem Schätzer von Wrights F_{ST} . Die Marker waren (bis auf einen Locus) über die Kohorten hinweg stabil. Atarhouch *et al.* (2007) untersuchten mit Hilfe der EPIC-Methode die genetische Struktur der Sardinen-Population vor Marokko. Mit Hilfe zweier Marker, die sechs beziehungsweise neun Allele aufwiesen, konnten die Populationen in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden. Eine schwache Differenzierung zwischen den Populationen der nördlichen und der südlichen Atlantikküste Marokkos könnte laut den Autoren auf genetische Drift zurückzuführen sein.

Tabelle 3: Literaturübersicht EPIC-PCR

Autor	Gen	Introns	Untersuchte Spezies	Besonderheiten	Ergebnisse
Lessa (1992)	β-Globin	1	Taschenratte (<i>Thomomys bottae</i>)	-	<ul style="list-style-type: none"> • Drei Allele an untersuchtem Locus • Zwei Allele Regionsspezifisch
Côrte-Real, Dixon und Holland (1994)	Calmodulin	3	Miesmuscheln (<i>Mytilus sp.</i>)	-	<ul style="list-style-type: none"> • Mindestens zwei Gene für Calmodulin in <i>Mytilus sp.</i> • Marker ist selektionsneutral • Hinweise auf getrennte Populationen
Chow und Hazama (1998)	Ribosomales S7 Protein	1,2	Ketalachs (<i>Onchorhynchus Keta</i>), Gelbflossen-Thun (<i>Thunnus albacares</i>), Pufferfisch (<i>Fugo rubripens</i>)	Primer-Screening	<ul style="list-style-type: none"> • Selektionsneutraler Marker in Gelbflossen Thun • Nur ein PCR-Produkt, Länge ist unterschiedlich für die verschiedenen Arten
Chow (1998)	Calmodulin	4	11 Arten, u.a. Ketalachs (<i>Onchorhynchus Keta</i>), Gelbflossen-Thun (<i>Thunnus albacares</i>) und Schwertfisch (<i>Xiphias Gladius</i>)	Primer-Screening	<ul style="list-style-type: none"> • Selektionsneutraler Marker in Schwertfisch • Z.T mehr als ein PCR-Produkt (z.B. bei drei Thunfischarten) • Kein PCR-Produkt in Pufferfisch
Chow und Takeyama (1998)	Kreatin Kinase, Ribosomales S7 Protein	6 (Kreatin Kinase) und 1 (Ribosomales S7 Protein)	Schwertfisch (<i>Xiphias Gladius</i>)	-	<ul style="list-style-type: none"> • S7 Ribosomales Protein: Längenpolymorphismus (Mikrosatellit) • Jeweils Phänotypen mit 1 oder 2 Banden • Insertionen und Deletionen von Basenpaaren in beiden Introns
Bierne et al. (2000)	13 Gene, darunter Aktin und Chymotrypsin B	Jeweils 1 Intron je Gen, z.B. 1 (Aktin)	3 Garnelenarten (<i>Penaeus monodon</i> , <i>vannamei</i> und <i>japonicus</i>)	Primer-screening	<ul style="list-style-type: none"> • Längenpolymorphismen in 4 Introns • Z.T. mehr als ein PCR-Produkt

Autor	Gen	Introns	Untersuchte Spezies	Besonderheiten	Ergebnisse
Hassan et al. (2002)	9 Gene, darunter Gonadotropin-freisetzendes Hormon 3 und Aldolase B	Insgesamt 17, u.a. 1,2 und 3 (Gonadotropin-freisetzendes Hormon 3) und 1,2,4 und 5 (Aldolase B)	<i>Teleostii</i> , z.B. Kaninchenfisch (<i>Siganus rivulatus</i>) und Großaugen-Thun (<i>Thunnus obesus</i>)	Primer-screening	<ul style="list-style-type: none"> In 14 Introns wurden Längenpolymorphismen mit 2-14 Allelen gefunden Z.T. mehrere PCR-Produkte
Atarhouch et al. (2003)	Opsin, Myosin, Aktin, Chymotrypsin B und Calmodulin	1 (Opsin), 3 (Myosin), 2 (Aktin), 6 (Chymotrypsin B), 3 (Calmodulin)	20 Arten, darunter Hechtbarsch (<i>Merluccius Merluccius</i>) und Sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	Primer-screening	<ul style="list-style-type: none"> Primer arbeiteten mit den meisten der getesteten Arten Z.T. Längenpolymorphismen und mehrere PCR-Produkte
Berrebi et al. (2006)	Aktin, Calmodulin, Kreatin Kinase, Myosin	Insgesamt 24, davon auswertbar: 1,2 (Aktin), 4 (Calmodulin), 6 (Kreatin Kinase), 3 (Myosin)	Korea-Raubkarpfen (<i>Opsariichthys bidens</i>)	N= 198 (14 Orte)	<ul style="list-style-type: none"> Längenpolymorphismen in 5 der amplifizierten Loci Population konnte anhand der der Marker in 4 Gruppen unterteilt werden
Rolland et al. (2007)	Metallothionein und Amylase	1 (Metallothionein), 2 und 3 (Amylase)	Seezunge (<i>Solea Solea</i>)	N=794 (24 Orte)	<ul style="list-style-type: none"> Differenzierung der Population in 2 Gruppen Differenzierung konstant über Alterskohorten
Atarhouch et al. (2007)	Calmodulin und Opsin	4 (Calmodulin), 1 (Opsin)	Sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	N=346 (7 Orte)	<ul style="list-style-type: none"> 6 (Calmodulin) bzw. 9 (Opsin) verschiedene Allele Differenzierung der Population in zwei (bzw. 3) Gruppen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit neun verschiedenen in der Literatur diskutierten Primersystemen gearbeitet. Letztendlich sind zwei von ihnen für die Analyse der Variabilität der Seelachs-Bestände ausgewählt worden. Dabei handelt es sich zum einen um den Primer CalmEX 4F/5R (Chow, 1998) und zum anderen um Act 2F/2R (Atarhouch *et al.*, 2003). Diese Primer wurden auch erfolgreich von Berrebi *et al.* (2006) verwendet, der Primer CalmEX 4F/5R wurde außerdem in der Arbeit von Atarhouch *et al.* (2007) eingesetzt (Tabelle 3).

Der Primer CalmEX 4F/5R wurde auf Basis der Sequenz des menschlichen Calmodulin III-Gens aus der Arbeit von Koller, Schnyder und Strehler (1990) und der Sequenz des Calmodulin A-Gens aus *Oryzias latipes* (Matsuo *et al.*, 1992) entwickelt. Die Bindungsstellen der Primer befinden sich im vierten beziehungsweise fünften Exon des Gens. Mit diesem Primer wird das vierte Intron des Gens amplifiziert.

Calmodulin ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das für die Übertragung von Ca^{2+} -abhängigen Signalen innerhalb der Zelle benötigt wird. Es ist in diesem Zusammenhang an verschiedenen wichtigen zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Zellteilung beteiligt. Außerdem spielt es im intermediären Stoffwechsel eine Rolle (Koller, Schnyder und Strehler, 1990, S. 180, Matsuo *et al.*, 1992, S. 279).

Die Aminosäure-Sequenz von Calmodulin ist hoch konserviert und unterscheidet sich nur geringfügig zwischen Fischen und Säugetieren. Innerhalb des Genoms gibt es jedoch, je nach Spezies, eine oder mehrere unterschiedliche Sequenzen, die für Calmodulin codieren. So konnten für Mensch, Maus und Ratte drei verschiedene für Calmodulin codierende Gene gefunden werden, die mit Calmodulin I-III bezeichnet werden (Matsuo *et al.*, 1992, S. 279). Jeweils nur ein entsprechendes Gen tragen beispielsweise *Drosophila melanogaster* und Hefe (Koller, Schnyder und Strehler, 1990, S. 180). Für den zur Gattung der Echten Knochenfische gehörenden Medaka (*Oryzias latipes*) konnten insgesamt vier Gene für das Protein Calmodulin (CaM A-D) entdeckt werden (Matsuo *et al.*, 1992, S. 279ff).

Der in dieser Arbeit verwendete Primer Act 2F/2R wurde von Atarhouch *et al.* (2003) entwickelt. Als Grundlage dienten dafür die für α 1-Aktin codierenden Gen-Sequenzen von Medaka, Huhn und *Drosophila melanogaster*.

Aktine sind hoch konservierte Proteine, die in allen eukaryotischen Zellen zu finden sind. In Säugetieren sind sechs verschiedene Isoformen zu finden. β - und μ -Aktin kommen hauptsächlich im Zytoplasma vor und werden auch als Nicht-Muskel-Aktin bezeichnet. Sie werden für die Aufrechterhaltung des Zytoskeletts und für Zellteilungsprozesse benötigt. Des

Weiteren unterscheidet man skelettales (α 1-Aktin) sowie kardiales α -Aktin, die in der Skelett- sowie der Herzmuskulatur lokalisiert sind. α 2-Aktin und μ 2-Aktin kommen hingegen in der glatten Muskulatur der Aorta beziehungsweise des Darms vor. Diese Aktine erfüllen unter anderem Aufgaben bei Kontraktionsprozessen der Muskeln (Hao, 2006, S. 133).

6 Seelachs (*Pollachius virens*)

Im Folgenden soll ein Überblick über die Lebensweise, die Verbreitung sowie den Zustand der Bestände des Seelachses gegeben werden. Der Begriff „Bestand“ definiert sich als Reproduktionseinheit einer Art, die in einem bestimmten geographischen Gebiet lebt (Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.), 2012c). Diese Definition legt nahe, dass ein „Bestand“ äquivalent mit einer „Population“ ist. Der Begriff „Bestand“ wird in dieser Arbeit jedoch nicht als Äquivalent zu dem Begriff „Population“, sondern im Sinne der durch den ICES klassifizierten Beständen definiert. Zwischen den unterschiedlichen Fischbeständen kann es zu Vermischungen kommen. Dies wird im letzten Abschnitt dieses Kapitels genauer betrachtet.

6.1 Biologie

Der Seelachs (*Pollachius virens*) (Abbildung 6) ist den Dorschfischen (*Gadiformes*) zuzuordnen. Er gehört, ebenso wie zum Beispiel der Kabeljau (*Gadus morhua*) und der Alaska-Pollack (*Theragra chalcogramma*) in die Familie der Dorsche (*Gadidae*). Die systematische Einordnung stellt sich wie folgt dar (Reinsch, 1976, S. 12):

Überordnung: *Teleostii* = Echte Knochenfische

Ordnung: *Gadiformes* = Dorschfische

Unterordnung: *Gadoidei* = Dorsche

Familie: *Gadidae* = Dorsche

Gattungen (unter anderem):

- *Theragra* = Alaska- Pollack
- *Gadus* = Kabeljau
- ***Pollachius* = Köhler**

Arten:

- *Pollachius Pollachius* = Steinköhler
- ***Pollachius virens* = Seelachs (Köhler)**

Die Fische leben meist in Bodennähe (benthopelagisch), zeigen aber auch pelagisches Verhalten und halten sich in der Nähe der Wasseroberfläche auf. Seelachse werden maximal 130 cm lang und 32 kg schwer. Sie können ein Alter von 25 Jahren erreichen. (Froese und Pauly, (Hrsg.), 2011; Homrum *et al.*, 2012, S.1).

Das Ablegen der Eier findet von Januar bis März oder April statt (Reinsch, 1976, S. 61). Die Larven schlüpfen, abhängig von der Wassertemperatur, nach sechs bis neun Tagen im offenen Wasser und leben die ersten zwei bis vier Lebensjahre getrennt von den Adulten in Schwärmen nahe der Küste oder in Fjorden, wo sie sich von kleineren Crustaceen ernähren (Reinsch, 1976, S. 68; Froese und Pauly (Hrsg.), 2011; Homrum *et al.*, 2012, S. 1; Olsen *et al.*, 2010, S. 93). Ältere Fische migrieren in offenes Gewässer und ernähren sich dort räuberisch, unter anderem von pelagischen Crustaceen und Atlantischem Hering (Armannsson *et al.*, 2007, S. 1006; Homrum, 2012, S. 1; Olsen *et al.*, 2010, S. 93). Das Erreichen der Geschlechtsreife ist abhängig von der Herkunft und dem Geschlecht der Tiere. So erreichen 50 % der männlichen färingischen Seelachse mit durchschnittlich 5,2 Jahren (oder einer Länge von 55 cm) und 50 % der weiblichen mit durchschnittlich 6,1 Jahren und einer Länge von 61 cm sexuelle Reife. In isländischen und nordostarktischen Gewässern reifen die Tiere geschlechtsunabhängig mit durchschnittlich 6,1 beziehungsweise 5,5 Jahren heran (Homrum, 2012a, S. 10).



Abbildung 6: Seelachs (*Pollachius virens*) (Froese und Pauly (Hrsg.), 2011)

6.2 Geographische Verbreitung

Seelachs kommt ausschließlich im Nordatlantik vor. Im Nordwest-Atlantik gibt es einen kleinen Bestand an der Grenze zwischen den USA und Kanada (Olsen *et al.*, 2010, S. 93).

Im Nordost-Atlantik (FAO-Fanggebiet 27) lebt der Seelachs in den Gewässern westlich von Irland und Schottland, östlich von Grönland, um Island, Spitzbergen und die Färöer Inseln, in der Nordsee und vor der Küste Norwegens (siehe Abbildung 7) (Froese und Pauly (Hrsg.), 2011, Olsen *et al.*, 2010, S.93; Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.), 2012b). Die Laichgebiete des Seelachses sind ebenfalls in der Abbildung dargestellt. Diese Gebiete erstrecken sich von der Westküste Großbritanniens und vor den Küsten Irlands in die nördliche Nordsee bis nach Norwegen. Vor Norwegen sind Laichgebiete sowohl vor Mittelnorwegen als auch vor der nördlichen Küste nahe den Lofoten. Außerdem sind Laichplätze vor der nord-westlichen Küste Islands und der Ostküste der Färöer Inseln zu finden (Reinsch, 1976, S. 62ff).

Die Population lässt sich laut ICES in vier Bestände klassifizieren (Abbildung 7):

- Färöer (Vb)
- Island (Va)
- Nordsee (IV), Skagerrak (IIIa), Schottland (VI)
- Nordost-Arktis (I und II) (ICES,2012).

Der Seelachs kommt außerdem in den Keltischen Meeren (VII) sowie vor der Küste Ostgrönlands (XIV) vor (Abbildung 7). Diese Vorkommen werden jedoch nicht durch den ICES klassifiziert.

Die römischen Zahlen in den Klammern geben die Bezeichnung des jeweiligen ICES-Untergebiets wieder. Diese Einteilung basiert auf den Anforderungen zur Sammlung statistischer Daten und des Fischereimanagements, es gibt jedoch auch Übereinstimmungen mit Ökoregionen. Die Grenzen dieser Managementgebiete sind nicht zwingend die Grenzen für die Verbreitungsgebiete der Fischbestände (Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.),2012c).

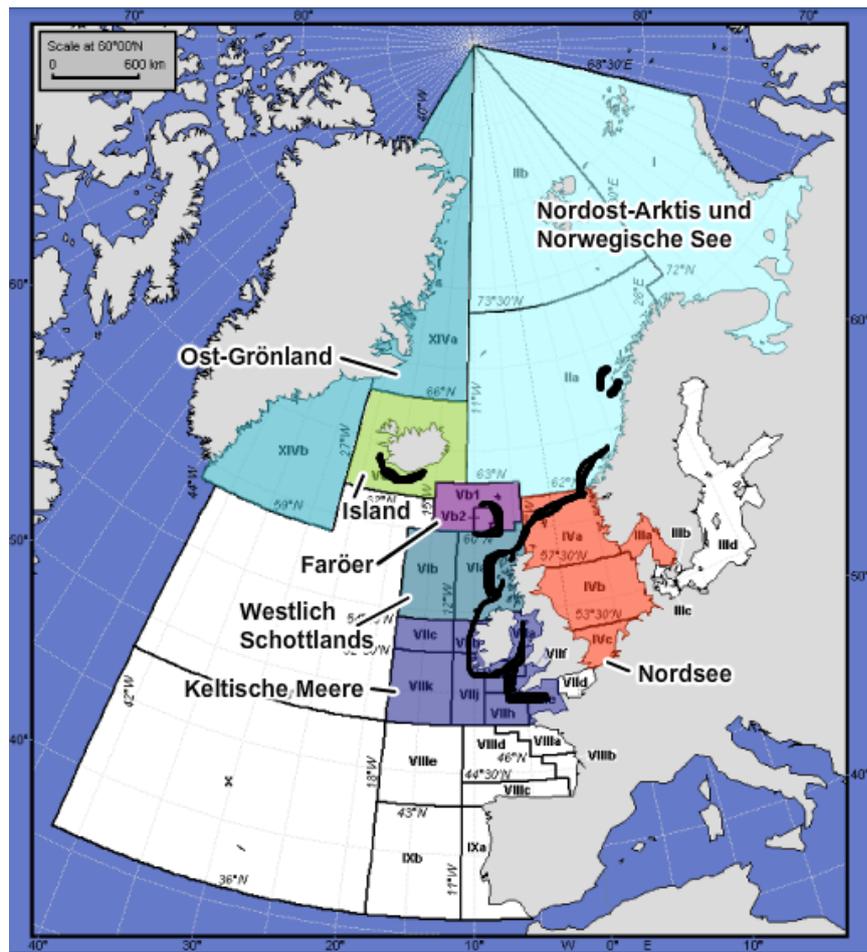


Abbildung 7: Fanggebiete für Seelachs mit Laichgebieten (nach Reinsch, 1976, S. 63) (Karte: Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.),2012a)

6.3 Zustand der Bestände

Der Zustand der Seelachs-Bestände im Nordost-Atlantik wird durch den ICES bewertet, wobei die einzelnen im vorherigen Kapitel beschriebenen Bestände jeweils eine Bewertungseinheit darstellen.

In Tabelle 4 ist der Zustand der Seelachsbestände im Nordost-Atlantik nach dem Prinzip des höchstmöglichen maximalen Dauerertrags (*Maximum Sustainable Yield, MSY*) dargestellt. Das Prinzip des MSY sieht vor, dass die jährlichen Fangmengen so optimiert werden, dass die Reproduktionsfähigkeit der Bestände in der Zukunft nicht beeinträchtigt wird. Es wird also nicht versucht eine feste ideale Bestandsgröße, sondern auf lange Sicht stabile Fangmengen zu erreichen. Dieses Managementkonzept soll bis 2015 in allen Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU) umgesetzt werden (Europäische Kommission, 2006). Dafür werden Zielreferenzwerte für die Laicherbiomasse (Gesamtmasse aller reproduktionsfähigen Fische) und die fischereiliche Sterblichkeit (relative Sterblichkeit bedingt durch die fischereiliche Bewirtschaftung) definiert (Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.),2012c). Diese Referenzwerte werden spezifisch für die einzelnen Bestände anhand von Modellberechnungen jährlich neu festgelegt.

Die fischereiliche Sterblichkeit des Färöer-Bestandes stieg von 1961 bis Anfang der 90er-Jahre kontinuierlich und schwankt seit dem zwischen Werten von 0,3 bis 0,5. Im Jahr 2011 liegt die fischereiliche Sterblichkeit mit 0,31 außerhalb der Schwankungsbreite um den Zielreferenzwert von 0,28. Die Laicherbiomasse schwankt seit 1961 zwischen 54.000 und 140.000 Tonnen. Der niedrigste Wert wurde Anfang der 90er-Jahre mit knapp über 50.000 Tonnen gemessen. Der Referenzwert im Jahr 2012 für die Laicherbiomasse des Färöer-Bestandes liegt bei 55.000 Tonnen. Da die Laicherbiomasse im Jahr 2011 74.200 Tonnen betrug, befindet sich der Bestand innerhalb der Schwankungsbreite um den Zielwert (ICES, 2012a und Tabelle 4).

Die Bestände um Island sowie in der Nordsee und vor Schottland werden anhand der errechneten Referenzwerte als in gutem Zustand eingestuft (Tabelle 4). Die fischereiliche Sterblichkeit des isländischen Bestands lag Mitte der 90er-Jahre mit 0,4 am höchsten und hat sich zwischen 1998 und 2011 bei 0,3 eingependelt. Die Laicherbiomasse zeigt einen äquivalenten Verlauf und liegt seit 2006 im Langzeit-Durchschnitt. Die fischereiliche Sterblichkeit des Nordsee-Bestands war von 1987 bis 2004 rückläufig, ist in den letzten Jahren jedoch leicht angestiegen. Für das Jahr 2011 liegt der Wert aber unter dem Referenzwert (ICES, 2012c und 2012d).

Auf den Seelachsbestand in der Nordost-Arktis wird ein anderes Managementkonzept angewendet, weshalb er nicht nach dem MSY-Prinzip beurteilt wird. Die norwegische Regierung hat im Jahr 2007 die *Harvest Control Rule* (HRC) implementiert, die laut ICES konform mit dem sogenannten Vorsorgeprinzip geht. Mit Hilfe des Vorsorgeprinzips sollen Fischfangmengen so angesetzt werden, dass der Bestand eine produktive Größe beibehält. Legt man der Beurteilung des Nordost-Arktischen Bestands dieses Prinzip zu Grunde, befindet er sich laut ICES in akzeptablem Zustand. Die fischereiliche Sterblichkeit des nordost-arktischen Bestands ist seit 1985 rückläufig, steigt aber seit 2005 wieder leicht an. Die Laicherbiomasse ist in den letzten Jahren ebenfalls rückläufig, liegt aber deutlich über den definierten Grenzwerten (ICES, 2012b; Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.), 2012c).

Tabelle 4: Zustand der Seelachsbestände nach ICES (Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.), 2012b)

	Anlandungen 2011 (in 1.000 t)	Laicher- biomasse 2011 (in 1.000 t)	Laicher- biomasse Zustand	Fischereiliche Sterblichkeit	Gültigkeit
Färöer (Vb)	29,1	74,2	✓	✗	06/2012 - 06/2013
Island (Va)	51,0	121,0	✓	✓	06/2012 - 06/2013
Nordost- Arktis (I, II)	193	358,0	?	?	06/2012 - 06/2013
Nordsee, Skagerrak, Schottland (IIIa, IV,VI)	97,1	217,0	✓	✓	06/2012 - 06/2013

Symbol	Laicherbiomasse	Bewirtschaftung (fischereiliche Sterblichkeit)
✓	innerhalb der Schwankungsbreite um den Zielwert	angemessen oder unternutzt
✗	außerhalb der Schwankungsbreite um den Zielwert	übernutzt
?	Zustand unklar, Referenzpunkte nicht definiert und/oder unzureichende Daten	Zustand unklar, Referenzpunkte nicht definiert und/oder unzureichende Daten

Unabhängig davon, welches Managementprinzip der Beurteilung zu Grunde liegt, empfiehlt der ICES je nach Zustand eine Anpassung der jeweiligen Fangmenge. Für den Isländischen Bestand wird für das Jahr 2013 beispielsweise eine maximale Fangmenge von 49.000 Tonnen empfohlen (ICES, 2012c). Die Entscheidungen über die jährlichen Höchstfangmengen werden in der EU im Rahmen der gemeinsamen Fischereipolitik und außerhalb der EU in Form von

internationalen Abkommen getroffen. So hat die EU beispielsweise ein Abkommen mit Norwegen über die Nutzung der Ressourcen in der Nordsee (Reiss, 2009, S. 371).

Nach den Standards des MSC (*Marine Stewardship Council*) haben sich bisher acht Seelachsfischereien im Nordost-Atlantik zertifizieren lassen. Zwei weitere befinden sich noch im Bewertungsverfahren. Der MSC wurde 1997 von der Umweltorganisation WWF (*World Wide Fund For Nature*) und dem Lebensmittelhersteller Unilever gegründet, um einen Standard für nachhaltige Fischerei zu entwickeln. Seit dem können sich Fischereien anhand dieses Standards bewerten lassen und ihre Produkte dann mit dem MSC-Siegel kennzeichnen (Abbildung 8)(MSC, 2012b). In der Nordsee sind sechs Seelachsfischereien bereits zertifiziert, eine weitere ist noch im Bewertungsverfahren. Damit stammen in der Nordsee annähernd 100 % des Gesamtfangs aus nachhaltiger Fischerei. Des Weiteren tragen zwei Fischereien in der Nordost-Arktis das MSC-Siegel, ein Bewertungsverfahren für färingischen Seelachs ist noch offen (MSC, 2012a; Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.), 2012b).



Abbildung 8: MSC-Siegel (MSC,2012d)

6.4 Differenzierung von Seelachsbeständen

Zur genetischen Differenzierung von Seelachs (*Pollachius virens*) gibt es bisher keine veröffentlichten Arbeiten (Reiss, 2009, S. 366). In einer bisher unveröffentlichten Arbeit von Eiriksson (2009) wurden Sequenzen innerhalb des Cytochrom B- sowie Cytochrom Oxidase I-Gens hinsichtlich ihrer Variabilität untersucht. Bei der Untersuchung an 360 (beziehungsweise 376) isländischen Seelachsen wurden in der Cytochrom B-Sequenz 12 und in der Cytochrom Oxidase I-Sequenz 22 Haplotypen beobachtet. Da 87 % der Seelachse denselben Cytochrom-B-Haplotyp haben, wurde für die weitere Analyse der Populationsstruktur die Cytochrom Oxidase I-Sequenz genutzt. Diese Sequenz wurde in 1160 Fischen aus Norwegen, Island, Kanada und den Färöer Inseln auf ihre Variabilität untersucht. Erste Ergebnisse weisen auf einen hohen Genfluss zwischen den untersuchten Regionen hin.

Es wurde jedoch eine Reihe von Studien durchgeführt, die mit Hilfe von Tagging-Experimenten die Verbreitung und Migrationsprozesse von Seelachs im Nordost-Atlantik untersucht haben. In diesen Arbeiten wurden Seelachse an verschiedenen Orten gefangen, markiert und wieder ausgesetzt. Anschließend wurde ausgewertet, wann und wo diese Fische wieder eingefangen

wurden und wie groß sie beim Wiedereinfangen waren. Das Wiedereinfangen der Fische erfolgte beispielsweise im Rahmen einer Studie in isländischen Gewässern hauptsächlich durch Fischer, die für die das Melden von markierten Fischen eine entsprechende Vergütung erhielten (Armansson *et al.*, 2007, S. 1009).

Die umfangreichste Betrachtung erfolgte bisher durch Homrum *et al.* (2012). In dieser Arbeit sind die Ergebnisse mehrerer Tagging-Untersuchungen um Island, die Färöer Inseln und vor der norwegischen Küste zusammengefasst. Die Studie ergab, dass die Entfernung der Fische von der Stelle, an der sie markiert wurden, mit zunehmendem Alter und zunehmender Länge größer wird. Dies gilt allerdings nur bis zu einer Länge von ungefähr 80 cm, danach wird diese Distanz wieder geringer. Erwachsene Fische (>60 cm) bewegen sich dabei auch über die Grenzen der ICES-Gebiete (vgl. Kapitel 6.2) hinweg. Die Migrationsraten unterscheiden sich zwischen den einzelnen Regionen. So emigrieren 1 % der isländischen, 7 % der kontinentalen (nordost-arktischer und Nordsee-Seelachs) und 42 % der färingischen Seelachse in andere Bestände (Homrum *et al.*, 2012, S.5f., Abbildung 9).

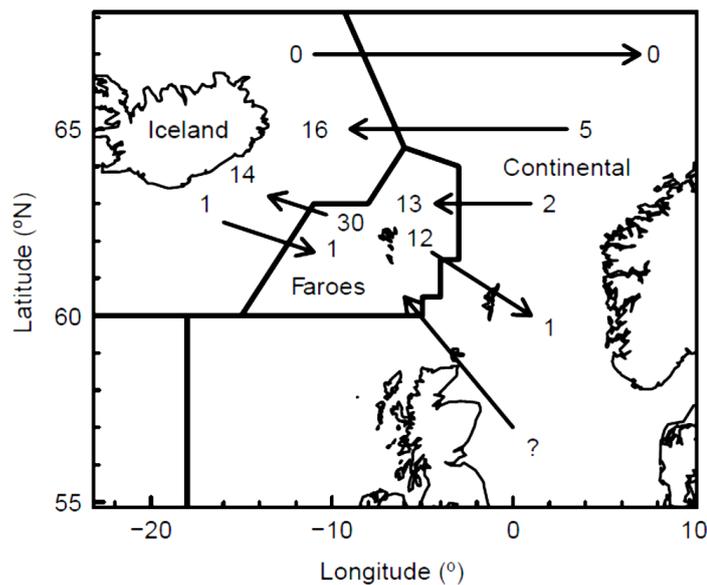


Abbildung 9: Migrationsraten (in %) von Seelachs zwischen den Gebieten um Island, den Färöer Inseln und der kontinentalen Region (Nordost-Arktis und Nordsee) (Homrum *et al.*, 2012, S. 9)

Im isländischen Bestand machen die Immigranten aus dem kontinentalen Bestand 16 % und aus dem färingische Bestand 14 % des Gesamtbestandes aus. Der relative Anteil von immigrierten Fischen aus dem kontinentalen Bestand innerhalb des färingischen beträgt 13 %. Den geringsten Effekt haben die Immigranten auf den kontinentalen Bestand, in dem 1 % der

Fische aus dem Färöer-Bestand stammt, wobei keine differenzierten Daten für den Nordsee-Bestand vorliegen (Abbildung 9).

Des Weiteren konnten auch Wanderungsbewegungen des Seelachses von Island Richtung Ostgrönland beobachtet werden. Es handelt sich dabei jedoch um Einzeltiere, die sich nicht dauerhaft in diesen Gewässern angesiedelt haben (Reinsch, 1976, S. 23).

Die Migrationsbewegungen der Seelachse lassen sich unter anderem durch die saisonale Verfügbarkeit von Beutetieren erklären. So folgen norwegische Seelachse beispielsweise dem Hering beziehungsweise färingische Fische dem Blauen Wittling Richtung Island (Homrum *et al.*, 2012, S.8). Es konnte jedoch auch nachgewiesen werden, dass erwachsene Seelachse saisonal von der nördlichen Küste Norwegens in die nördliche Nordsee emigrieren, um dort zu laichen (Olsen *et al.*, 2010, S. 94).

Neben der aktiven Migration erwachsener Tiere in andere Regionen kommt es auch zur Verdriftung von Seelachslarven beziehungsweise –laich mit der Meeresströmung. So werden westlich von Großbritannien gelaichte Larven in Richtung der Färöer Inseln oder die Brut vor Mittelnorwegen und von den Lofoten nach Norden abgetrieben (Reinsch, 1976, S. 70; Olsen *et al.*, 2010, S. 94).

7 Material und Methoden

Alle beschriebenen Untersuchungen wurden in den Laboren des Max-Rubner Instituts im Institut für Sicherheit und Qualität von Milch und Fisch am Standort Hamburg durchgeführt.

In diesem Kapitel wird zunächst die Herkunft sowie die Auswahl des verwendeten Probenmaterials dargestellt. Weiterhin wird die Längenverteilung der untersuchten Seelachse analysiert, da sie für das Migrationsverhalten der Fische von Bedeutung ist (vgl. Kapitel 6.4).

Anschließend werden alle verwendeten molekularbiologischen und statistischen Methoden erläutert und ihre Durchführung beschrieben. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen verwendeten Lösungen und Puffer ist im Anhang aufgeführt (vgl. Anhang B.3). Dort sind auch die Bezeichnungen aller verwendeten Geräte hinterlegt (vgl. Anhang B.1).

7.1 Probenmaterial

7.1.1 Herkunft und Auswahl

Im Rahmen dieser Arbeit sind Seelachse aus vier verschiedenen ICES-Untergebieten im Nordost-Atlantik analysiert worden.

Insgesamt standen 410 Seelachs-Proben für die Analyse zur Verfügung, aus denen ein Probenset von 161 Fischen für die Analyse der PCR-Produkte von CalmEX 4F/5R ausgewählt wurde. Die RFLP-Analyse auf Basis der PCR-Produkte von Act 2F/2R wurde für 154 der 161 Fische durchgeführt. Für alle Proben liegen genaue Fangdaten vor, wie aus Tabelle 5 ersichtlich wird. Die Auswahl erfolgte bei Bedarf mit Hilfe von in Microsoft Excel erzeugten Zufallszahlen. In einigen Fällen entfiel die zufällige Auswahl, da alle verfügbaren Proben analysiert wurden. Die Auswahl der Proben für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung ist ebenfalls in Tabelle 5 dargestellt. Eine Übersicht über die geographische Herkunft der untersuchten Proben gibt Abbildung 10.

Die Proben von nordost-arktischem (Seegebiet II a), ostgrönländischem (Seegebiet XIV b) und Nordsee-Seelachs (Seegebiet IV a) stammen von Forschungsreisen des Max-Rubner Instituts.

Tabelle 5: Probenauswahl

Fang-bezeichnung	Region bzw. Bestand nach ICES	ICES-Gebiet	Fangort	Koordinaten	Koordinaten	Probenzahl	Proben-auswahl
Hol 6	Nordsee	IV a	Eigersund Bank	58°01'N	04°56'E	49	5
Hol 14	Nordsee	IV a	Viking Bank	60°42'N	02°47'E	64	5
Hol 19	Nordsee	IV a	Fair Isle Bank	59°31'N	01°10'W	11	5
Hol 28-30	Nordsee	IV a	Tampen	62°04'N	00°00'E	50	5
Hol 33	Nordsee	IV a	The Patch	59°28'N	01°55'E	19	5
Hol 750-752	Nordsee	IV a	Eigersund	58°05'N	04°40'E	50	5
Hol 664 + 665	Nordsee	IV a	Eigersund	-	-	10	0
Hol 670	Nordsee	IV a	Tampen	-	-	10	0
Deutsche See	Nordsee	IV a	-	-	-	31	31
Hol 5-10	Ostgrönland	XIV	-	65°32'N	30°W	14	14
Hol 55	Ostgrönland	XIV	-	63°34'N	39°14'W	15	15
Hol 754-755	Nordost-Arktis	II a	Nordkap	71°35'N	26°70'E	7	7
Hol 676	Nordost-Arktis	II a	Lofoten	68°35'N	12°33'E	10	10
Hol 678	Nordost-Arktis	II a	Fuglöy-banken	70°24'N	18°03'E	10	10
Hol 681	Nordost-Arktis	II a	Fuglöy-banken	71°06'N	20°50'E	10	10 (3)
MATÍS	Island	V	-	63°25'N	23°52'E	50	34
Summe						410	161 (154)

Aus der Nordsee wurden jeweils fünf Fische von sechs verschiedenen Orten innerhalb der Region zufällig ausgewählt. Aus der Region XIV b waren 29 Fische verfügbar, die alle in das Probenset aufgenommen wurden. Aus der Nordost-Arktis wurden 37 Fische für die Analyse der PCR-Produkte von CalmEX 4F/5R ausgewählt, von denen sieben vom Nordkap, 10 von den Lofoten und 20 von den Fuglöybanken stammen. Im Rahmen der Analyse der PCR-Produkte von Act 2F/2R wurden nur 13 Proben von den Fuglöybanken analysiert. Die Island-Seelachsproben (Seegebiet Va) stammen von der Matís Ltd., einem isländischen Forschungsinstitut des öffentlichen Sektors (Matís, o.J.). Von den 50 Proben wurden 34 zufällig ausgewählt. Die für den Praxistest der Methode benötigten Handelsproben wurden von „Deutsche See“¹ eingekauft. Dieser Seelachs stammt aus der Nordsee². Es wurden 31 Handelsproben analysiert.

Alle Proben wurden bei -18°C entweder als Filet oder in Form von Muskelfleischstücken gelagert.

¹ "Deutsche See" GmbH, Maifischstraße 3-9, 27572 Bremerhaven

² Herkunft kann auf: <http://cuxhaven.kutterfisch.de/rueckverfolgung.html> mit Hilfe der Trackingcodes NC120.51E8.5749.300 nachvollzogen werden.

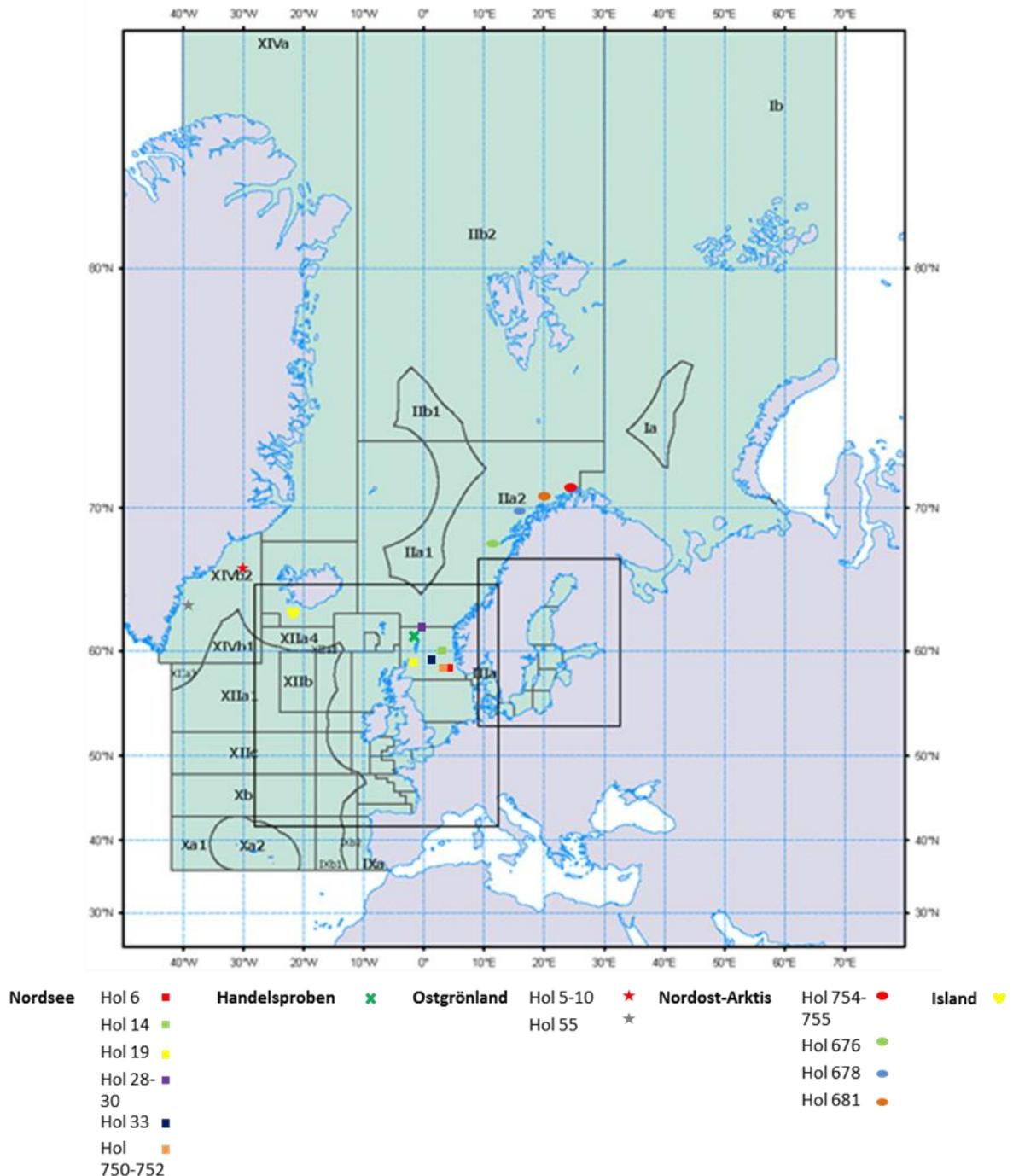


Abbildung 10: Herkunft der untersuchten Proben (eigene Darstellung, Karte: FAO, 2012)

7.1.2 Längenverteilung der untersuchten Seelachse

Laut Homrum *et al.* (2012) (vgl. Kapitel 6.4) finden in einem gewissen Rahmen Migrationsprozesse zwischen den einzelnen Beständen im Nordost-Atlantik statt. Die Migrationsraten sind dabei für jüngere Tiere geringer als für ältere (>60 cm). Da die Seelachse mit einer Größe zwischen 55 und 60 cm bereits geschlechtsreif sind, ist es möglich, dass das

beobachtete genetische Profil der Bestände durch immigrierte Tiere verzerrt wird. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Längenverteilung der untersuchten Stichproben analysiert.

Die Untersuchung der genetischen Differenzierung der Stichproben über alle Marker erfolgte einmal mit einem bereinigten (ohne Tiere >60 cm) und einmal mit dem kompletten Probenset, um die Ergebnisse beider Analysen vergleichen zu können. Die jeweilige Länge aller untersuchten Seelachse ist im Anhang B 5.3 zu finden.

Tabelle 6: Kennwerte der Längenverteilung der Seelachse

Region	Fangort	Kennwerte (Länge in cm)			
		Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung (n-1)
Nordsee					
	Eigersund Bank	36	50	44,06	2,965
	Viking Bank	38	53	42,8	3,11
	Fair Isle Bank	47	78	58,55	11,13
	Tampen	39	80	47,34	9,111
	The Patch	46	69	56,74	6,83
	Eigersund	41	70	49,78	7,138
	Handelsproben	46	64	51,03	4,151
Ostgrönland					
	Ostgrönland 1	57	82	72,57	7,673
	Ostgrönland 2	84	105	95,6	6,356
Nordost- Arktis					
	Lofoten	44	50	46,9	2,079
	Fuglöybanken	45	54	49,75	1,832
	Nordkap	55	89	75	12,793
Island		46	70	58,06	5,93

In der Tabelle 6 sind die Kennwerte der Längenverteilung der Seelachse dargestellt. Die Ergebnisse sind nach Region und genauem Fangort aufgeschlüsselt. Es sind jeweils minimale und maximale Länge der Fische in der Stichprobe, der Stichprobenmittelwert sowie die Standardabweichung aufgeführt.

Abbildung 11 zeigt eine Übersicht über alle Fangorte. Als Fehlerindikator ist die Standardabweichung angegeben, die rote Linie kennzeichnet die 60 cm- Grenze. Betrachtet man die Längen-Kenndaten für die Nordsee-Stichproben, so wird deutlich, dass alle Stichprobenmittelwerte kleiner als 60 cm sind. Die Mittelwerte der Stichproben Fair Isle Bank und The Patch liegen mit 58,55 cm beziehungsweise 56,74 cm knapp unterhalb der Grenze.

Des Weiteren enthalten fünf der sieben Stichproben Fische, die größer sind als 60 cm. Da keine der Stichproben durchschnittlich größer als 60 cm und der relative Anteil kleinerer Fische (vgl. Anhang B 4, Tabelle 37 bis Tabelle 41) höher ist, wurde keine Stichprobe ganz aus der Auswertung herausgenommen. Im Rahmen der Reihenuntersuchung analysierte Fische, die zufällig größer waren als 60 cm, wurden vor der statistischen Analyse des bereinigten Probensets einzeln entfernt.

Die Stichproben Lofoten und Fuglöybanken aus der Nordost-Arktis enthalten keine Fische über 60 cm und können daher vollständig für die statistische Auswertung herangezogen werden.

Die mittlere Größe der isländischen Seelachse liegt mit 58,06 cm knapp unterhalb der definierten Grenze von 60 cm. Mit 64 % sind etwas mehr als die Hälfte aller Fische kleiner als 60 cm. Auch aus dieser Stichprobe wurden vor der Analyse des bereinigten Probensets die Fische entfernt, die größer als 60 cm waren.

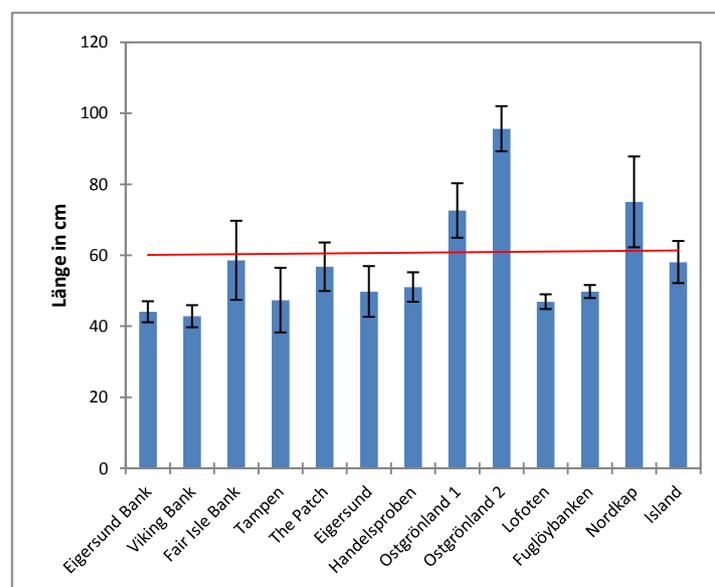


Abbildung 11: Durchschnittliche Länge der Fische (Fehlerindikator: Standardabweichung)

Es wird deutlich, dass die Fische aus Ostgrönland und vom Nordkap durchschnittlich größer als 60 cm sind. Anhand der relativen Längenverteilung der Nordkap-Stichprobe ist erkennbar, dass die relative Häufigkeit von Fischen über 60 cm 86 % beträgt. In der Stichprobe 1 aus Ostgrönland sind 92 %, in Stichprobe 2 100 % größer als 60 cm (Abbildung 12). Diese Stichproben wurden im Rahmen des bereinigten Probensets daher nicht berücksichtigt.

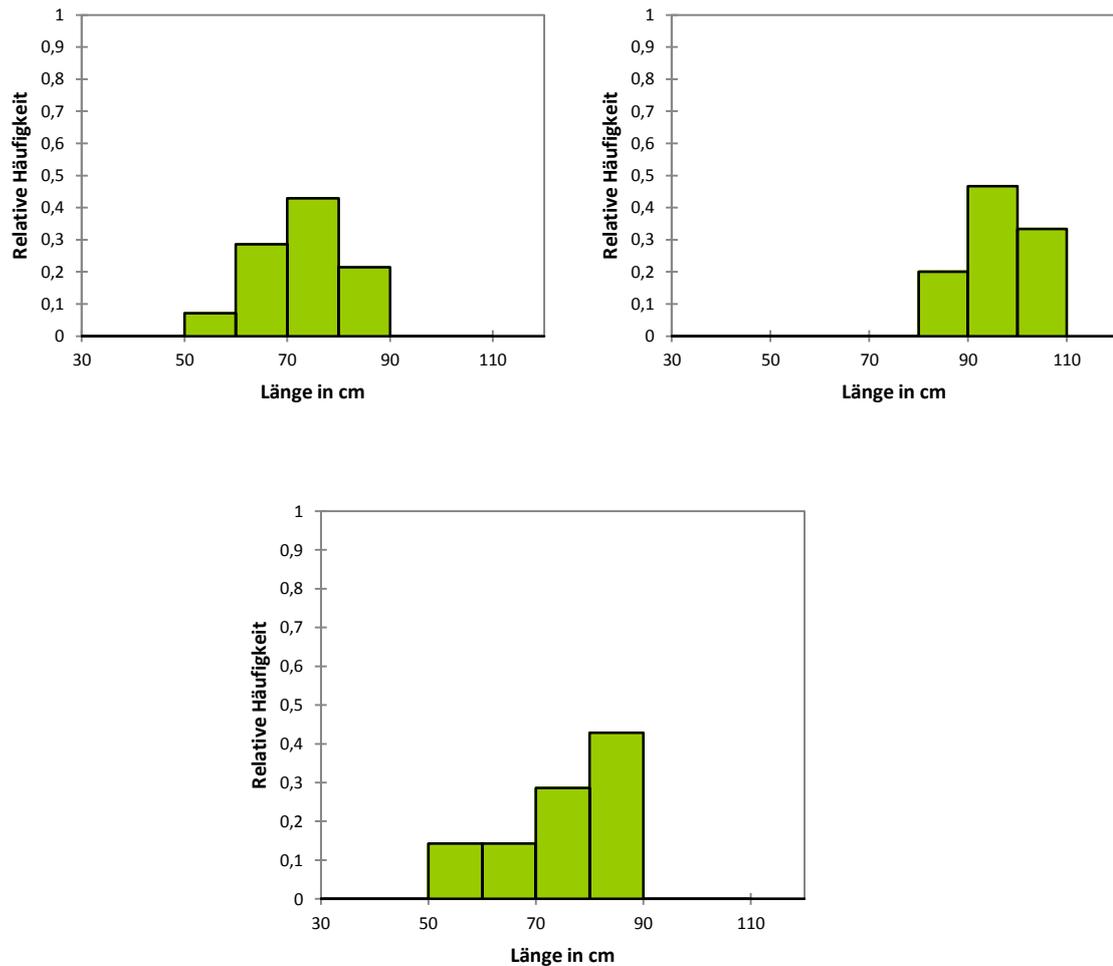


Abbildung 12: Längenverteilung der Fische (von links oben nach rechts unten: Ostgrönland 1,2 und Nordkap)

7.2 DNS-Extraktion

Die DNS-Extraktion aus den Filet-beziehungswise Muskelfleischstücken der Seelachse erfolgte mit Hilfe der CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)-Methode nach Rogers und Bendich (1985). Die Zusammensetzung der benötigten Pufferlösungen ist in Anhang B.3.1 dargestellt. Die Methode wurde teilweise angepasst und im Einzelnen wie folgt durchgeführt:

50 bis 100 mg einer Probe wurden in ein Eppendorf Gefäß eingewogen und mit 0,5 mL Puffer 1 A (gebrauchsfertig) homogenisiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde Puffer 1 A mit 0,1 Vol. % 3-Mercapto-1,2-Propandiol und 0,5 mg/mL Proteinase K versetzt. Die Mischung wurde für mindestens 2 Stunden bei 65 °C und 450 rpm inkubiert und anschließend 10 Minuten zentrifugiert (13.000 rpm, gilt auch für die nachfolgenden Zentrifugier-Schritte).

Der Überstand wurde mit 0,5 mL Chloroform versetzt, 30 Sekunden geschüttelt und danach 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Der Überstand wurde im

Verhältnis 1:2 mit Puffer 2 versetzt, 5-10 Minuten stehen gelassen und 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in 0,4 mL Puffer 3 aufgenommen und mindestens 10 Minuten bei 65 °C und 450 rpm inkubiert. Anschließend wurden 0,4 mL Isopropanol zugegeben, 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde mit 4 °C kaltem Ethanol (70 %ig) gewaschen, zentrifugiert und der Überstand ebenfalls verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das Sediment wurde über Nacht beziehungsweise 30 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 0,1 mL Puffer 4 aufgenommen. Die Lagerung der DNS-Extrakte erfolgte bei -30 °C.

In einigen Fällen wurde eine Reinigung der DNS-Extrakte mit einem Reinigungskit nach der Vorschrift der Herstellerfirma Roche³ durchgeführt.

7.3 Bestimmung des DNS-Gehalts der Extrakte

Der DNS-Gehalt der Proben (vgl. Anhang B 4, Tabelle 36) wurde fluorimetrisch nach der Methode von Downs und Wilfinger (1983) bestimmt.

Die Messung wurde wie folgt durchgeführt:

Die Messlösungen wurden direkt in der Küvette nach dem Schema in Tabelle 7 angesetzt. Die fertigen Ansätze wurden fünf Minuten stehen gelassen und anschließend im Fluorimeter gemessen (Einstellungen: Anregung – 350 nm, Emission – 455 nm, Spaltbreite – 10 nm, Integration - 8, Konzentration - 50).

Tabelle 7: Pipettierschema für die Bestimmung des DNS-Gehalts

	Proben	Standard	Blindwert
Farbstoff-Lösung Hoechst 33258	2 mL	2 mL	2 mL
Puffermischung	95 µL	95 µL	100 µL
DNS-Extrakt	5 µL	-	-
Standard- Lösung	-	5 µL	-

Die Berechnung der DNS-Gehalte in ng/µL erfolgte mit Hilfe von Formel 4.

$$(4) \quad c(DNA) = \frac{[Faktor(Standard-Verdünnung)] \cdot [Faktor(Kalbsthymus)]}{[V(Probe)] \cdot [Fluoreszenz(Standard)]} \cdot Fluoreszenz(Probe)$$

$$= \frac{250 \cdot [Faktor(Kalbsthymus)]}{5 \cdot [Fluoreszenz(Standard)]} \cdot Fluoreszenz(Probe)$$

³ Roche (2012). High Pure PCR Product Purification Kit. https://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter%202/page%2040-46.pdf. Stand: 12.11.2012.

Anhand des berechneten DNS-Gehalts wurden die Proben-Extrakte mit Puffer 4 (vgl. Kapitel 4.1) auf 10 ng/μL verdünnt (vgl. Anhang B 4, Tabelle 36). Die Verdünnungen wurden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

7.4 PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Amplifizierung der DNS-Fragmente ein PCR-Kit der Firma Solis BioDyne verwendet (vgl. Anhang B.3.3). Der Ansatz der PCRs erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers des PCR-Kits⁴ (Tabelle 8). Um Verunreinigungen erkennen zu können, wurde bei jedem PCR-Ansatz ein Blindwert mitgeführt. Bei Problemen mit der Amplifizierbarkeit bestimmter Proben wurde zur Kontrolle außerdem eine Positivkontrolle mitgeführt. Bei PCRs mit dem Primer CalmEX 4F/5R wurde beispielsweise DNS vom Gelbflossen-Thun (Chow, 1998) und bei der Amplifizierung mit Act 2F/2R Hechtdorsch-DNS (Atarhouch *et al.*, 2003) verwendet.

Tabelle 8: PCR-Ansatz laut Herstellerempfehlung

Reagenz	Konzentration/ Ansatz
BD 10x	1x
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM
dNTPs (20 mM)	200 μM
Hot Start Polymerase (5 U/μL)	0,05 U/μL*
Primer (100 pmol), je	0,5 μM
H ₂ O	
Template DNS (10 ng/μL)	2,5 ng/μL

*1 U: Enzymmenge, mit der 1 μmol Substrat pro Minute umgesetzt wird (Langer, 2008, S.179)

Die Amplifizierung der PCR-Produkte wurde im Thermocycler nach dem in Tabelle 9 dargestellten Schema durchgeführt und entspricht ebenfalls den Empfehlungen der Firma Solis BioDyne⁴. Bei der verwendeten Polymerase handelt es sich um eine Hotstart-Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird und in einem initialen Denaturierungsschritt für 15 Minuten aktiviert werden muss. Die Hybridisierungstemperatur ist entsprechend der Literaturwerte für die getesteten EPIC-Primer festgelegt beziehungsweise im Rahmen der Primertests angepasst worden (vgl. Kapitel 8.1).

In einigen Fällen war die Ausbeute an PCR-Produkten nach der Reaktion unzureichend für die weiteren Analysen. In diesen Fällen wurde eine weitere PCR aus dem Ansatz der ersten PCR durchgeführt. Hierfür wurde der PCR-Ansatz 1:10 verdünnt. Der Ansatz der PCR-Reaktion

⁴ Solis BioDyne (o.J.). Hot FIREPol® DNS Polymerase:
https://www.sbd.ee/pics/7061_Data_Sheet_HOT_FIREPol_DNS_Polymerase.pdf. Stand: 05.07.2012

erfolgte nach dem gleichen Schema wie bereits beschrieben. Die Reaktionsbedingungen waren ebenfalls identisch, es wurden jedoch nur 35 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 9: Einstellung des Thermocyclers für die PCRs

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15	1
Denaturierung	95	1	40
Hybridisierung	(angepasster) Literaturwert	1	40
Elongation	72	2	40
Finale Elongation	72	10	1
Pause	10	∞	

7.5 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden Agarosegele für die Überprüfung des Erfolgs der PCR-Reaktionen sowie für eine erste Charakterisierung der in der PCR gebildeten Amplikons genutzt.

Dafür wurden 1,5 g Agarose eingewogen und mit 75 mL TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, vgl. Anhang B.3.4) versetzt. Die Mischung wurde in der Mikrowelle auf höchster Stufe so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das Gel wurde dann mit destilliertem Wasser gravimetrisch auf die Ausgangsmasse ergänzt und noch einmal kurz erhitzt. Anschließend wurde das Gel in eine vorbereitete Gelform gegossen und mit der entsprechenden Anzahl Kämme zur Vorbereitung der Probenaschen versehen (16 oder 32 Probenaschen je Gel). Die Aushärtungszeit betrug mindestens 20 Minuten.

Das ausgehärtete Gel wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Je 5 µL des PCR-Produkts wurden mit 2 µL LD 40-Puffer versetzt und als Größenstandard 4 µL einer 100 bp DNS-Leiter aufgetragen.

Die Auftrennung der Amplikons erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Die Laufzeit der Gele betrug mindestens 45 Minuten.

Die fertigen Agarose-Gele wurden in einem Ethidiumbromid-Bad (0,1 %ige Lösung) 10 Minuten lang gefärbt. Die Gele wurden dann mit Hilfe einer an den Computer angeschlossenen UV-Bank gescannt und ausgewertet.

7.6 Detektion von Polymorphismen

7.6.1 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden extern durch das Universitäre Cancer Center Hamburg (UCCH) am Universitätsklinikum Eppendorf (UKE) durchgeführt⁵. Dafür waren die Proben wie folgt aufzuarbeiten:

Die zu analysierenden PCRs im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnen. Die für einen Sequenzierungsansatz zu pipettierenden Volumina sind in der Tabelle 10 dargestellt. Der Reaktionspuffer sowie die Big Dye-Lösung wurden vom UCCH eingekauft.

Tabelle 10: Sequenzierungsansatz mit Big Dye

Reagenz	Je Ansatz (in μL)
Big Dye	1
Puffer (2 $\frac{1}{2}$ x)	7
Primer (10 pmol/ μL)	0,5
H ₂ O	9,5
PCR-Ansatz (1:10 verd.)	2
Gesamt	20

Die Sequenzierungsreaktion wurde im Thermocycler nach dem Programm in Tabelle 11 durchgeführt.

Tabelle 11: Cycling-Schema für die Sequenzierungsreaktion

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit (sec)	Anzahl der Zyklen
96	10	25
50	20	25
60	240	25
10	∞	-

Anschließend wurden die Ansätze mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt⁶. Die Zentrifugationen wurden bei 2800 rpm durchgeführt. Die Trocknung der Proben erfolgte nach der Aufarbeitung in der beheizten Vakuumzentrifuge. Um das während des Trocknungsprozesses entstehende Kondenswasser aufzunehmen, wurden 8 Reaktionsgefäße mit Calciumchlorid gemeinsam mit den Probenansätzen zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurden die Proben bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

⁵ Core Facilities UCCH. http://www.uke.de/zentren/cancer-center/index_49182.php. Stand: 04.10.2012

⁶ Qiagen (2002). DyeEx Handbook. <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=154>. S. 8f. Stand: 04.10.2012

Es wurden jeweils Hin- und Rückstrang sequenziert (daher zwei Sequenzierungen je Probe). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Computer-Programmen DNAsis Max sowie BioEdit (vgl. Anhang B.2).

7.6.2 Klonierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zunächst mit Exonuklease und Phosphatase (Promega) von überschüssigen Primern und Nucleotiden gereinigt. Dazu wurden zu 10 µL des PCR-Ansatzes 10 U Exonuklease und 1 U Phosphatase pipettiert und anschließend für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 85 °C gestoppt.

Nach der Reinigung wurde der DNS-Gehalt gemessen (vgl. Kapitel 4.2).

Als Vektor wurde der pGEM-T Vektor (Promega) verwendet. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Der Vektor wurde mit Hilfe eines Hitzeschocks in kompetente Zellen (JM109 High Efficiency Competent Cells, Promega) übertragen. Die Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, abweichend wurde jedoch keine Kontrolle mit ungeschnittenem Plasmid mitgeführt⁷. Das für die Transformation benötigte SOC-Medium wurde selbst hergestellt (vgl. Anhang B.3.6).

Die transformierten Zellen wurden auf vorbereitete Nährböden ausplattiert, die wie folgt hergestellt wurden:

5 g Pepton aus Casein, 2,5 g Hefeextrakt, 7,5 g Bacto Agar und 5 g NaCl in 500 mL Wasser lösen und mit Natronlauge auf pH 7 einstellen. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert. Nach Abkühlung auf 50 °C wurden 500 µL sterile Ampicillin-Lösung (100 mg/mL), 1000 µL X-Gal-Lösung (40 mg/mL) und 250 µL IPTG-Lösung (100 mM, steril) zugegeben und das Nährmedium in Platten gegossen. Nach einer Aushärtungszeit von 30-60 Minuten wurden die Platten über Nacht bei 34 °C im Trockenschrank getrocknet.

Für das Ausplattieren der transformierten Zellen wurden 100 µL des Ansatzes auf den Nährboden pipettiert und mit dem abgeflamten Drygalspatel verteilt. Die Proben wurden jeweils auf drei, Positiv- und Negativkontrolle auf zwei Nährböden aufgetragen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

⁷ Promega (2010). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems-Technical Manual. <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf?la=en>. Stand:04.10.2012.

Am nächsten Tag wurden die gebildeten Kolonien mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen von den Nährböden in 50 µL Wasser überführt. Es wurden bevorzugt weiße Kolonien, aber auch hellblaue und blaue selektiert. Mit 1 µL der in Wasser gelösten Kolonien wurde eine PCR durchgeführt (vgl. Kapitel 7.4) und im Agarosegel (vgl. Kapitel 7.5) kontrolliert, ob ein PCR-Produkt gebildet wurde. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der PCR-Produkte (vgl. Kapitel 7.6.1)

7.6.3 RFLP

Der Verdau der PCR-Produkte (vgl. Kapitel 7.4) mit den verschiedenen Restriktions-Endonukleasen erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller (New England Biolabs, Roche). Es wurden je 0,5 U Enzym/1 µL Ansatz eingesetzt. Der Reaktionspuffer wurde vom Hersteller bereitgestellt (Tabelle 12 und Tabelle 13).

Tabelle 12: Ansatz für den Verdau von PCR-Produkten

Reagenz	Konzentration/ Ansatz
Puffer	1 µL
Enzym	5 U
H ₂ O	Abhängig von der Konzentration des Enzyms
PCR	5 µL
Summe	10 µL

Die Inkubationstemperaturen sowie die Erkennungssequenzen sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Thermocycler. Anschließend wurden die Enzyme bei 65 (Inkubationstemperatur von 37 °C) beziehungsweise 80 °C (Inkubationstemperatur von 65 °C) inaktiviert.

Tabelle 13: Verwendete Restriktionsenzyme

Name des Enzyms	Erkennungssequenz (5'→3')	Inkubations-temperatur (°C)	Hersteller
Alu I	...AG/CT...	37	New England Biolabs
Ase I	...AT/TAAT...	37	New England Biolabs
Hae III	...RGC/GC/Y...	37	New England Biolabs
HpyCH4IV	...A/CGT...	37	New England Biolabs
Msp I	...C/CGG...	37	New England Biolabs
Rsa I	...GT/AC...	37	New England Biolabs
Taq α I	...T/CGA...	65	New England Biolabs
Tru 9 I	...T/TAA...	65	Roche

Die geschnittenen PCR-Produkte wurden im Verhältnis von 1:1 mit Wasser verdünnt.

Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte in modifizierter Form nach dem Protokoll von Westermeier (2001, S. 262f.). Die Polyacrylamid-Gele wurden eine Stunde in Tris-Acetatpuffer rehydratisiert und anschließend mit Hilfe von Filterpapier getrocknet. Zwei Elektrodenstreifen wurden für mindestens 10 Minuten in Elektrodenpuffer eingelegt (vgl. Anhang B.3.7).

Die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in 15 beziehungsweise 12,5 %igen Polyacrylamid-Fertiggelen (gelcompany, EDC).

Es wurden jeweils 6 µL des 1:1 verdünnten, geschnittenen PCR-Produktes je Proben tasche appliziert. Des Weiteren wurden 2 µL des ungeschnittenen PCR-Produkts sowie 6 µL eines 100 bp- und eines 25 bp-DNS-Markers aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter den Bedingungen in Tabelle 14.

Tabelle 14: RFLP Elektrophorese

Spannung (V)	Stromstärke (mA)	Leistung (W)	Zeit
100	52	26	15 min
600	52	30	~ 100 min*
Gesamtlaufzeit			~ 2 Stunden

*Laufzeit je nach verwendetem Restriktionsenzym geringfügig anders (vgl. Anhang B 5.1)

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Silbernitrat gefärbt, um die aufgetrennten Restriktionsfragmente sichtbar zu machen. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll der Firma EDC⁸. Die Herstellung der Fixierverdünnung erfolgte abweichend mit 120 mL Ethanol *ad* 500 mL Wasser. Die Entwicklungszeit der Gele wurde individuell gewählt, betrug aber in jedem Fall unter den angegebenen sieben Minuten. Nach der Färbung wurden die Gele über Nacht an der Luft getrocknet. Zum Schutz wurde die Geloberfläche anschließend mit einer transparenten Folie überklebt. Die fertigen Gele wurden eingescannt und am PC mit Hilfe des Programms Quantity One ausgewertet.

7.7 Statistische Methoden

7.7.1 Berechnung der Längenkenndaten

Die Berechnung der Kenndaten für die Länge der analysierten Seelachse erfolgte mit dem Programm XLSTAT 2012. Der Mittelwert wurde nach Formel 5 errechnet.

$$(5) \quad \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_i}{n}$$

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte mit Formel 6.

$$(6) \quad s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

n stellt die Summe der Merkmalsträger und x_i den Wert der einzelnen Elemente dar.

Die Histogramme der relativen Häufigkeiten sowie der Stichprobenmittelwerte wurden ebenfalls mit XLSTAT 2012 erstellt.

7.7.2 ELB Algorithmus

Liegen SNPs in heterozygoter Form vor, so ist in der Regel nicht bekannt, welches Allel auf welchem DNS-Strang liegt. Für populationsgenetische Berechnungen sind jedoch Kenntnisse der Gameten-Phase oft von Vorteil. Da die Bestimmung der wahren Genotypen im Labor teuer und aufwendig ist, werden meist statistische Methoden verwendet, um Rückschlüsse auf die zu Grunde liegenden Haplotypen ziehen zu können (Excoffier, Laval und Balding, 2003, S. 7).

⁸ EDC (2012). Silver Staining. <http://www.electrophoresis-development-consulting.de/html/DNSsilver.html>. Stand: 08.10.2012.

Der ELB Algorithmus ist ein Verfahren um die Gameten-Phase von Genotypen zu rekonstruieren. Er wurde 2003 von Excoffier, Laval und Balding entwickelt. Die Rekonstruktion der Haplotypen erfolgt in mehreren Schritten, während der ein Individuum zufällig ausgewählt und die heterozygoten Loci untersucht werden. Dies erfolgt mit Hilfe von „Fenstern“, die den zu untersuchenden Locus und die benachbarten Loci einschließen. Dies leitet sich aus der Annahme ab, dass benachbarte Loci gekoppelt sind und somit nicht der freien Rekombination unterliegen. Nacheinander wird in mehreren Phasen die Wahrscheinlichkeit verschiedener Haplotypen bestimmt und auf Basis des Hardy-Weinberg Modells entschieden, welche Kombination die „Richtige“ ist (Excoffier, Laval und Balding, 2003, S. 8ff).

Die Berechnung erfolgte mit dem Programm ARLEQUIN 3.5. Die Ergebnisse wurden als Basis für die Berechnung der Diskriminanzanalyse und für den Test auf Kopplungsungleichgewicht verwendet.

7.7.3 Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Die Grundlagen zum Hardy-Weinberg Modell sowie der mathematische Zusammenhang zwischen Allel- und Genotyp-Frequenzen wurden schon in Kapitel 5.1 diskutiert.

Die Berechnungen zum Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurden mit dem Programm ARLEQUIN 3.5 durchgeführt. Das Ergebnis wurde mit Fisher's exaktem Test statistisch abgesichert. Bei diesem Test handelt es sich um einen Permutationstest, der sich besonders für kleine Stichproben eignet (Hartl und Clark, 2007, S. 58f). Ob ein Ergebnis signifikant ist, wird anhand der errechneten p-Werte bestimmt. p-Werte geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese eines statistischen Tests fälschlicherweise abgelehnt wird. In dieser Arbeit wird mit zwei Signifikanzniveaus gearbeitet (Bärlocher, 2008, S. 56ff):

1. **$0,05 \geq p > 0,01$** : Signifikantes Ergebnis (Die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie wahr ist, liegt unter 5 %)
2. **$p \leq 0,01$** : Hoch signifikantes Ergebnis (Die Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie wahr ist, liegt unter 1 %).

7.7.4 Test auf Kopplungsungleichgewicht

Der Test auf Kopplungsungleichgewicht wurde mit dem Programm ARLEQUIN 3.5 auf Basis der mit dem ELB Algorithmus errechneten Haplotypen durchgeführt. Der Test auf Signifikanz der Ergebnisse erfolgte wie in Kapitel 7.7.3 beschrieben.

7.7.5 Analyse der molekularen Varianz (AMOVA)

Bei der sogenannten AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) wird die gesamte molekulare Varianz in Form einer hierarchischen Analyse auf einzelne Varianzkomponenten verteilt (Excoffier und Lischer, 2011, S. 144f). Die Summe der Varianzkomponenten σ^2_T wird nach der Formel 7 errechnet.

$$(7) \quad \sigma^2_T = \sigma^2_C + \sigma^2_B + \sigma^2_A$$

σ^2_C ist dabei Summe der Varianzkomponenten auf Grund von Unterschieden zwischen Haplotypen innerhalb der Population, σ^2_B ist die Summe der Varianzkomponenten auf Grund von Unterschieden zwischen Haplotypen unterschiedlicher Populationen innerhalb einer Gruppe und σ^2_A ist die Summe der Varianzkomponenten auf Grund von Unterschieden zwischen Populationen. Es können weitere Varianzkomponenten, zum Beispiel für die Varianz innerhalb von Subpopulationen, hinzugefügt werden (Weir und Cockerham, 1984, S.1359ff).

Anhand der errechneten Varianzkomponenten werden Fixations-Indices berechnet, die äquivalent zu Wrights F-Statistik (vgl. Kapitel 5.2) sind. Der sogenannte ϕ_{ST} , ein von Weir und Cockerham entwickelter Schätzer von Wrights F_{ST} , wird nach Formel 8 berechnet (Weir und Cockerham 1984, S. 1367; Excoffier, Smouse, und Quattro, 1992, S. 482, Excoffier, 2001, S. 991).

$$(8) \quad \phi_{ST} = \frac{\sigma_A^2 + \sigma_B^2}{\sigma_T^2}$$

σ_A^2 , σ_B^2 und σ_T^2 : siehe Formel 7.

Das Ergebnis der AMOVA wird in Form einer Tabelle ausgegeben, die wie Tabelle 15 aufgebaut ist (verändert nach Excoffier und Lischer, 2011, S. 148).

Tabelle 15: Aufbau einer AMOVA

Variabilität	Freiheitsgrade (n-1)	Quadratsummen (SQ)	Varianzkomponenten
Zwischen Populationen	$P - 1$	SSD (AP)	$\sigma^2_A + \sigma^2_B$
Innerhalb Populationen	$2N - P$	SSD (WP)	σ^2_B
Summe	$2N - 1$	SSD (T)	σ^2_T

P: Anzahl an Populationen

N: Anzahl von Individuen

SSD (AP): Summe der Abweichungsquadrate zwischen Populationen

SSD (WP): Summe der Abweichungsquadrate innerhalb von Populationen

SSD (T): Summe aller Abweichungsquadrate

σ^2_x : siehe oben

Der statistische Zusammenhang zwischen den ermittelten Varianzkomponenten sowie den Fixations-Indices und den verschiedenen hierarchischen Populationslevels wird mit Hilfe von Permutations-Tests abgesichert (Excoffier und Lischer, 2011, S. 145).

Im Rahmen der AMOVA wurde auch der Inzuchtkoeffizient F_{IS} (vgl. Kapitel 5.2) über alle Bestände und für die einzelnen Populationen berechnet.

Die AMOVA wurde mit dem Programm ARLEQUIN 3.5 durchgeführt.

7.7.6 Berechnung der paarweisen genetischen Distanz

Die paarweisen genetischen Distanzen wurden mit dem Programm ARLEQUIN 3.5 berechnet. Es wurden einmal die Werte F_{ST} beziehungsweise ϕ_{ST} nach der Methode von Weir und Cockerham (vgl. Kapitel 7.7.5) und einmal die genetische Distanz nach Nei und Li (1979) berechnet. Letztere ergibt sich aus Formel 9.

$$(9) \quad D = \pi_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} x_{1i} \cdot x_{2j} \cdot \delta_{ij}$$

k und k' sind die Anzahl unterschiedlicher Haplotypen in Population 1 und 2, x_{1i} ist die Frequenz des i-ten Haplotypen in Population 1 und δ_{ij} die Anzahl der Unterschiede zwischen

Haplotyp i und Haplotyp j . Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Populationen erfolgte mit Fisher's exaktem Test.

Äquivalent lässt sich auch die durchschnittliche Anzahl von Unterschieden innerhalb einer Population errechnen. Dies ist in Formel 10 dargestellt.

$$(10) \quad \pi = \frac{n}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i \cdot p_j \cdot \widehat{d}_{ij}$$

\widehat{d}_{ij} ist die Anzahl von aufgetretenen Mutationen, p_i und p_j ist die Häufigkeit von Haplotyp i beziehungsweise Haplotyp j , k stellt die Anzahl von Haplotypen in der Stichprobe und n die Stichprobengröße dar.

7.7.7 Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse ist ein multivariates Verfahren, mit dem Gruppen auf Unterschiedlichkeit hinsichtlich mehrerer Variablen untersucht werden können. Dabei können folgende Fragen beantwortet werden:

- Unterscheiden sich die Gruppen hinsichtlich der untersuchten Variablen signifikant voneinander?
- Welche Variablen eignen sich zur Unterscheidung zwischen den Gruppen?

Die Diskriminanzanalyse ist damit ein sogenanntes strukturprüfendes Verfahren und unterscheidet sich somit in ihrer Problemstellung von gruppierenden Verfahren wie der Clusteranalyse (Backhaus *et al.*, 2005, S. 156ff.).

Um die Gruppen hinsichtlich der gegebenen Variablen zu trennen, wird eine Diskriminanzfunktion geschätzt, deren allgemeine Form in Formel 11 dargestellt ist (Backhaus *et al.*, 2005, S. 161).

$$(11) \quad Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_jX_j$$

Mit

Y = Diskriminanzvariable

X_j = Merkmalsvariable j

b_j = Diskriminanzkoeffizient der Merkmalsvariablen j

b_0 = Konstantes Glied.

Jede Gruppe lässt sich durch ihren mittleren Diskriminanzwert, den sogenannten Centroid, beschreiben. Die Berechnung ergibt sich aus Formel 12.

$$(12) \quad \bar{Y} = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I Y_i$$

Die Unterschiedlichkeit zweier Gruppen, das Diskriminanzkriterium, ergibt sich aus der Differenz ihrer Centroide unter Berücksichtigung der Streuung der Diskriminanzwerte. (Backhaus *et al.*, 2005, S. 164).

Im Rahmen dieser Arbeit müssen jedoch mehr als zwei Gruppen untersucht werden. Im sogenannten Mehr-Gruppen-Fall kann mehr als eine Diskriminanzfunktion definiert werden, anhand derer die Gruppen getrennt werden können. Die Diskriminanzfunktionen lassen sich im Mehr-Gruppen-Fall durch die Maximierung des Diskriminanzkriteriums Γ mit Hilfe von Formel 13 ermitteln.

$$(13) \quad \Gamma = \frac{\text{erklärte Streuung}}{\text{nicht-erklärte Reststreuung}}$$

Dieser Wert wird als Eigenwert der Diskriminanzfunktion bezeichnet. Werden nach der Ermittlung einer ersten Funktion noch weitere ermittelt, so sollen diese einen möglichst großen Anteil der Streuung erklären, der durch die erste Funktion nicht erklärt wird.

Eine Möglichkeit, die durch die Diskriminanzfunktion bewirkte Klassifizierung zu prüfen, ist der Vergleich mit der tatsächlichen Gruppenzugehörigkeit der Untersuchungselemente. Das Ergebnis kann in Form einer Klassifikationsmatrix dargestellt werden, in der die Häufigkeiten für richtig oder falsch klassifizierte Objekte zusammengefasst werden können (Backhaus *et al.*, 2005, S. 177f). Die Durchführung der Diskriminanzanalyse erfolgte mit dem Programm XLSTAT 2012.

7.7.8 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse umfasst verschiedene Verfahren, mit deren Hilfe sich Untersuchungsobjekte anhand ihrer Eigenschaften gruppieren lassen. Das Ziel einer Clusteranalyse ist es also, aus einer heterogenen Stichprobe von Objekten homogene Teilmengen zu definieren.

Die Clusteranalyse läuft in der Regel in drei Schritten ab (Backhaus *et al.*, 2005, S. 492):

1. Bestimmung der Ähnlichkeiten zwischen zwei Objekten anhand eines Proximitätsmaßes
2. Auswahl des Fusionierungsalgorithmus: Zusammenfassung der Objekte in Gruppen mit weitgehend gleichen Eigenschaften
3. Bestimmung der Clusterzahl: Suche nach der geeignetsten Menge von Gruppen.

Die Wahl des Proximitätsmaßes hängt dabei vom Skalenniveau ab (nominal oder metrisch), wobei zwischen Distanz- und Ähnlichkeitsmaßen unterschieden wird (Backhaus *et al.*, 2005, S. 494).

Auf der Basis der Proximitätsmaße lässt sich eine Distanz- beziehungsweise Ähnlichkeitsmatrix berechnen, die den Ausgangspunkt der Clusteralgorithmen bildet. Es existiert eine Vielzahl von Verfahren für die Bildung der Cluster, die gängigsten sind die sogenannten partitionierenden und die hierarchischen Verfahren (Backhaus *et al.*, 2005, S. 510f.)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem hierarchischen Cluster-Verfahren gearbeitet. Die Distanzmatrix wurde auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (vgl. Kapitel 7.7.6) erstellt. Auf diese Weise ist es möglich, die untersuchten Regionen hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit in einem Dendrogramm darzustellen. Die Clusteranalyse wurde mit dem Programm XLSTAT 2012 durchgeführt. Als Clusterverfahren wurde das Complete-Linkage Verfahren gewählt.

8 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dargestellt.

Zunächst wird der Test sowie die Auswahl der für die Reihenuntersuchung genutzten Primer erläutert. Anschließend erfolgt eine separate Darstellung der Ergebnisse für beide in der Reihenuntersuchung genutzten EPIC-Primer.

8.1 Primertests

Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Primer erfolgte auf Basis einer Literaturrecherche (vgl. Kapitel 5.3). Zwei Primer (IFF 232/233 und GapdH F/R) waren bereits im Labor des Max-Rubner Instituts vorhanden und wurden deshalb ausgewählt. Insgesamt wurden neun Primerpaare (Tabelle 17) an zunächst drei Fischen aus der Nordsee getestet. Die Auswahl der Hybridisierungstemperatur (HT) erfolgte in Anlehnung an die Literaturwerte. In allen Fällen wurden auch höhere und niedrigere Temperaturen getestet, um die optimalen Bedingungen für jeden Primer zu ermitteln. Der Erfolg der PCR wurde im Agarosegel (vgl. Kapitel 7.5) kontrolliert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt. In vier Fällen wurde unter keiner der getesteten Bedingungen ein PCR-Produkt gebildet. Diese Primer wurden nicht weiter bearbeitet. Mit dem Primerpaar GapdH F/R waren bei einer niedrigen Hybridisierungstemperatur von 48 °C zwei schwache Banden im Gel erkennbar. Der Primer wurde dennoch nicht weiter bearbeitet, da die gebildeten Produkte bei 48 °C auch unspezifisch sein können (Palumbi *et al.*, 2002, S. 11). Des Weiteren ist für die Analyse größerer Probenzahlen eine stabile Methode notwendig.

Mit den Primerpaaren IFF 232/233, CALMex 4F/5R, S7RPEX 1F/2R und Act 2F/2R wurden weitere PCRs mit je zehn Fischen aus der Nordsee, Ostgrönland und Island mit der geeignetsten Hybridisierungstemperatur durchgeführt und die PCR-Produkte im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Anhang B 4, Abbildung 24 bis Abbildung 26). Mit den ersten drei genannten Primern war jeweils nur eine Bande im Gel erkennbar. Die PCR-Produkte wurden von jeweils vier Fischen aus jedem der drei Bestände direkt sequenziert und hinsichtlich ihrer Variabilität untersucht. Die amplifizierten Sequenzen waren 358 bp (Parvalbumin), 587 bp (Calmodulin) und 650 bp (Ribosomales S7 Protein) lang (Tabelle 16).

Tabelle 16: Ergebnisse der Primertests

	Primer	Optimierte Hybridisierungstemperatur (°C)	Anzahl sichtbarer Banden im Gel*	Länge der Sequenzen	Sequenzierung ⁹	Variabilität
1	AldoB1 1F/2R	-	0	-	-	-
2	GnRH 1F/2R	-	0	-	-	-
3	IFF 232/233	58	1	358 bp	<i>BankIt</i> 1578925	-
	IFF 233					
4	GapdH 2F/2R	48	2(?)	-	-	?
5	CALMex 4F/5R	58	1	587 bp	<i>BankIt</i> 1579527	+
6	S7RPEX 1F/2R	58	1	650 bp	<i>BankIt</i> 1578901	-
7	S7RPEX 2F/3R	-	0	-	-	-
8	Act 2F/2R	58	6	897 bp 860 bp 770 bp 653 bp 589 bp 211 bp	<i>BankIt</i> 1577305	+
9	ChymB 6F/6R	-	0	-	-	-

+ = ja, - = nein/ * Agarose- beziehungsweise Polyacrylamidgel

Polymorphismen konnten nur in der Intron-Sequenz des Calmodulin-Gens beobachtet werden. Diese Sequenz wurde im Rahmen der Reihenuntersuchung anhand von 161 Fischen aus Island, Ostgrönland, der Nordsee und der Nordost-Arktis sowie einer Handelsprobe (vgl. Kapitel 8.3) untersucht.

Mit dem Primer Act 2F/2R konnten insgesamt bis zu sechs Banden mit einer Länge von 897 bp, 860 bp, 770 bp, 653 bp, 589 bp und 211 bp im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden (Abbildung 13 und Tabelle 16), wobei die drei größten Banden nicht in allen untersuchten Proben vorhanden waren. Um die Größe und die DNS-Sequenzen der Banden zu bestimmen,

⁹ Die ermittelten Sequenzen wurden *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), einer Datenbank für Gensequenzen der amerikanischen *National Institutes of Health*, zur Veröffentlichung übermittelt. Das Veröffentlichungsverfahren läuft noch, so dass an dieser Stelle noch nicht die endgültigen *GenBank accession numbers*, sondern die vorläufigen *BankIt numbers* angegeben sind (Stand: 28.11.2012).

wurden die PCR-Produkte von jeweils einem Fisch aus jeder Region kloniert und anschließend sequenziert (vgl. Kapitel 7.6.2). Die beiden längsten PCR-Produkte konnten nicht kloniert werden. Die Schätzung ihrer Länge erfolgte rechnerisch mit Hilfe des Programms Quantity one (vgl. Anhang B 4, Tabelle 42).

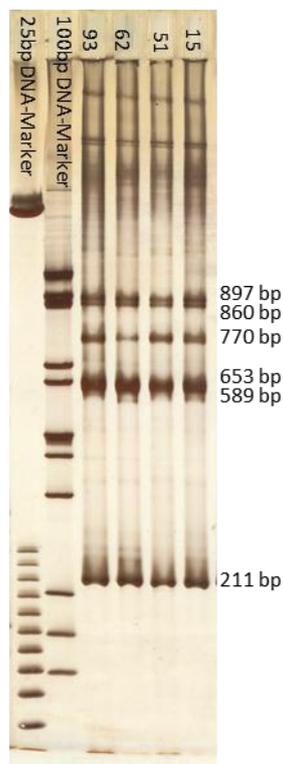


Abbildung 13: PCR-Produkt Act 2F/2R im 15% Clean Gel (Silberfärbung) mit Größe der Banden (93: Isländischer Seelachs, 62: Nordostarktischer Seelachs, 51: Ostgrönländischer Seelachs, 15: Nordsee-Seelachs)

Da eine Sequenzierung bei mehreren PCR-Produkten aufwendig und teuer ist, wurde die Variabilität der mit dem Primer Act 2F/2R erzeugten PCR-Produkte mit Hilfe der RFLP untersucht (vgl. Kapitel 9.1). Es wurden insgesamt acht Restriktionsenzyme an jeweils drei Proben aus der Nordsee getestet (vgl. Anhang B 5.1). Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Kapitel 7.6.3 beschrieben. Aus den acht Enzymen wurden vier (Hae III, Taq α I, HpyCH4IV und Rsa I) ausgewählt, mit denen im Rahmen der Reihenuntersuchung gearbeitet wurde. Die Auswahl erfolgte auf Grund der polymorphen aber nicht unübersichtlichen Schnittmuster dieser Enzyme (vgl. Anhang B 5.1).

Tabelle 17: Getestete Primersysteme (A=Adenin, T= Thymin, G=Guanin, C= Cytosin, Y= C oder T)

Gen	Intron	Primer-name	Sequenz (5'→ 3')	HT (°C, Literaturwerte)	Quelle
1 Aldolase B	1	AldoB1 1F AldoB1 2 R	GCT CCA GGA AAG GGA ATC CTG GC CTC GTG GAA GAA GAT GAT CCC GCC	49, 52 und 54	Hassan <i>et al.</i> (2002)
2 Gonadotropin-freisetzendes Hormon 3	1	GnRH 1F GnRH 1R	AAT GCA CCA CAT GCT AAC AAG GC CGC ACC ATC ACT CTG CTG TTC GC	48 und 54	Hassan <i>et al.</i> (2002)
3 Parvalbumin		IFF 232 IFF 233	GAC AAG AGC GGC TTC ATT GAG G TCA ACT CCA ATC CCA ATC TTG CCA TCA CCA T	60	Rehbein und Kress (2005)
4 Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase		GapdH F GapdH R	GCY CCC ATG TTC GTC ATG CTC AGG GAT GAC CTT GCC	-	-
5 Calmodulin	4	CALMex 4F CALMex 5R	CTG ACC ATG ATG GCC AGA AA GTT AGC TTC TCC CCC AGG TT	60	Chow (1998)
6 Ribosomales S7 Protein	1	S7RPex 1F S7RPex 2R	TGG CCT CTT CCT TGG CCG TC AAC TCG TCT GGC TTT TCG CC	60	Chow und Hazama (1998)
7 Ribosomales S7 Protein	2	S7RPEX 2F S7RPEX 3R	AGC GCC AAA ATA GTG AAG CC GCC TTC AGG TCA GAG TTC AT	60	Chow und Hazama (1998)
8 Aktin	2	Act 2F Act 2R	ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AA GCA TAA CCC TCG TAG ATG GGC AC	58	Atarhouch <i>et al.</i> (2003)
9 Chymotrypsin B	6	ChymB 6F ChymB 6R	ATC GTG TCC GAG GCT GAC TGC AA GCA TGA GGG CTG TGA CTC GGG	54	Atarhouch <i>et al.</i> (2003)

8.2 EPIC-Primer Act 2F/2R

Wie bereits im Kapitel 8.1 erwähnt, konnten die mit Act 2F/ 2R gewonnenen PCR-Produkte bei 897, 860, 770 bp nicht in allen Proben beobachtet werden. Die Doppelbande bei 897 und 860 bp verteilt sich mit unterschiedlichen Häufigkeiten auf die einzelnen Stichproben, weshalb sie als möglicher Marker zusätzlich zu den RFLP- Schnittmustern ausgewertet wurde (Tabelle 18). Insgesamt haben 23 % der 158 ausgewerteten Proben die Doppelbande bei 897 und 860 bp. Der Anteil von Merkmalsträgern ist dabei in allen Gruppen ähnlich. Nur in der Nordost-Arktis ist er mit 14 % geringer als in den anderen Stichproben.

Die RFLP wurde auf Basis der PCR-Produkte des Primers Act 2F/2R mit den vier in Kapitel 8.1 genannten Restriktionsenzymen durchgeführt. Eine Auswertung erfolgte letztlich nur für die RFLPs mit den Enzymen Taq α I und HpyCH4IV, da die RFLPs mit Rsa I und Hae III im Vergleich weniger variabel waren (vgl. Anhang B 5.1). Daher werden im Folgenden auch ausschließlich diese beiden Enzyme diskutiert.

Tabelle 18: Anteil von Proben mit Doppelbande

	Analysierte Proben	Doppelbande vorhanden (in %)
Nordsee	30	27
Ostgrönland	29	28
Nordost-Arktis	35	14
Island	33	24
Handelsproben	31	23
Summe	158	23

Insgesamt konnten 142 (HpyCH4IV) beziehungsweise 146 (Taq α I) von 154 untersuchten Proben ausgewertet werden. Dies entspricht einem Anteil von 92 beziehungsweise 95 %. Der Hauptgrund dafür, dass Proben nicht ausgewertet werden konnten, waren zu schwache Banden im Gel. Bei diesen Proben konnte nicht zweifelsfrei beurteilt werden, ob die auszuwertende Bande vorhanden war oder nicht. Daher wurden diese Proben nicht berücksichtigt.

Das Verhältnis zwischen analysierten und auswertbaren Proben ist in Tabelle 19 dargestellt. In beiden Fällen konnten aus der Nordost-Arktis die wenigsten Proben ausgewertet werden (77 % mit HpyCH4IV und 83 % mit Taq α I).

Tabelle 19: Verhältnis zwischen analysierten und auswertbaren Proben

	Analysierte Proben	Auswertbare Proben HpyCH4IV	Anteil in %	Auswertbare Proben Taq α I	Anteil in %
Nordsee	30	30	100	30	100
Ostgrönland	29	28	97	28	97
Nordost-Arktis	30	23	77	25	83
Island	34	33	97	33	97
Handelsproben	31	28	90	30	97
Gesamt	154	142	92	146	95

In Abbildung 14 und Abbildung 15 sind beispielhaft zwei RFLPs mit den Enzymen HpyCH4IV und Taq α I dargestellt. Die roten Pfeile markieren jeweils die polymorphen Banden, die ausgewertet wurden.

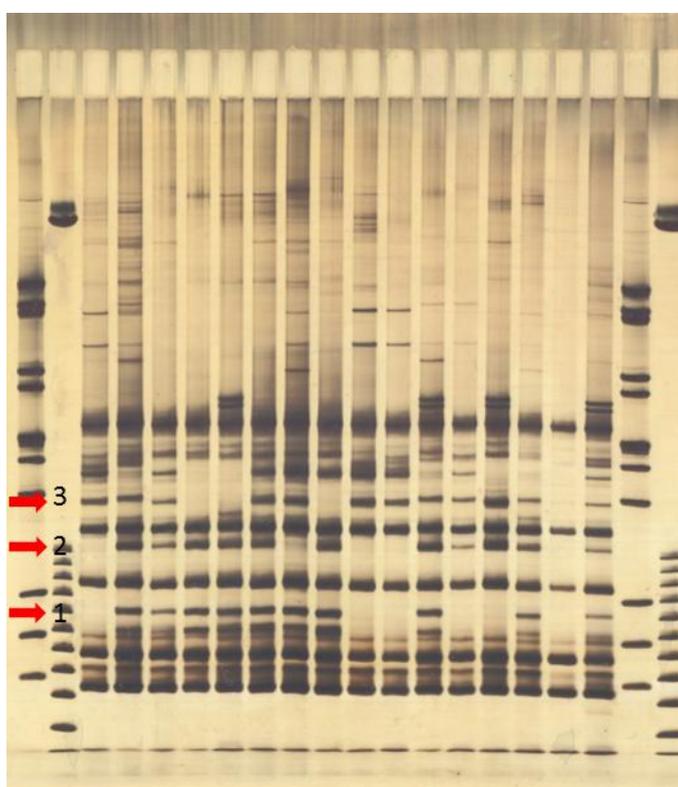


Abbildung 14: RFLP HpyCH4IV (Rote Pfeile kennzeichnen die ausgewerteten, polymorphen Banden: 1. 175 bp, 2. 295 bp 3. 373 bp)

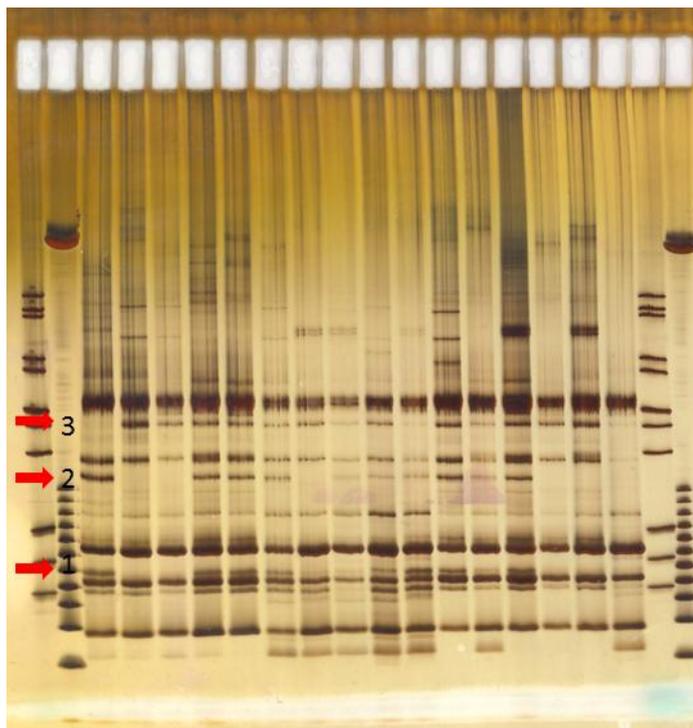


Abbildung 15: RFLP Taq α I (Rote Pfeile kennzeichnen die ausgewerteten, polymorphen Banden: 1. 113 bp, 2. 322 bp, 3. 433 bp)

Die Länge der ausgewerteten RFLP-Fragmente konnte teilweise aus den bekannten Sequenzen (vgl. Kapitel 8.1) der PCR-Produkte hergeleitet werden (Tabelle 20). So konnte das durch das Enzym HpyCH4IV erzeugte 373 bp lange Fragment als ein Teil des 770 bp Amplikons identifiziert werden. Für die Banden bei 300 und 175 bp konnte die Herkunft nicht geklärt werden, weshalb ihre Länge mit Hilfe des Programms Quantity one geschätzt wurde (vgl. Anhang B 4, Tabelle 43 und Tabelle 44).

Die ausgewerteten Banden aus der RFLP mit Taq α I konnten alle aus den sequenzierten PCR-Produkten abgeleitet werden. So stammt das 113 bp lange Restriktionsfragment aus dem 589 bp-Amplikon. Die Banden bei 322 und 433 bp konnten beide als Teile des 770 bp-Amplikons identifiziert werden.

Tabelle 20: Ableitung der Herkunft der RFLP-Banden aus den Sequenzen der PCR-Produkte

Restriktionsenzym	Bande in der RFLP (bp)	Herkunft der Bande (bp)
HpyCH4IV	1. 175*	?
	2. 295*	?
	3. 373	770
Taq α I	1. 113	589
	2. 322	770
	3. 433	770

*Rechnerische Ermittlung mit Hilfe von Quantity one (vgl. Anhang B 4, Tabelle 43 und Tabelle 44)

Die Banden wurden ausgezählt und die Ergebnisse in Form von binären Codes erfasst. Das Vorhandensein einer Bande wurde mit „1“ und die Abwesenheit einer Bande mit „0“ gewertet. Die Reihenfolge der binären Codes entspricht der in Tabelle 20. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 und in Tabelle 22 dargestellt. In der RFLP mit HpyCH4IV konnten insgesamt sechs verschiedene Phänotypen beobachtet werden. Der Phänotyp „111“ ist in der Nordsee, der Nordost-Arktis und Island am häufigsten, in den Handelsproben und Ostgrönland tritt „011“ häufiger auf. Die Phänotypen „101“, „110“ sowie „100“ sind eher selten, wobei letzterer ausschließlich in Ostgrönland beobachtet werden konnte.

Tabelle 21: Relative Verteilung RFLP- Phänotypen (HpyCH4IV)

Phänotypen	Anteil in %					
	001	011	101	111	110	100
Nordsee	10	27	3	53	7	0
Ostgrönland	21	32	14	21	7	4
Nordost-Arktis	9	9	0	83	0	0
Island	21	27	3	45	3	0
Handelsproben	0	61	7	29	4	0

Die RFLP mit Taq α I liefert insgesamt sieben Phänotypen. In der Nordost-Arktis und den Handelsproben tritt der Phänotyp „011“ am häufigsten auf. Für die anderen Regionen verteilen sich die Häufigkeiten auf die Phänotypen „001“, „110“ und „111“. Selten sind in allen Stichproben die Phänotypen „101“, „010“ und „100“.

Tabelle 22: Relative Verteilung RFLP- Phänotypen (Taq α I)

Phänotypen	Anteil in %						
	001	011	101	110	111	010	100
Nordsee	37	7	7	10	40	0	0
Ostgrönland	21	7	7	32	21	7	4
Nordost-Arktis	12	64	4	0	16	4	0
Island	36	6	3	18	36	0	0
Handelsproben	37	57	3	0	3	0	0

8.3 EPIC-Primer CalmEX 4F/5R

In der Reihenuntersuchung wurden die PCR-Produkte des EPIC-Primers CALMex 4F/5R von den 161 Fischen aus den vier Regionen sequenziert (vgl. Kapitel 8.1). In einigen Fällen war die Amplifizierung mit Hilfe der Primer unzureichend für die Durchführung der Sequenzierungsreaktion beziehungsweise die Analyse der Sequenzen technisch nicht möglich, weshalb insgesamt nur 138 Proben ausgewertet werden konnten. Dies entspricht einem Anteil

von 86 %. Das Verhältnis zwischen analysierten und auswertbaren Proben ist in Tabelle 23 dargestellt. Es ist erkennbar, dass von den isländischen Fischen sowie den Handelsproben mit 94 beziehungsweise 91 % die meisten Proben ausgewertet werden konnten. Aus der Nordost-Arktis sowie Ostgrönland konnten mit 78 sowie 79 % weniger Proben ausgewertet werden. Die Proben der in der Nordsee gefangenen Fische liegen mit 88 % auswertbaren Proben zwischen diesen beiden Gruppen.

Ergänzend fällt bei den analysierten Proben aus der Nordsee auf, dass sich die Proben von den Fangorten Tampen (62°04 N, 00°00 E) und Viking Bank (60°42 N, 02°47 E) schlechter amplifizieren lassen als andere Proben aus der Nordsee. Insgesamt wurden während der Vorversuche und in der Reihenuntersuchung dreizehn Proben vom Fangort Tampen und acht vom Fangort Viking Bank untersucht. Eine zufriedenstellende Amplifizierung konnte für Tampen nur bei zwei Proben und für Viking Bank bei drei Proben erzielt werden. Mit Hilfe einer weiteren PCR aus dem Ansatz der ersten konnten in der Reihenuntersuchung letztlich die Sequenzen aller Proben vom Fangort Viking Bank und drei vom Fangort Tampen ausgewertet werden.

Tabelle 23: Verhältnis zwischen analysierten und auswertbaren Proben (Calmodulin-Marker)

	Analysierte Proben	Auswertbare Proben	Anteil (in %)
Nordsee	32	28	88
Handelsproben	31	29	94
Ostgrönland	29	23	79
Nordost-Arktis	36	28	78
Island	33	30	91
Gesamt	161	138	86

In der Abbildung 16 sind die PCR-Produkte mit CalmEX 4F/5R von Proben aus Island (links) und der Nordost-Arktis (rechts) im Vergleich dargestellt. Es wird deutlich, dass mit den isländischen Proben mehr Amplifikate gebildet werden konnten als mit den nordost-arktischen Proben.

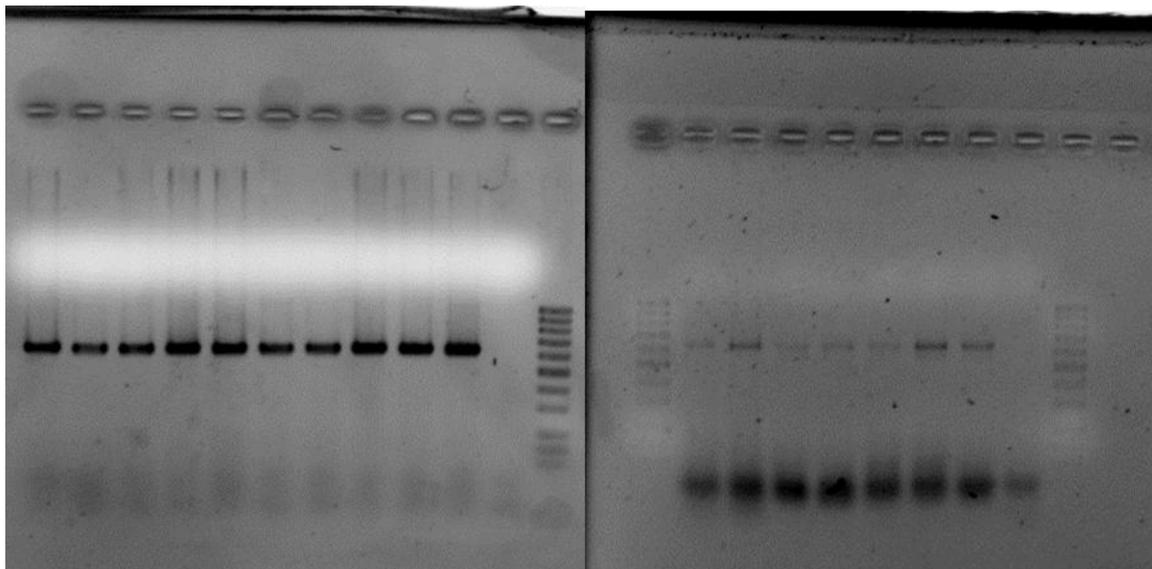


Abbildung 16: Vergleich der PCR-Ausbeute mit CalmEX 4F/5R zwischen Proben aus Island (links) und der Nordost-Arktis (rechts) (Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung)

Durch einen multiplen Abgleich der auswertbaren Sequenzen (vgl. Anhang B 5.2) konnten an drei Positionen SNPs detektiert werden (Abbildung 17). Alle drei SNPs sind biallelisch, wobei in einem Fall Guanin mit Thymin und an den beiden weiteren Positionen Guanin mit Adenin ausgetauscht wird. Im ersten Fall liegt also eine Transversion und in den anderen beiden eine Transition vor (vgl. Kapitel 3.4). An allen Positionen treten auch heterozygote Formen auf, die mit einem „R“ beziehungsweise einem „K“ gekennzeichnet sind.

```

1  AATGAAGGACACAGACAGTGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTCCGGGTATTCGACAAGGTAATTACA
68  TGGAGGCTGGCCCCAACAGGTCAGTCCGCGCATGGAAAACCCCTGGGGACCACGRCTGGCTAAC
                                     G
                                     T
137 CTGTACTIONAGCATTCTTTTGTTCATCAATTATGGGTCTAGATCTCA GAAAAGGTAAAGATGAAAGATTG
207 TAAAACGAATGCCAGCAGCCGCTAATGGTGCTCATGAAAAGTAATAATGAATAATTATTGCGCTGGTTAT
277 CGCTAGACCTTTGAATTTGTCGTGTGGGGGTTAACGTAAACTGATATAGTTATCGTGCGGTGGTTAACGT
348 TAAACCGTGATATTTATCGTGGTCCTCAACGGTAAACTGTGATATTTGATGCGTGGCTTTAACATTA
418 CCGTGATATTTATCGTGGTCCTCAACGGTAAACTGTGATATTGGATGCKTGGCCTCTAACATTAACCGTG
                                     G
                                     A
488 ATGTTTATCGCCGKTGGCCATTTGGACCTCTAACGTCTGTCGTGTTGCCAGGACGGGAACGGCTACAT
                                     G
                                     A
557 CAGCGCTGCAGAGCTCCGCCACGTCATGACC

```

Abbildung 17: SNPs innerhalb der Calmodulingen-Sequenz (A=Adenin, T= Thymin, G=Guanin, C= Cytosin, R= G oder T, K= G oder A)

Insgesamt konnten neun verschiedene Genotypen ermittelt werden. In Tabelle 24 sind die Genotypen sowie ihr prozentualer Anteil innerhalb der fünf Stichproben dargestellt. Es wird deutlich, dass der vollständig heterozygote Genotyp „RKK“ und der vollständig homozygote Genotyp „GGG“ über alle Gruppen hinweg am häufigsten auftreten (Tabelle 24, hervorgehoben). Die Genotypen „RGA“, „RGG“ und „TGA“ traten ausschließlich in der Nordost-Arktis auf. Der Genotyp „TKA“ konnte in der Nordost-Arktis und „RGK“ in den Handelsproben nicht beobachtet werden.

Tabelle 24: Relative Verteilung der Genotypen innerhalb der Regionen

Genotypen	Anteil in %								
	RGK	GGG	RKA	RKK	TKA	TAA	RGA	RGG	TGA
Nordsee	4	25	4	43	7	18	0	0	0
Ostgrönland	13	39	9	22	13	4	0	0	0
Nordost-Arktis	4	29	4	36	0	11	11	4	4
Island	3	33	10	37	10	7	0	0	0
Handelsproben	0	34	3	41	7	14	0	0	0

Mit Hilfe des ELB-Algorithmus (vgl. Kapitel 7.7.2) wurden aus den vorliegenden genotypischen Daten die zu Grunde liegenden Haplotypen berechnet. Damit lassen sich die neun Genotypen auf fünf Haplotypen reduzieren, wovon „GGG“ und „TAA“ in allen Gruppen am häufigsten auftreten (Tabelle 24, hervorgehoben). Der Haplotyp „TGG“ tritt nur in der Nordost-Arktis auf.

Auf Basis der Haplotyp-Daten wurde ein paarweiser Test auf Kopplungsungleichgewicht durchgeführt. Der Test ergab eine signifikante Abweichung vom Kopplungsgleichgewicht ($p=0,01$). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da alle drei Loci innerhalb der Calmodulin-Sequenz dicht zusammen auf einem Chromosom liegen (vgl. Kapitel 5.3).

Tabelle 25: Mit dem ELB-Algorithmus errechnete Haplotypen

Anteile in %	TGA	GGG	TAA	GGA	TGG
Nordsee	5	48	45	2	0
Ostgrönland	13	57	26	4	0
Nordost-Arktis	11	50	30	7	2
Island	7	53	35	5	0
Handelsproben	3	55	40	2	0

9 Auswertung

Im Folgenden soll die genetische Differenzierung der laut ICES klassifizierten Bestände (vgl. Kapitel 6.2) anhand der gefundenen genetischen Marker überprüft werden. Dafür wird angenommen, dass die in den jeweiligen ICES-Gebieten gefangenen Fische auch den jeweiligen Bestand repräsentieren. Dies wird auch für die Fische aus Ostgrönland angenommen, obwohl es in dieser Region keinen klassifizierten Bestand gibt. Es werden also alle Stichproben aus den vier Regionen und die Handelsproben als einzelne Bestände betrachtet.

Zunächst werden die beiden RFLP- sowie der Calmodulin Marker einzeln diskutiert. Anschließend wird mit Hilfe der Diskriminanzanalyse geprüft, ob sich die Bestände anhand aller verfügbaren Marker gemeinsam trennen lassen. Dies wurde einmal für das gesamte Probenset und einmal für alle Proben < 60 cm durchgeführt, um den Einfluss von in andere Bestände migrierten Fischen (vgl. Kapitel 6.4 und 7.1.2) zu minimieren.

9.1 Genetische Differenzierung anhand der Aktin-Marker

Im Folgenden ist die Untersuchung der genetischen Differenzierung auf Basis der RFLP-Marker dargestellt. Die genetischen Distanzen für die RFLP mit HpyCH4IV sind in Tabelle 26 zu sehen.

Oberhalb der Diagonalen ist Nei's D , in der Diagonalen π und unterhalb der Diagonalen ϕ_{ST} dargestellt. ϕ_{ST} kann theoretisch Werte zwischen 0 und 1 annehmen und wie folgt interpretiert werden:

- 0 - 0,05: geringe genetische Differenzierung
- 0,05 - 0,15: mittlere genetische Differenzierung
- 0,15 - 0,25: hohe genetische Differenzierung
- < 0,25: sehr hohe genetische Differenzierung (Hartl und Clark, 2007, S. 283).

Der Kennwert π gibt die durchschnittliche Anzahl von Nukleotid-Unterschieden über alle Loci zwischen allen Haplotyp-Paaren innerhalb der Bestände und der Kennwert D die Unterschiede zwischen den Beständen an. Anhand dieser Kennwerte ist keine Klassifizierung wie mit ϕ_{ST} möglich. D und π müssen für jeden Marker individuell interpretiert werden und es ist kein direkter Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien möglich. Diese Einschränkungen leiten sich aus den für jeden Marker spezifischen Referenzwerten für diese Kennwerte ab (Berrebi *et al.*, 2005, S. 164).

Anhand des ϕ_{ST} kann eine hohe genetische Differenzierung der Handelsproben sowie der ostgrönländischen Fische von den Proben aus der Nordost-Arktis festgestellt werden. Beide Ergebnisse sind hoch signifikant ($p = 0,01$).

Tabelle 26: Genetische Distanzen (HpyCH4IV) (Oberhalb der Diagonalen: Nei's D, Diagonale: π , Unterhalb der Diagonalen: Paarweise ϕ_{ST} , * = signifikant ($p = 0,05$), ** = hoch signifikant ($p = 0,01$))

	Handelsproben	Nordsee	Nordost-Arktis	Ostgrönland	Island
Handelsproben	0,704	0,812	0,752 **	1,036 *	0,846
Nordsee	0,044	0,849	0,677	1,090 *	0,900
Nordost-Arktis	0,217 **	0,025	0,466	1,042 *	0,808
Ostgrönland	0,077	0,057	0,187 **	1,209	1,077
Island	0,019	-0,002	0,111	-0,004	0,955

Die errechneten genetischen Distanzen nach Nei bestätigen dieses Ergebnis. Des Weiteren ist anhand dieses Kennwertes ein signifikanter Unterschied ($p=0,05$) zwischen den Nordsee-Proben sowie den Handelsproben und den vor Ostgrönland gefangenen Fischen festzustellen. Die Diversität innerhalb der Stichproben, gemessen durch den Kennwert π , ist am größten für den ostgrönländischen und am geringsten für den nordost-arktischen Bestand.

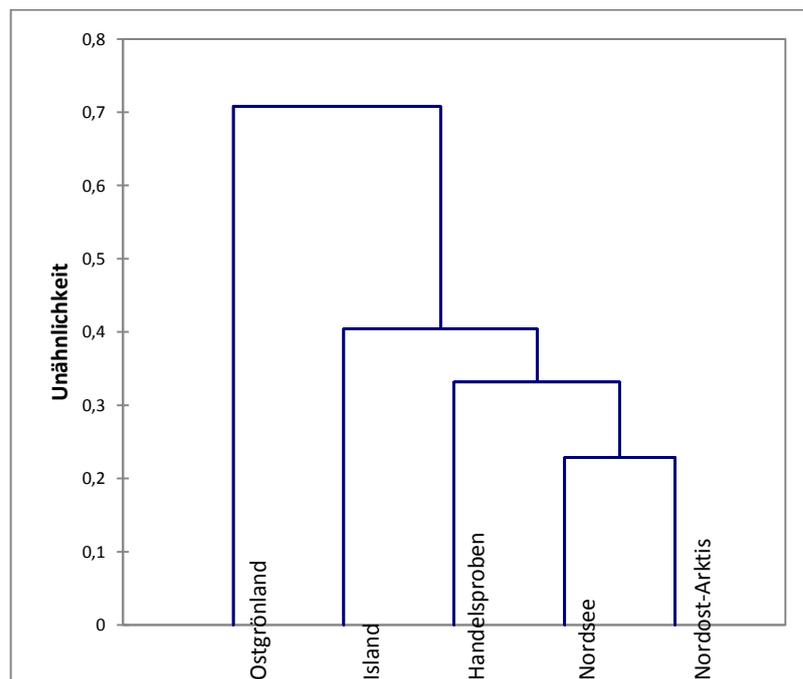


Abbildung 18: Dendrogramm auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (HpyCH4IV)

Das Dendrogramm (Abbildung 18) zeigt die Clusteranalyse für die RFLP mit HpyCH4IV auf Basis der genetischen Distanzen nach Nei (D). Es ist eine schwache Trennung der ostgrönländischen von den Beständen aus Island, der Nordost-Arktis, den Handelsproben und der Nordsee zu erkennen. Innerhalb dieser Gruppierung clustern Nordsee- und nordost-arktischer Bestand mit

dem geringsten Abstand, die Handelsproben und der isländische Bestand folgen in dieser Reihenfolge.

Die auf Basis des RFLP-Markers Taq α I errechneten genetischen Distanzen widersprechen teilweise den Ergebnissen aus der RFLP mit HpyCH4IV. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt. So wurde anhand von ϕ_{ST} eine signifikant hohe genetische Differenzierung zwischen den Handelsproben und der Nordsee, Ostgrönland und Island festgestellt ($p = 0,01$). Des Weiteren differenzieren sich die Regionen Nordsee und Nordostarktisch voneinander. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der RFLP mit HpyCH4IV, wonach sich die Nordsee-Proben nicht von den nordost-arktischen differenzieren lassen ($\phi_{ST} = 0,025$, NS) und die Handelsproben sich signifikant von den nordost-arktischen Fischen unterscheiden. Die Region Nordost-Arktis weist außerdem eine Differenzierung von den isländischen sowie den ostgrönländischen Proben auf. Diese Ergebnisse sind ebenfalls hoch signifikant ($p = 0,01$).

Die genetischen Distanzen nach Nei bestätigen diese Ergebnisse. Innerhalb der Gruppen ist die durchschnittliche Anzahl von Unterschieden über alle ausgewerteten RFLP-Schnittstellen (π) für Ostgrönland am höchsten und innerhalb der Region Nordsee sowie für die Handelsproben am geringsten.

Tabelle 27: Genetische Distanzen (Taq α I) (Oberhalb der Diagonalen: Nei's D, Diagonale: π , Unterhalb der Diagonalen: Paarweise ϕ_{ST} , * = signifikant ($p = 0,05$), ** = hoch signifikant ($p = 0,01$))

	Handelsproben	Nordsee	Nordost-Arktis	Ostgrönland	Island
Handelsproben	0,625	1,144 **	0,712	1,517 **	1,226 **
Nordsee	0,202 **	1,202	1,127 *	1,400	1,221
Nordost-Arktis	0,075	0,154 **	0,693	1,399 **	1,181 *
Ostgrönland	0,324 **	0,058	0,234 **	1,437	1,395
Island	0,210 **	-0,026	0,147 **	0,018	1,303

Das Dendrogramm für die RFLP mit Taq α I zeigt, dass die Ostgrönland-Proben getrennt von den anderen Gruppen clustern. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen aus der Analyse von HpyCH4IV überein. Die Handelsproben clustern am dichtesten zusammen mit der Region Nordost-Arktis, was einen Unterschied zu der Analyse mit HpyCH4IV darstellt.

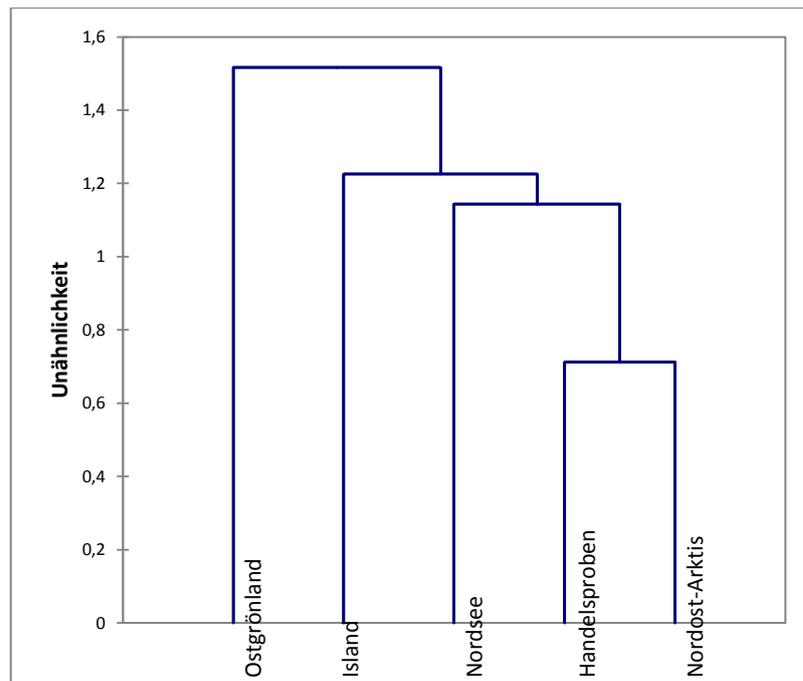


Abbildung 19: Dendrogramm auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (Taq α I)

In Tabelle 28 ist die AMOVA auf Basis der RFLP mit HpyCH4IV dargestellt. Mit Hilfe der Analyse lässt sich die beobachtete Variabilität hinsichtlich ihrer Ursache zuordnen. Es wurde die genetische Variabilität innerhalb und zwischen den fünf Gruppen untersucht. Für die Analyse wurde wieder angenommen, dass jeder Bestand einer Population entspricht. Die genetische Variation zwischen den fünf Beständen erklärt 6,45 % der Gesamtvariation. Dieses Ergebnis ist hoch signifikant ($p = 0,01$). Der Anteil der Variation innerhalb der Populationen ist mit 93,55 % deutlich größer.

Tabelle 28: AMOVA (HpyCH4IV) (NB= Nicht berechnet)

Variabilität	Freiheitsgrade (n-1)	SQ	Varianzkomponenten (SQ/n-1)	Varianz (%)	p-Wert	ϕ_{ST}
Zwischen Populationen	4	5,046	0,029	6,45	0,002**	0,065
Innerhalb Populationen	137	58,525	0,427	93,55	NB	NB

Die AMOVA auf Basis der RFLP mit Taq α I zeigt ein ähnliches Bild. 14,11 % (hoch signifikant, $p = 0,01$) der Gesamtvariation wird durch die Variation zwischen den Populationen erklärt, 85,89 % der Variation entfällt auf die Variabilität innerhalb der Populationen.

Tabelle 29: AMOVA (Taq α I) (NB= Nicht berechnet)

Variabilität	Freiheits- grade (n-1)	SQ	Varianz- komponenten (SQ/n-1)	Varianz (%)	p- Wert	ϕ_{ST}
Zwischen Populationen	4	12,322	0,087	14,11	0,000 **	0,141
Innerhalb Populationen	141	75,061	0,532	85,89	NB	NB

9.2 Genetische Differenzierung anhand des Calmodulin-Markers

In Tabelle 30 sind die beobachtete und die erwartete Heterozygotie sowie das Ergebnis des Tests auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht (vgl. Kapitel 7.7.3) für alle drei Loci dargestellt. Jeder Locus wird in diesem Fall separat betrachtet. Es konnte in keinem Fall eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht festgestellt werden ($p=0,01$). Auch über alle Bestände berechnet befindet sich die Population im Hardy-Weinberg Gleichgewicht ($p=0,01$). Dies spiegelt sich auch in den geringen Unterschieden zwischen beobachteter und erwarteter Heterozygotie innerhalb der Regionen wider.

Tabelle 30: Beobachtete (H_{beob}) und erwartete Heterozygotie (H_{erw}) sowie Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht (NS= Nicht signifikant)

		H_{beob}	H_{erw}	HWG
Nordsee	Locus 1	0,500	0,509	NS
	Locus 2	0,536	0,503	NS
	Locus 3	0,464	0,508	NS
	alle Loci	0,500	0,507	
Ostgrönland	Locus 1	0,435	0,487	NS
	Locus 2	0,435	0,394	NS
	Locus 3	0,348	0,502	NS
	alle Loci	0,406	0,461	
Nordost-Arktis	Locus 1	0,571	0,499	NS
	Locus 2	0,393	0,431	NS
	Locus 3	0,393	0,508	NS
	alle Loci	0,452	0,479	
Island	Locus 1	0,500	0,494	NS
	Locus 2	0,567	0,463	NS
	Locus 3	0,400	0,506	NS
	alle Loci	0,489	0,488	
Handelsproben	Locus 1	0,448	0,499	NS
	Locus 2	0,517	0,487	NS
	Locus 3	0,414	0,503	NS
	alle Loci	0,460	0,496	
Über alle Bestände	Locus 1	0,500	0,492	NS
	Locus 2	0,500	0,462	NS
	Locus 3	0,428	0,499	NS
	Alle Loci	0,476	0,484	

In der Tabelle 31 sind die Inzuchtkoeffizienten für die untersuchten Bestände dargestellt. Der Inzuchtkoeffizient kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ein positiver F_{IS} deutet auf einen erhöhten Anteil von homozygoten, ein negativer auf einen höheren Anteil von heterozygoten Genotypen hin (Beaumont, Boudry und Hoare, 2010, S. 57). Keine der Regionen weist einen signifikant höheren Anteil an homozygoten Genotypen auf als unter der Annahme des Hardy-Weinberg Modells erwartet. Der Ostgrönland-Bestand hat mit 0,123 den höchsten Inzuchtkoeffizienten. Für alle anderen Bestände bewegt sich der Wert um Null, für den isländischen Bestand ist der Wert sogar negativ, was auf einen höheren Anteil von heterozygoten Genotypen hinweist. Betrachtet man alle Regionen gemeinsam, so erhält man einen Inzuchtkoeffizienten von 0,049. Dieser Wert ist ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,05$).

Tabelle 31: Inzuchtkoeffizienten für die einzelnen Bestände und über alle (CalmEX 4F/5R)

	F_{IS}	P-Wert = 0,05
Nordsee	0,014	NS
Handelsproben	0,075	NS
Ostgrönland	0,123	NS
Island	-0,002	NS
Nordost-Arktis	0,057	NS
Über alle	0,049	NS

In der Tabelle 32 sind die Kennwerte für die genetische Distanz zwischen und innerhalb der Bestände abgebildet. Die ϕ_{ST} -Werte sind größtenteils negativ, es ist also keine genetische Differenzierung erkennbar. Es wird deutlich, dass sich die Regionen im paarweisen Vergleich hinsichtlich dieses Kennwertes nicht signifikant ($p = 0,05$) voneinander unterscheiden.

Die Werte für D sind nicht signifikant ($p = 0,05$). Des Weiteren wird deutlich, dass die Unterschiede innerhalb der Gruppen in etwa so groß sind wie zwischen den Gruppen.

Tabelle 32: Genetische Distanzen (CalmEX 4F/5R) (Oberhalb der Diagonalen: Nei's D , Diagonale: π , Unterhalb der Diagonalen: Paarweise ϕ_{ST} , alle Ergebnisse nicht signifikant, $p = 0,05$)

	Nordsee	Handelsproben	Ostgrönland	Island	Nordost-Arktis
Nordsee	1,521	1,491	1,477	1,485	1,480
Handelsproben	-0,010	1,489	1,429	1,454	1,448
Ostgrönland	0,016	-0,006	1,384	1,406	1,388
Island	-0,005	-0,015	-0,013	1,463	1,428
Nordost-Arktis	0,000	-0,011	-0,016	-0,016	1,438

In der Abbildung 20 ist das Ergebnis der Clusteranalyse auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (D) abgebildet. Es konnten keine den Beständen übergeordneten deutlich getrennten Cluster gebildet werden. Anhand der in etwa gleich langen Äste erkennt man die geringen Unterschiede in der Distanz zwischen den Gruppen. Die Analyse ist daher nur bedingt aussagekräftig.

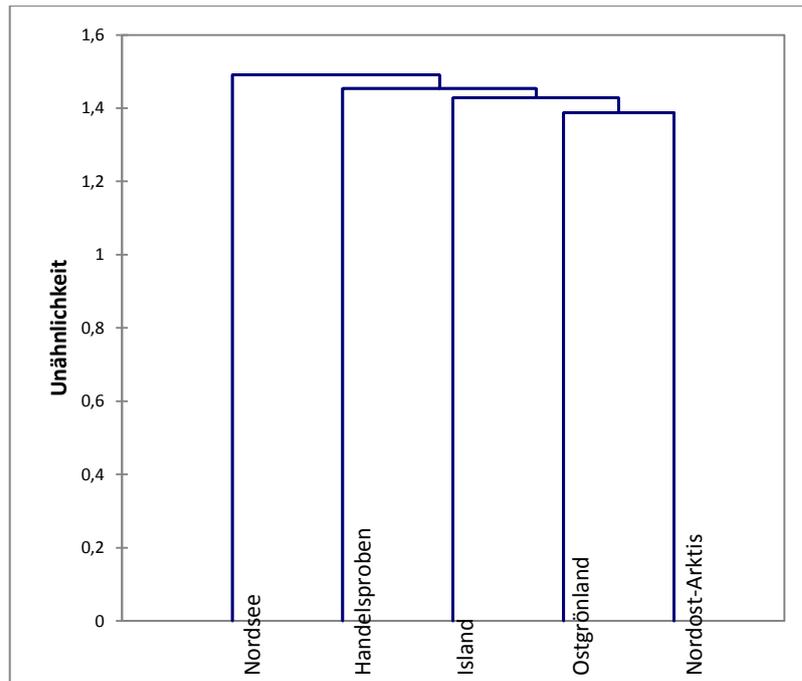


Abbildung 20: Dendrogramm auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (CalmEX 4F/5R)

In der Tabelle 33 ist die AMOVA auf Basis des Calmodulin-Markers dargestellt. Bei der Analyse wird deutlich, dass die Varianz ausschließlich durch die Variabilität innerhalb der Regionen erklärt wird. Der berechnete Varianz-Anteil für „zwischen den Populationen“ ist negativ, der Fixations-Index ebenfalls. Das Ergebnis ist nicht signifikant ($p = 0,05$).

Tabelle 33: Ergebnisse der AMOVA (CalmEX 4F/5R,) (NS= Nicht signifikant, NB= Nicht berechnet)

Variabilität	Freiheitsgrade (n-1)	SQ	Varianz-komponenten	Varianz (%)	p-Wert	ϕ_{ST}
Zwischen Populationen	4	0,920	-0,001	-0,41	NS	-0,004
Innerhalb Populationen	271	80,572	0,297	100,41	NB	NB

9.3 Genetische Differenzierung über alle Marker

Mit Hilfe einer Diskriminanzanalyse wurde überprüft, ob eine Trennung der Seelachs-Bestände möglich ist, wenn alle Marker gleichzeitig betrachtet werden.

Dafür wurden aus den in Form von Phänotypen vorliegenden Calmodulin-Daten mit Hilfe des ELB-Algorithmus die zu Grunde liegenden Haplotypen errechnet und daraus Genotypen rekonstruiert (vgl. Anhang B 4, Tabelle 45). Diese Daten wurden in binär codierte Variablen umgewandelt. Die RFLP-Marker wurden, ebenso wie die Aktin-Doppelbande, direkt in Form

von binären Codes erfasst. Daten, für die Beobachtungen für einen oder mehrere Marker fehlten, wurden in der Analyse nicht ausgewertet. 41 Proben mussten deshalb entfernt werden, weshalb insgesamt nur 120 Proben ausgewertet wurden (vgl. Anhang B 4, Tabelle 46 und Tabelle 47).

Es wurden insgesamt vier Diskriminanzfunktionen gebildet. In der Abbildung 21 sind als Achsen die Diskriminanzfunktionen F1 und F2 ausgewählt, die zusammen 79,48 % der beobachteten Streuung erklären. Es wird deutlich, dass sich die Bestände nicht anhand der untersuchten Marker trennen lassen. Die Fische aller Regionen erscheinen als ungeordnete Punktwolke innerhalb der Graphik.

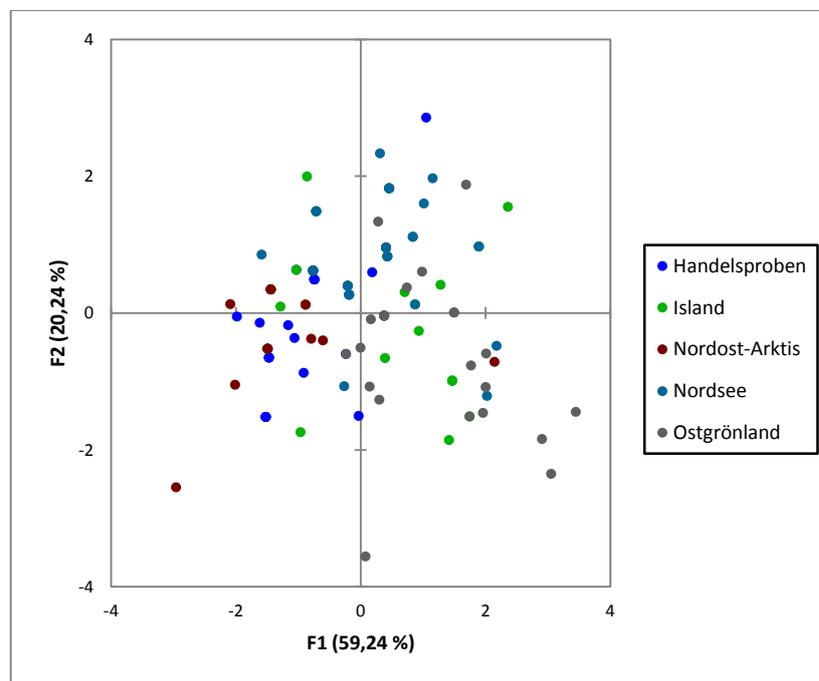


Abbildung 21: Diskriminanzanalyse über alle Marker und Proben (Achsen F1 und F2 : 79,48 %)

Dies zeigt sich auch in der auf Basis der Diskriminanzanalyse erstellten Klassifikationsmatrix (Tabelle 34). Aus dieser Tabelle lässt sich ablesen, wie viele Fische anhand der Diskriminanzfunktionen ihrer Herkunft entsprechend richtig zugeordnet werden können. Insgesamt konnten nur 46,25 % der untersuchten Proben richtig zugeordnet werden. Es fällt auf, dass dem Nordost-Arktis-Bestand 100 % der zugehörigen Proben richtig zugeordnet wurden. Allerdings wurden diesem Bestand auch 48 Fische zugeordnet, die an anderen Orten gefangen wurden.

Tabelle 34: Klassifikationsmatrix über alle Marker und Proben

von \ nach	Handels- proben	Island	Nordost- Arktis	Nord- see	Ost- grönland	% korrekt
Handels- proben	12	0	12	0	0	50,00%
Island	2	1	16	6	0	3,45%
Nordost-Arktis	0	0	24	0	0	100,00%
Nordsee	3	0	11	11	0	44,44%
Ostgrönland	2	0	9	5	8	33,33%
Gesamtwert	19	1	72	21	8	46,25%

Die Diskriminanzanalyse wurde außerdem für das bereinigte Probenet (ohne Fische > 60 cm) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 anhand der Diskriminanzfunktionen 1 und 2 dargestellt. Auch hier ist keine eindeutige räumliche Trennung der Bestände zu erkennen. Die Diskriminanzwerte der Stichprobe aus der Nordost-Arktis liegen jedoch im Koordinatensystem relativ dicht zusammen.

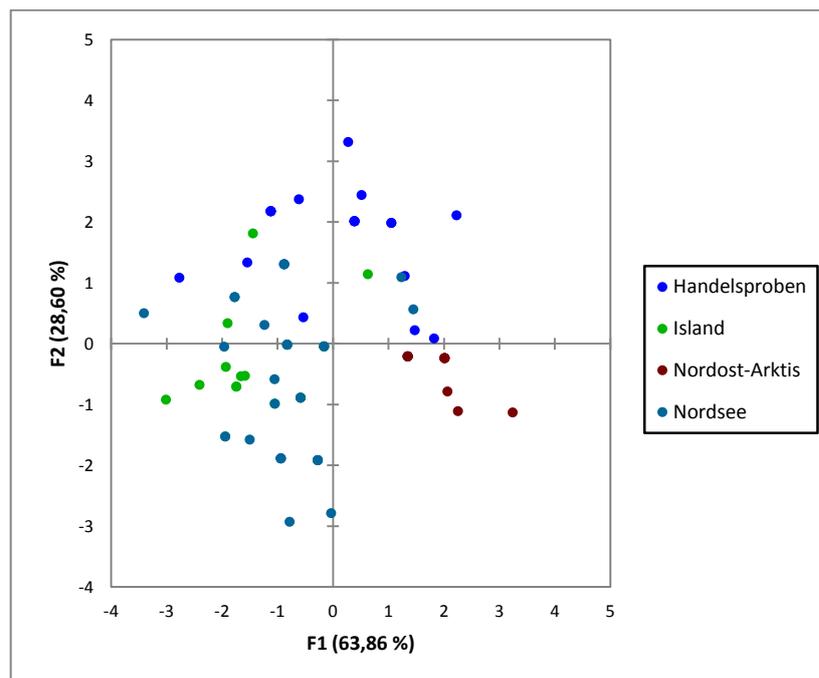


Abbildung 22: Diskriminanzanalyse über alle Marker und Proben < 60 cm (Achsen F1 und F2 : 92,45 %)

Laut Klassifikationsmatrix (Tabelle 35) konnten nun 73,58 % der Proben ihrer Herkunft entsprechend richtig zugeordnet werden. Die geringste Trefferquote hat dabei mit 22, 22 % die Stichprobe aus Island. Dem Nordost-Arktis-Bestand konnten wieder alle Proben richtig zugeordnet werden.

Tabelle 35: Klassifikationsmatrix über alle Marker und Proben <60 cm

von \ nach	Handelsproben	Island	Nordost-Arktis	Nordsee	% korrekt
Handelsproben	17	0	2	1	87,50%
Island	3	4	1	11	22,22%
Nordost-Arktis	0	0	20	0	100,00%
Nordsee	3	0	0	17	84,62%
Gesamtwert	23	4	22	28	73,58%

10 Diskussion

Es wurde untersucht, ob sich die im Rahmen des ICES klassifizierten Seelachs-Bestände des Nordost-Atlantiks mit Hilfe von auf Basis der EPIC-PCR entwickelten Methoden differenzieren lassen. Im Folgenden sollen mehrere Punkte diskutiert werden:

1. Konnte anhand der untersuchten Marker eine genetische Differenzierung der Bestände nachgewiesen werden?
2. Inwieweit deckt sich das Ergebnis mit den Untersuchungen anderer Autoren?
3. Konnten die aus dem Handel stammenden Seelachsproben anhand der genetischen Marker ihrem Herkunftsbestand (Nordsee) zugeordnet werden?
4. Ist eine genetische Trennung der Bestände auf Grund der biologischen Eigenschaften des Seelachses wahrscheinlich?

Es wird deutlich, dass sich die Ergebnisse je nach betrachtetem Marker unterscheiden.

Die AMOVA auf Grundlage des RFLP-Markers HpyCH4IV ergab, dass sich 6,45 % der gesamten genetischen Variation durch die Variation zwischen den Populationen erklären lassen. Für den Marker Taq α I waren es 14,11 %. Diese Ergebnisse weisen insgesamt eher auf eine geringe genetische Strukturierung der Populationen hin.

Betrachtet man die Dendrogramme für die RFLP-Marker auf Basis der genetischen Distanz nach Nei (vgl. Kapitel 9.1), zeigt sich in beiden eine ähnliche Struktur. Die Stichprobe aus Ostgrönland clustert getrennt von den anderen Gruppen. Am engsten clustern in beiden Analysen die Handelsproben, Nordsee- und Nordost-Arktis-Bestand. Der isländische Bestand ist zwischen den ostgrönländischen und den kontinentalen (Handelsproben, Nordsee- und Nordost-Arktis-Bestand) Proben eingeordnet.

Die Stichprobe aus Ostgrönland muss gesondert betrachtet werden, da es sich bei diesen Fischen nicht um einen eigenen durch den ICES klassifizierten Bestand handelt. Laut Homrum *et al.* (2012) migriert der Seelachs im Nordost-Atlantik bevorzugt von Osten nach Westen. Daher ist es möglich, dass die ostgrönländischen Fische aus dem Nordsee- oder nordost-arktischen Bestand stammen. Reinsch (1976) nennt als mögliche Herkunft Tiere aus dem isländischen Bestand, die nicht dauerhaft in den ostgrönländischen Gewässern leben (vgl. Kapitel 6.4). Anhand der genetischen Distanz ϕ_{ST} konnte mit beiden RFLP-Markern eine signifikante Differenzierung ($p = 0,01$, $\phi_{ST} = 0,187$) von den nordost-arktischen Fischen festgestellt werden. Auf Basis der genetischen Distanz D wurde außerdem eine genetische

Differenzierung von dem Bestand in der Nordsee festgestellt ($p = 0,05$, $D = 1,090$). Kein signifikanter Unterschied konnte zum isländischen Bestand ermittelt werden. Da es sich bei einem Teil der analysierten Stichprobe nicht um einen Schwarm, sondern um in mehreren Hols einzeln gefangene Tiere handelt (vgl. Kapitel 7.1.1), ist es denkbar, dass es sich um eine Mischprobe aus verschiedenen Beständen handelt. Es ist deshalb möglich, dass die ermittelten Ergebnisse aus der Inhomogenität der untersuchten Stichprobe resultieren. Dies hätte anhand eines Tests auf Vorliegen des Hardy-Weinberg Gleichgewichts überprüft werden können. Da bei den Daten aus der RFLP-Analyse keine Unterscheidung von homo- und heterozygoten Genotypen möglich war, konnte dieser Test jedoch nicht durchgeführt werden (vgl. Kapitel 5.1).

Anhand des RFLP-Marker HpyCH4IV konnte keine signifikante Differenzierung des isländischen Bestands von einem der anderen Bestände ermittelt werden. Die Werte für die genetische Distanz ϕ_{ST} sind insgesamt niedrig ($0,0019 > \phi_{ST} > -0,004$), nur zwischen dem isländischen und nordostarktischen Bestand liegt der Wert höher (NS, $\phi_{ST} = 0,111$). Anhand des Markers Taq α I konnte eine signifikante Differenzierung zu den nordost-arktischen und den Handelsproben ermittelt werden. Der isländische Bestand ist laut Homrum *et al.* (2012) relativ ortstreu. Nur 1 % der isländischen Fische wurde im Rahmen der Tagging-Untersuchungen (vgl. Kapitel 6.4) außerhalb der isländischen Gewässer wieder eingefangen. Des Weiteren rekrutiert sich der isländische Bestand aus einem eigenen Laichgebiet (vgl. Kapitel 6.2). Daher ist es denkbar, dass dieser Bestand von den kontinentalen Beständen in der Nordost-Arktis und der Nordsee differenziert ist. Gegen eine Differenzierung spricht die Tatsache, dass 30 % des isländischen Bestandes immigrierte Tiere von den Färöer Inseln sowie aus der Nordost-Arktis sind. Besonders im Sommer (alle Probennahmen fanden im Sommer statt) sind vor Island jedoch auch vermehrt Fische aus den nordost-arktischen Gewässern zu finden, die auf der Suche nach Nahrung dem Hering folgen (vgl. Kapitel 6.4).

Anhand der genetischen Distanzen, die die Basis für die Dendrogramme bilden, konnte anhand des Markers Taq α I eine signifikante Differenzierung zwischen dem Nordost-Arktis- und dem Nordsee-Bestand ($p = 0,01$, $D = 1,127$) festgestellt werden. Die Ergebnisse aus der RFLP mit HpyCH4IV widersprechen diesem Ergebnis. Mit diesem Marker konnte keine signifikante Differenzierung zwischen den Beständen in der Nordsee und der Nordost-Arktis festgestellt werden (NS, $D = 0,677$). Des Weiteren ergibt sich für die untersuchten Handelsproben einmal eine signifikante Differenzierung vom Nordsee- (Taq α I, $p = 0,01$, $D = 0,752$) und einmal vom Nordost-Arktis-Bestand (HpyCH4IV, $p = 0,01$, $D = 1,144$).

Nordost-arktischer und Nordsee-Bestand rekrutieren sich teilweise aus unterschiedlichen Laichgründen (vgl. Kapitel 6.2), was eine genetische Differenzierung der Bestände zur Folge haben könnte. Des Weiteren migriert Seelachs laut Jakobsen (1981) an der norwegischen Küste zwischen 62° und 66° verstärkt nach Süden, wohingegen Fische zwischen 66° und 68° N sich eher Richtung Norden orientieren. Da die untersuchten Proben von nordost-arktischem Seelachs jenseits der 66° N gefangen wurden, ist es möglich, dass diese von den südlich der 62° N gefangenen Fischen genetisch differenziert sind.

Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass nordost-arktischer Seelachs zum Laichen auch in die Nordsee wandert (vgl. Kapitel 5.1). Mehrere Autoren (Jakobsen, 1981; Homrum *et al.*, 2012) gehen außerdem davon aus, dass es bei 62°N keine klare biologische Grenze zwischen den Beständen gibt. Anhand von Tagging-Studien konnte gezeigt werden, dass juveniler Seelachs aus der Nordost-Arktis (zwischen 62° und 65°) in die Nordsee migriert, um in dem Seegebiet südlich von 62°N vor der norwegischen Küste zu reifen. Dieser immigrierte Seelachs kehrt zu großen Teilen nicht in die nordost-arktischen Gewässer zurück, sondern verbleibt in der Nordsee, was gegen eine genetische Differenzierung spricht (Jakobsen, 1981, S. 28f)

Die widersprüchlichen Ergebnisse können jedoch auch ein Hinweis darauf sein, dass sich die gefundenen Marker nicht für eine Differenzierung eignen. Wie bereits erwähnt, konnte bei den RFLP-Daten kein Test auf Vorliegen des Hardy-Weinberg Gleichgewichts durchgeführt werden. Dadurch kann nicht beurteilt werden, ob die beobachteten Allel-Frequenzen durch populationsgenetische Prozesse, wie zum Beispiel genetischer Drift, beeinflusst und damit eventuell nicht repräsentativ sind (vgl. Kapitel 5.1). Die Beständigkeit der genetischen Verteilung ist jedoch ein wichtiger Indikator für die Stabilität sowie die Neutralität eines genetischen Markers (Chow und Hazama, 1998, S. 1256; Côté-Real, Dixon und Holland, 1994, S. 412).

Hinsichtlich des Calmodulin-Markers sind alle betrachteten Proben im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (vgl. Kapitel 9.2). Es konnte kein signifikanter Überschuss an homozygoten Genotypen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den Seelachs-Beständen im Nordost-Atlantik nicht um eine strukturierte Population handelt. Des Weiteren war die errechnete genetische Distanz ϕ_{ST} zwischen den Beständen sehr gering und nicht signifikant, was ebenfalls ein Indikator für eine geringe genetische Strukturierung der durch den ICES klassifizierten Bestände ist. Die genetische Distanz D war hingegen relativ hoch ($1,388 < D < 1,491$). Vergleicht man die Werte jedoch mit der genetischen Distanz innerhalb der Gruppen (π), so wird deutlich, dass diese sich in der gleichen Größenordnung bewegen. Dies

konnte anhand der AMOVA bestätigt werden. Diese Analyse zeigt, dass die beobachtete genetische Variation zu 100 % durch die Variation innerhalb der Bestände erklärt wird. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass anhand des Calmodulin-Markers keine genetische Differenzierung der Bestände möglich ist.

Bei der Untersuchung des Calmodulin-Markers fällt außerdem auf, dass sich einige Proben trotz ausreichend hoher DNS-Gehalte im Extrakt nicht mit Hilfe des Primerpaars CalmEX 4F/5R amplifizieren lassen (vgl. Kapitel 8.3). Durch Wiederholung der DNS-Extraktion und den Einsatz von Positivkontrollen konnten Fehler bei der Extraktion sowie bei der Durchführung der PCR ausgeschlossen werden. Auch die Aufreinigung der DNS-Extrakte mit Hilfe eines Reinigungskits konnte die Amplifizierbarkeit in der PCR nicht verbessern. Da mit dem Primerpaar Act 2F/2R Amplifikate erhalten werden, weist dies darauf hin, dass nicht in den Extrakten enthaltene Hemmstoffe verantwortlich für die mangelhafte Amplifizierbarkeit einiger Proben sind. Laut Matsuo *et al.* (1992) konnten in Medaka vier verschiedene Gene gefunden werden, die für Calmodulin codieren. Diese Gene unterscheiden sich in ihrer Nukleotid-Sequenz, unter anderem auch in der Region, die für das Design des CalmEX 4F/5R-Primers verwendet wurde (Abbildung 23). Eine mögliche Erklärung für die schlechte oder nicht funktionierende Amplifizierung könnten daher Polymorphismen innerhalb der Bindungsstelle eines oder beider Primer sein. Wie in Kapitel 8.3 beschrieben, konnten von den Proben aus der Nordost-Arktis sowie aus Ostgrönland die wenigsten Proben ausgewertet werden. Des Weiteren fallen bei den Proben aus der Nordsee die Fangorte Tampen und Viking Bank durch eine unzureichende Amplifizierbarkeit auf. Dies deutet darauf hin, dass die Methode nicht auf jede beliebige Stichprobe anwendbar und die ermittelten Ergebnisse somit nicht stabil sind. Die Unterschiede in der Amplifizierbarkeit, eventuell verursacht durch Polymorphismen in der Primer-Bindungsregion, könnten jedoch auch als Basis für die Entwicklung eines neuen Markers dienen. Dieser Punkt wird in Kapitel 12 genauer ausgeführt.

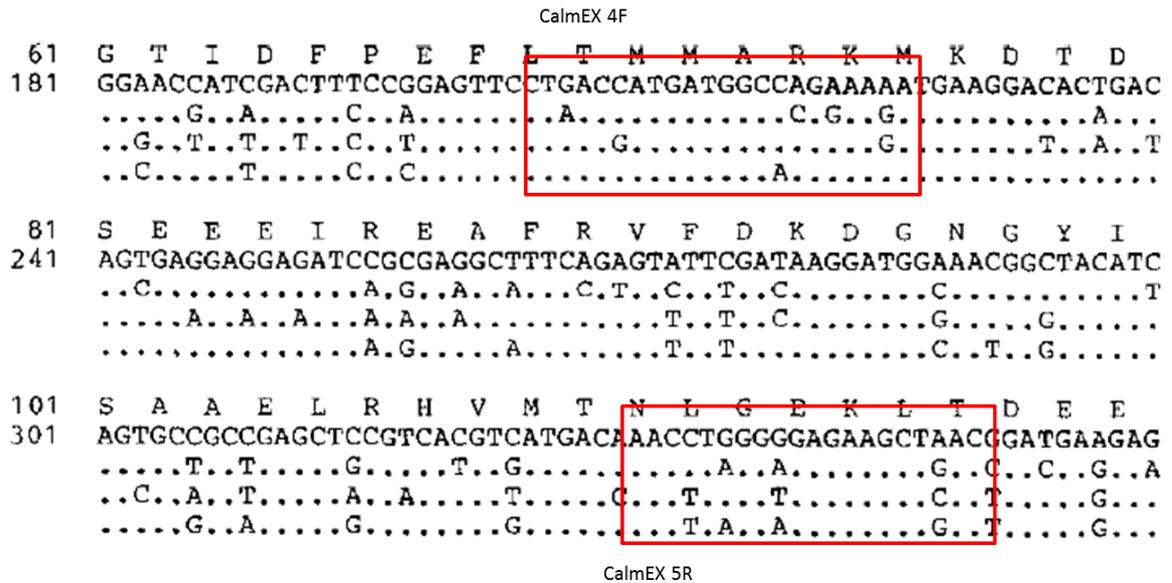


Abbildung 23: Calmodulin- Gene A-D von *Oryzias latipens*, Design der CalmEX Primer anhand von Calmodulin A (oberste Reihe) (Matsuo *et al.*, 1992, S. 280)

Zusätzlich wurde die genetische Differenzierung über alle gefundenen Marker analysiert. In die Analyse wurden also der Calmodulin-, beide RFLP-Marker und die Doppelbande bei 897 und 860 bp mit einbezogen. Die Analyse wurde einmal über alle Tiere und, auf Basis der Ergebnisse von Homrum *et al.* (2012) (vgl. Kapitel 6.4), nur mit Tieren > 60 cm durchgeführt. Über alle Tiere und Marker konnte keine genetische Differenzierung der Bestände festgestellt werden. Die einzelnen Tiere konnten anhand der Diskriminanzfunktionen zu 46,25 % ihrer Herkunft entsprechend zugeordnet werden. Werden nur die Tiere kleiner als 60 cm mit in die Analyse einbezogen, so scheinen sich die Tiere aus der Nordost-Arktis von den anderen zu differenzieren. Mit 73,58 % konnten mehr Fische ihrer Herkunft entsprechend zugeordnet werden. In beiden Analysen sind dabei alle Tiere aus der Nordost-Arktis anhand der genetischen Marker ihrem Bestand richtig zugeordnet worden, was ebenfalls ein Hinweis für eine mögliche genetische Differenzierung des nordost-arktischen Bestands von den anderen Beständen ist. Die Zuordnung der einzelnen Untersuchungselemente in die entsprechenden Gruppen sollte jedoch nicht überbewertet werden. Laut Backhaus *et al.* (2006) ist die Trefferquote immer überhöht, wenn sie auf Basis derselben Stichprobe berechnet wird, aus der auch die Diskriminanzfunktionen geschätzt wurden. Dieser Effekt verstärkt sich bei kleinen Stichproben, weshalb die Trefferquoten der Analyse mit und ohne Fische > 60 cm nicht direkt miteinander vergleichbar sind.

Insgesamt ist festzustellen, dass sich die Aussagen der einzelnen Marker über die Differenzierung der Bestände teilweise inhaltlich widersprechen. Dieses Phänomen wurde auch von Rolland *et al.* (2007) beobachtet. Die Autoren untersuchten die genetische

Differenzierung der Seezunge anhand von verschiedenen EPIC-Markern (vgl. Kapitel 5.3). Die Analyse erfolgte einmal für jeden Marker einzeln und über alle Marker. Über eine gemeinsame Analyse aller genetischen Marker konnten frühere Ergebnisse zur Untersuchung der Populationsstruktur der Seezunge bestätigt werden. Die Ergebnisse der einzelnen EPIC-Marker zeigten unterschiedliche Differenzierungsmuster. Dies könnte laut Rolland *et al.* (2007) einerseits durch genetische Drift und Genfluss und andererseits durch Selektion bedingt sein. Introns werden allgemein als selektionsneutral betrachtet (vgl. Kapitel 3.4), dennoch können sie über benachbarte, nicht neutrale Nukleotid-Sequenzen indirekt von Selektion betroffen sein, was auch die Allel-Frequenzen innerhalb der Introns beeinflussen kann (Barton, 2000, S. 1553). Die Autoren folgerten daraus, dass die aus der gemeinsamen Analyse aller Marker gewonnenen Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten sind.

11 Fazit

Insgesamt lässt sich keine eindeutige Differenzierung der durch den ICES klassifizierten Bestände ableiten. Es ist daher anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich, die Herkunft von im Nordost-Atlantik gefangenem Seelachs zu bestimmen. Daher ist auch keine eindeutige Zuordnung der Handelsproben zu ihrem Herkunftsbestand, der Nordsee, möglich. Des Weiteren konnte innerhalb der Bestände eine hohe genetische Variabilität beobachtet werden.

Als möglicher Grund für eine fehlende genetische Differenzierung wurde bereits das Migrationsverhalten des Seelachses angeführt. Seelachse sind sehr gute Schwimmer und können auf ihren Wanderungen weite Strecken zurücklegen (Reinsch, 1976, S. 99f). Es ist bekannt, dass Seelachse zum Teil die Laichgebiete anderer Bestände aufsuchen oder aus Gebieten, in die sie als Larve verdriftet oder als juveniler Fisch migriert sind, nicht in ihren Herkunftsbestand zurückkehren. Dies hat einen genetischen Austausch zwischen den Beständen zur Folge.

Des Weiteren wurde diskutiert, dass die im Rahmen des ICES festgelegten Grenzen, die die einzelnen Bestände voneinander trennen, nicht unbedingt biologische und damit auch keine Grenzen für genetischen Austausch sind. Die in den jeweiligen ICES-Gebieten gefangenen Fische, die als Probenmaterial in dieser Arbeit untersucht wurden, stammen daher auch nicht notwendigerweise aus dem Bestand, der diesem Gebiet zugeordnet wird. Besonders im Sommer legen die Seelachse auf der Suche nach Nahrung große Strecken zurück und halten sich in diesem Zusammenhang häufiger außerhalb ihres geographischen Ursprungsgebiets auf (Homrum *et al.*, 2012). Da alle Probennahmen im Sommer während der Fressphase des Seelachses stattfanden, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich migrierte Fische innerhalb der einzelnen Stichproben befinden.

Die fehlende genetische Differenzierung könnte andererseits auch auf eine mangelnde Eignung der verwendeten genetischen Marker zurückzuführen sein. Mögliche Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse aus der Analyse der RFLP-Daten sind der Einfluss von Genfluss, genetischer Drift und natürlicher Selektion auf die Marker (vgl. Kapitel 5.1). Da für die RFLP-Marker kein Test auf Hardy-Weinberg Gleichgewicht möglich war, ist es nicht auszuschließen, dass diese Faktoren einen Einfluss auf die untersuchten Bestände haben (vgl. Kapitel 10). Anhand des Calmodulin-Markers konnte keine Differenzierung festgestellt werden. Da sich die einzelnen Bestände hinsichtlich dieses Markers im Hardy-Weinberg Gleichgewicht befinden, ist

dieser Marker grundsätzlich als selektionsneutral und damit vertrauenswürdig einzustufen. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine geringe Strukturierung der Seelachspopulation im Nordost-Atlantik als Hypothese anzunehmen ist.

12 Ausblick

Zur Überprüfung der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind weitere Untersuchungen der Populationsstruktur des Seelachs notwendig. Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Differenzierung der vom ICES klassifizierten Bestände zu Rückverfolgbarkeitszwecken. Die ICES-Grenzen wurden daher als gegebene Bestands-Grenzen angesehen. Da, wie bereits diskutiert, die klassifizierten Bestände nicht notwendigerweise auch biologische Einheiten sein müssen (vgl. Kapitel 6), ist diese Annahme für die Untersuchung der grundsätzlichen Struktur der Seelachs-Population unter Umständen nicht sinnvoll. Ein anderer, eher biologisch orientierter Ansatz wäre daher die Gruppierung der Stichproben anhand ihrer geographischen Herkunft auf Basis der aus den verschiedenen Tagging-Studien bekannten biologischen Kenntnisse. Die anhand einer solchen Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse könnten dann für die Etablierung von Methoden zur Überprüfung der Rückverfolgbarkeit von Seelachs genutzt werden.

Des Weiteren könnte eine gestaffelte Probennahme sinnvoll sein. Es ist bekannt, dass der Seelachs sowohl saisonale Migration zwischen Laich- und Futtergebieten zeigt als auch je nach Alter unterschiedliche Regionen bevölkert (vgl. Kapitel 6.1 und 6.4). Es könnte einerseits die genetische Differenzierung zwischen im Sommer (Futtergebiete) und im Winter (Laichgebiete) gezogenen Proben und andererseits die Differenzierung zwischen unterschiedlichen Alterskohorten untersucht werden. Dadurch wären Rückschlüsse auf die Stabilität der genetischen Verteilung möglich. Rolland *et al.* (2007) analysierten in ihrer Arbeit zur Populationsdifferenzierung der Seezunge verschiedene Alterskohorten, um die zeitliche Veränderung der Population beurteilen zu können. Hierzu wurden die Fische einer Region in drei Kohorten unterteilt: Juvenile 0+, Juvenile 1+ sowie Subadulte. Die Proben wurden jeweils weiteren geographischen Sub-Regionen zugeordnet. Anschließend wurden sie anhand der genetischen Marker analysiert. Es konnte keine genetische Differenzierung zwischen den Kohorten festgestellt werden. Dennoch war die genetische Distanz, gemessen durch den Kennwert ϕ_{ST} , zwischen den Kohorten innerhalb der Sub-Regionen teilweise höher als die Distanz zwischen den Sub-Regionen.

Wie bereits diskutiert, konnten einige Proben aus der Nordost-Arktis, Ostgrönland und zwei Nordsee-Fangorten mit dem Primer CalmEX 4F/5R nicht zuverlässig amplifiziert werden. Auf dieser Basis könnte die Entwicklung eines neuen Markers erfolgen. Erste Versuche in dieser Richtung zeigen, dass die schlechte Amplifizierbarkeit der untersuchten Proben auch bei weiteren Proben aus diesen Hols auftritt. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, müssen die

Versuchsbedingungen noch optimiert und weitere Proben analysiert werden. Ergänzend werden neue Primer designt, mit denen die Primerbindungsstellen von CalmEX 4F/5R amplifiziert und anschließend sequenziert werden können. Auf diese Weise kann nachgewiesen werden, ob die schlechte Amplifizierbarkeit tatsächlich durch Polymorphismen in der Bindungsregion der Primer bedingt ist.

A Quellen

- Armannsson, H. et al. (2007).** Distribution and migration of saithe (*Pollachius virens*) around Iceland inferred from mark-recapture studies. ICES Journal of Marine Science 64, 1006-1016.
- Atarhouch, T. et al. (2003).** Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. Bio. Techniques. 35, 676-682.
- Atarhouch, T. et al. (2007).** Genetic population structure of sardine (*Sardina pilchardus*) off Morocco detected with intron polymorphism (EPIC-PCR). Marine Biology 150, 521-528.
- Backhaus, K. et al. (2005).** Multivariate Analysemethoden- Eine anwendungsorientierte Einführung (11te Auflage). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Bärlocher, F. (2008).** Biostatistik (2te Auflage). Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
- Barton, N.H. (2000).** Genetic hitchhiking. Phil.Trans. R. Soc. Lond. B 355, 1553 -1562.
- Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.)(2012a).** Fischbestände online. Fanggebiete für Seelachs. <http://www.fischverband.de/faokarte/>. Stand: 10.10.2012.
- Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.)(2012b).** Fischbestände online http://fischbestaende.portal-fischerei.de/Fischarten/?c=stockgroup&a=detail&sgroup_id=13. Stand: 10.10.2012.
- Barz K. und Zimmermann C. (Hrsg.)(2012c).** Fischbestände online.<http://fischbestaende.portal-fischerei.de/glossar/>. Stand: 10.10.2012.
- Beaumont, A., Boudry, P., Hoare, K. (2010).** Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture (2te Auflage). Wiley-Blackwell, Chichester.
- Berrebi, P. et al. (2006).** Population structure and systematics of *Opsariichthys bidens* (*Osteichthyes: Cyprinidae*) in south-east China using a new molecular marker: the introns (EPIC-PCR). Biological Journal of the Linnean Society 87, 155-166.
- Bierne, N. et al. (2000).** Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR. Molecular Ecology 9, 233–235.
- Brown, B. und Epifanio, J. (2003).** Measurement of Genetic Variation-Nuclear DNA, in: Hallermann, E.M. (Hrsg.). Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda. 101- 123.
- Busch, H.M. und Konrad, R. (2010).** PCR und Real-Time PCR, in: Busch, U. (Hrsg.). Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik- Grundlegende Methoden und Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 35-46.
- Chow, S. (1998).** Universal Primer for Calmodulin Gene Intron in Fish. Fisheries Science. 64(6), 999-1000.
- Chow, S. und Hazama, K. (1998).** Universal PCR primers for S 7 ribosomal protein gene introns in fish. Molecular Ecology 7, 1247-1263.
- Chow, S. und Takeyama, H. (1998).** Intron Length Variation Observed in the Creatine Kinase and Ribosomal Protein Genes of the Swordfish *Xiphias gladius*. Fisheries sciences 64(3), 397-402.

-
- Côrte-Real, H.B.S.M., Dixon, D.R., Holland, P.W.H. (1994).** Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNS polymorphism in bivalve populations. *Marine Biology* 120, 407-413.
- Downs, T.R. und Wilfinger, W.W. (1983).** Fluorimetric Quantification of DNS in Cells and Tissues. *Anal. Biochem.* 131, 538-547.
- EDC (2012a).** Dry Gels Elpho. <http://www.electrophoresis-development-consulting.de/GeneralDryGelElpho.pdf>. Stand: 08.10.2012.
- EDEKA ZENTRALE AG & Co. KG (2012).** Nachhaltigkeit. <http://www.edeka.de/EDEKA/Content/Engagement/Fischerei/Fisch/index.jsp>. Stand: 06.11.12.
- Eiríksson, G.M. (2009).** Mitochondrial DNS sequence variation in saithe, *Pollachius virens*, in the North Atlantic. Workshop on "Thermal adaptation in aquatic ectotherms". DTU Aqua, Denmark. Unveröffentlichte Zusammenfassung.
- Europäische Kommission (2006).** Mitteilung der Kommission an den Rat und das europäische Parlament über die Verwirklichung der Nachhaltigkeit im Fischereisektor der EU mithilfe des Konzepts des höchstmöglichen Dauerertrags. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0360:FIN:DE:PDF>. Stand: 10.10.2012.
- Europäische Union (2002).** Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.
- Europäische Union (2010).** Verordnung (EG) Nr. 1005/2008 des Rates vom 29. September 2008 über ein Gemeinschaftssystem zur Verhinderung, Bekämpfung und Unterbindung der illegalen, nicht gemeldeten und unregulierten Fischerei.
- Excoffier, L. Smouse, P.E. und Quattro, J.M. (1992).** Analysis of Molecular Variance from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131. 479-491.
- Excoffier, L. (2001).** Analysis of Population Subdivision, in: Balding, D.J., Bishop, M., und Cannings, C. (Hrsg.). *Handbook of statistical genetics*. John Wiley & Sons, Chichester. 271-307.
- Excoffier, L., Laval, G. und Balding, D. (2003).** Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Human Genomics* 1(1).7-19.
- Excoffier, L. und Lischer, H. (2011).** Arlequin Ver 3.5 User Manual. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/man/arlequin35.pdf>. Stand: 16.10.2012.
- FAO (2012).** FAO Major Fishing Area 27. http://www.fao.org/fi/figis/area/data/assets/images/faoarea27_1.jpg. Stand: 13.10.2012.
- FAO (2012).** The State of World Fisheries and Aquaculture. <http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>. Stand: 06.11.2012.
- Fedorova, L. und Fedorov, A. (2003).** Introns in Gene Evolution. *Genetica* 118, 123-133.
- Froese, R. und Pauly, D. (Hrsg.) (2011).** *Pollachius virens*. <http://www.fishbase.org/identification/specieslist.php?famcode=183&areacode=&spines=&fns=> Stand: 09.10.2012.
-

-
- Gharrett, A.J. und Zhivotovsky, L.A. (2003).** Population Genetic Processes- Migration, in: Hallermann, E.M. (Hrsg.). Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda. 141-174.
- Graw, J. (2010).** Genetik (5te Auflage). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Hallermann, E.M. (2003).** Population Genetic Processes- Genetic Drift, in: Hallermann, E.M. (Hrsg.). Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda. 197-214.
- Hallermann, E.M. und Epifanio, J. (2003).** Population Genetic Processes- Mutation, in: Hallermann, E.M. (Hrsg.). Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda. 127-139.
- Hallermann, E.M., Brown, B. und Epifanio, J. (2003).** An Overview of Classical and Molecular Genetics, in: Hallermann, E.M. (Hrsg.). Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists. American Fisheries Society, Bethesda. 3-20.
- Hao, F. et al. (2006).** Cloning of Black Carp β - Aktin Gene and Primarily Detecting the Function of Its Promoter Region. Acta Genetica Sinica 33 (2). 133-140.
- Hartl, D.L. und Clark, A.G. (2007).** Principles of Population Genetics (4te Auflage). Sinauer Associates, Sunderland.
- Hassan, M. et al. (2002).** Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. Molecular Ecology Notes 2, 334-340.
- Hermey, G. et al. (2010).** Der Experimentator-Neurowissenschaften. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Homrum, E. i et al. (2012).** Migration of saithe (*Pollachius virens*) in the Northeast Atlantic. Unveröffentlichtes Paper.
- Homrum, E. i (2012a).** The Effects of Climate and Ocean Currents on Faroe Saithe. Ph.D.-Thesis.
- Hudson, R.R., Slatkin, M. und Madison W.P. (1992).** Estimation of Levels of Gene Flow From DNS Sequence Data. Genetics 132. 583-589.
- ICES (2012).** ICES Advice.
<http://www.ices.dk/committe/acom/comwork/report/asp/advice.asp?titlesearch=&Region=-1&Species=33&Period=-1&submit1=Submit+Query&mode=2>. Stand: 09.10.2012.
- ICES (2012a).** Saithe in Division Vb – Advice for 2013.
<http://www.ices.dk/committe/acom/comwork/report/2012/2012/sai-faro.pdf>. Stand: 10.10.2012.
- ICES (2012b).** Saithe in Subareas I and II– Advice for 2013.
<http://www.ices.dk/committe/acom/comwork/report/2012/2012/sai-arct.pdf>. Stand: 11.10.2012.
- ICES (2012c).** Saithe in Division Va– Advice for 2013.
<http://www.ices.dk/committe/acom/comwork/report/2012/2012/sai-icel.pdf>. Stand: 11.10.2012.
-

-
- ICES (2012d).** Saithe in Subarea IV, Division IIIa, and Subarea VI-Advice for 2013. <http://www.ices.dk/committe/acom/comwork/report/2012/2012/sai-3a46.pdf>. Stand:05.11.2012.
- Jakobsen, T. (1981).** Preliminary Results of Saithe Tagging Experiments on the Norwegian Coast 1975-1977. CM 1981/G 35. 25-50.
- Jany, K.-D. und Hahn, H. (1991).** Anfärben von Nucleinsäuren mit Ethidiumbromid, in: Bertram, S. und Gassen, H.G. (Hrsg.). Gentechnische Methoden- Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/Jena/New York, 41-43.
- Koller, M., Schnyder B. und Strehler, E.E. (1990).** Structural organisation of the human CamIII calmodulin gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1087, 180-189.
- Langer, T. (2008).** Enzymbiochemie, in: Munk, K. (Hrsg.). Taschenlehrbuch Biologie - Biochemie - Zellbiologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 166-216.
- Lessa, E.P. (1992).** Rapid Surveying of DNS Sequence Variation in Natural Populations. *Mol. Biol. Evol.* 9 (2), 323-330.
- Mäde, D. (2010).** Molekularbiologische Speziesdifferenzierung, in: Busch (Hrsg.). Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik- Grundlegende Methoden und Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg. 121-139.
- Matís Ltd., (o.J.).** About Matís. <http://www.matis.is/english/about/>. Stand: 08.06.2012.
- Matsuo, K. et al. (1992).** Four synonymous genes encode for calmodulin in teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*); conservation of multigene one-protein principle. *Gene* 119, 279-281.
- MSC (2012).** Fischeinkauf: Nachhaltigkeit als Kaufkriterium gewinnt zunehmend an Bedeutung http://www.msc.org/presseraum/pressemitteilungen/new-research-reveals-increasing-consumer-support-for-the-msc-ecolabel?fromsearch=1&isnewssearch=1&set_language=de. Stand 6.11.2012.
- MSC (2012a).** Fisheries in the MSC-Program. <http://www.msc.org/track-a-fishery/fisheries-by-species/fisheries-by-species#saithe>. Stand: 11.10.2012.
- MSC (2012b).** Über uns. <http://www.msc.org/ueber-uns/ueber-den-msc>. Stand: 08.11.2012.
- MSC (2012d).** MSC-Siegel. <http://www.msc.org/logo-de.gif>. Stand: 08.11.2012.
- Nei, H. und Li, W.-H. (1979).** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Genetics* 76 (10). 5269-5273.
- Olsen, E. et al. (2010).** Cod, haddock, saithe, herring, and capelin in the Barents Sea and adjacent waters: a review of the biological value of the area. *ICES Journal of Marine Science* 67. 87–101.
- Palumbi, S. et al. (2002).** The simple fool's guide to PCR (2te Auflage). University of Hawaii, Honolulu.
- Pöpping, B. und Unterberger, C. (2010).** Extraktion von DNA, in: Busch, U. (Hrsg.) Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik- Grundlegende Methoden und Anwendungen. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 20-34.
- Promega (2012).** PCR Amplification. <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/pcr-amplification/>. Stand: 29.11.2012.
-

-
- Rehbein, H. und Kress, G. (2005).** Detection of Short mRNA Sequences in Fishery Products. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 101 (8), 333-337.
- Rehbein, H. (2009).** DNA-based Methods, in: Rehbein und Oehlenschläger, J. (Hrsg.) Fishery Products – Quality, safety and authenticity. Wiley-Blackwell, Chichester, 363-380.
- Reinsch, H.-H. (1976).** Köhler und Steinköhler. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- Reiss, H. (2009).** Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. Fish and Fisheries 10. 361-395.
- REWE Markt GmbH (2012).** Die Rewe Einkaufspolitik.
<http://www.rewe.de/nachhaltigkeit/listing/MeinFisch/einkaufspolitik.html>. Stand: 06.11.2012.
- Rogers, S.O. und Bendich, A.J. (1985).** Extraction of DNS from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology 5, 69-76.
- Rolland, J.L. et al. (2007).** Population structure of the common sole (*Solea Solea*) in the Northeastern Atlantic and the Mediterranean Sea: revisiting the divide with EPIC markers. Marine Biology 151(1), 327-341.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977).** DNS sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (12).5463-5467.
- Schwarz E-Commerce GmbH & Co. KG (2012).** Nachhaltiger Fischfang.
<http://www.lidl.de/de/Nachhaltiger-Fischfang>. Stand: 06.11.2012.
- Secko, D. (2003).** A MONK'S FLOURISHING GARDEN: THE BASICS OF MOLECULAR BIOLOGY EXPLAINED. DNS-Doppelhelix. <http://www.scq.ubc.ca/wp-content/DNS.gif>. Stand: 09.11.2012.
- Teletchea, F., Maudet, C. und Hänni, C. (2005).** Food and forensic molecular identification: update and challenges. Trends in Biotechnology 23 (7), 359-366.
- Westermeier, R. (2001).** Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNS and Protein Separations (3te Auflage). Wiley-VCH, Weinheim.

B Anhang

B.1 Geräte

Vakuumpzentrifuge: Uni Equip Univapo 100 H

Zentrifuge: Heraeus Biofuge fresco

Thermoblock: eppendorf Thermomixer comfort

Fluorimeter: Jobin Yvon Spectrofluor JY3D

Thermocycler: Sensquest labcycler, Biometra Personal Cycler, Biorad iCycler, MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC 200

Mikrowelle: Siemens

Agarose-Elektrophorese-Kammer: Roth, Biometra, Spannungsquelle: Consort E 132 und EV 231

UV-Bank: BIO RAD Gel Doc XR Imaging System

Flachbett-Elektrophoresekammer: Pharmacia Biotech Multiphor II, Kühlmittel: Natriumazid

Färbeschaukel: Biometra Rocking plattform

Trockenschrank: Herdeus

Brutschrank: Binder

B.2 PC-Programme

Auswertung von Agarose- und Polyacrylamid-Gelen: Quantity one Vers. 4.6.8

Auswertung der Nukleotid-Sequenzen: Hitachi Engineering Co. DNAsis Max Vers. 3.00 und BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.1.3.0

Populationsgenetische Berechnungen: ARLEQUIN Vers. 3.5

Statistische Auswertung, Graphische Darstellung: XLSTAT 2012

B.3 Chemikalien

B.3.1 CTAB

Proteinase K, lyophilisiert, ≥ 30 mAnson, Roth

Chloroform, ≥ 99 %, p.a., Roth

3-Mercapto-1,2-Propanediol, Serva

Isopropanol, 99,9 %, p.a, Roth

Ethanol, 70 %ig, vergällt, Roth

CTAB, ≥ 98 %, für die Biochemie, Roth

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99 %, p.a., Roth

Tris, $\geq 99,9$ %, p.a., Roth

Natriumchlorid, $\geq 99,9$ %, p.a., Roth

Salzsäure, ≥ 32 %, Roth

High Pure PCR Product Purification Kit, Roche

Zusammensetzung der benötigten Puffer:

Puffer 1 A: 1,2 % CTAB, 60mM Tris, 10 mM Na₂-EDTA, 0,8 M NaCl (pH 8)

Puffer 2: 1 % CTAB, 50 mM Tris, 10 mM EDTA (pH 8)

Puffer 3: 1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8)

Puffer 4: 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8)

B.3.2 Hoechst- Test

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99 %, p.a., Roth

Natriumchlorid, $\geq 99,9$ %, p.a., Roth

Triton X-100, rein, Serva

Tris-HCl, p.a., Merck

Bisbenzimidazole (Hoechst 33258), Research Grade, Serva

Ammoniumlösung, 25 %ig, Merck

DNS aus Kalbsthymus, für den Laborgebrauch, Serva

Zusammensetzung der benötigten Puffer:

Testpuffer: 100 mM NaCl, 10 nM EDTA, 10 nM Tris-HCl (pH 7)

Triton-Lösung: 0,2 % Triton X-100 in 1 M NH₄OH

Farbstoff-Stammlösung: 2000 μ g Hoechst 33258/ 1 mL H₂O (Im Dunkeln zu lagern)

Standard-Lösung: 50 μ g/mL DNS aus Kalbsthymus in Puffer 4 (siehe CTAB)

Puffermischung: 0,975 μ L Testpuffer/ 25 μ L Triton-Lösung

Farbstoff-Lösung: 10 mL Testpuffer/ 0,5 μ L Farbstoff-Stammlösung

B.3.3 PCR

Primer: 0,1 nmol/ μ L, Biometra, Nukleotid-Sequenz vgl. Kapitel 8.1

PCR- Kit von Solis BioDyne:

HOT FIREPol® DNA Polymerase: 5U/ μ L in 50% Glycerol, 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA und Stabilisatoren

25 mM MgCl₂-Lösung

dNTP-Mix, 20mM

10x Reaktionspuffer BD: 0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄

B.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose, NEO Ultra-Qualität f.d. DNA/RNA-Elektrophorese, Roth

LD 40-Puffer:

Glycerol, 100%ig, J.T. Baker

Xylencyanol FF, for microscopy, Fluka

Bromphenolblau, wasserlöslich, Fluka

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, \geq 99 %, p.a., Roth

Tris, \geq 99,9 %, p.a., Roth

Borsäure, \geq 99,8 %, p.a., Roth

Zusammensetzung:

40 % Glycerol, 0,05 % Xylencyanol, 0,05 % Bromphenolblau in 1 x TBE-Puffer (54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 3,5 g EDTA, pH 8,3)

100 bp DNA-Leiter, äquimolar, Roth

TAE-Puffer: 2 M Tris, 57,1 mL Eisessig (pH 8); 1:50 verdünnen mit H₂O

Ethidiumbromid, 1 %ige Lösung in Wasser, Roth

B.3.5 Sequenzierung

Big Dye und Puffer 2 ½ x: Bereitgestellt durch UCCH

DyeEx 2.0 Spin Kit ,Qiagen

Calciumchlorid,wasserfrei, p.a., Merck

B.3.6 Klonierung

Reinigung der PCRs:

Exonuklease I und Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas

Ligation:

pGEM®-T Easy Vector System I: pGEM-T Vektor, Control Insert DNA, 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

Transformation:

JM109 High Efficiency Competent Cells, Promega

SOC-Medium:

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, f.d. Mikrobiologie, Merck

Hefeextrakt, granuliert, f.d. Mikrobiologie, Merck

Natriumchlorid, ≥ 99,9 %, p.a., Roth

Kaliumchlorid, p.a., Merck

Magnesiumchlorid, wasserfrei, p.a., Merck

Magnesiumsulfat, p.a., Merck

D (+)-Glucose (Monohydrat), Merck

Zusammensetzung:

10 g Pepton aus Casein, 2,5 g Hefeextrakt, 1 mL 5M NaCl-Lösung, 1,25 mL 1M KCl-Lösung, 5 mL 1M MgCl₂, 5 mL 1M MgSO₄, 10 mL 1M Glucose-Lösung (steril filtriert) ad 500 mL H₂O

Nährböden:

Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, f.d. Mikrobiologie, Merck

Hefeextrakt, granuliert, f.d. Mikrobiologie, Merck

Natriumchlorid, ≥ 99,9 %, p.a., Roth

Bacto Agar, BD

Natriumhydroxid, ≥ 99%ig, p.a., Roth

Ampicillin, Natriumsalz, 99%ig, f.d. Mikrobiologie, Merck

IPTG, Qiagen

X-Gal, GeneON

Zusammensetzung: vgl. Kapitel 7.6.2.

Pipettenspitzen: Biosphere Filter Tips, 0,1-10 µL, sterile, non-pyrogenic, DNA-free, RNase free, ATP-free, Sarstedt

B.3.7 RFLP

Restriktionsendonukleasen: New England Biolabs oder Roche, vgl. 7.6.3

15 %ige Polyacrylamid-Fertiggele: Cleangel, 52 slots, gelcompany

12, 5 %ige Polyacrylamid-Fertiggele: DryGel Elpho, 52 slots, EDC

Tris, ≥ 99,9 %, p.a., Roth

Essigsäure, 100%ig, Merck

Tricine, ≥ 99%ig, Roth

SDS, ≥ 99%ig, ultra pure, für die Elektrophorese, Roth

25 bp-Marker, Promega

100 bp-Marker, äquimolar, Roth

Zusammensetzung der benötigten Puffer:

Tris-Acetat- Puffer: 0,112 mol/L Tris-Acetat, (pH 6, 4)

Elektrodenpuffer: 0,2 mol/L Tris; 0,2 mol/L Tricine; 0,55 % SDS, (pH 8,3)

Silberfärbung:

Benzolsulfonsäure, f.d. Synthese, Merck

Essigsäure, 100%ig, Merck

Silbernitrat, Promega

Natriumcarbonat, ≥99,8 %ig, p.a., wasserfrei, Roth

Glycerol, 87%ig, J.T. Baker

Ethanol, 70 %ig, vergällt, Roth

B.4 Abbildungen und Tabellen

Tabelle 36: Verdünnung der DNS-Extrakte

Laufende Nummer	Region	Verdünnung auf 10 ng/ μ L		
		DNS-Gehalt (ng/ μ L)	Volumen Probe (μ L)	Volumen Puffer 4 (μ L)
1	Nordsee	51,4	10	40
2	Nordsee	57,2	10	45
3	Nordsee	57,3	10	45
4	Nordsee	27,2	20	34
5	Nordsee	75,2	10	65
6	Nordsee	20,0	20	20
7	Nordsee	55,3	10	45
8	Nordsee	52,8	10	42
9	Nordsee	50,2	10	40
10	Nordsee	44,6	10	35
11	Nordsee	47,0	10	35
12	Nordsee	46,4	10	35
13	Nordsee	21,8	20	22
14	Nordsee	64,3	10	54
15	Nordsee	42,2	10	32
16	Nordsee	61,8	10	50
17	Nordsee	48,3	10	38
18	Nordsee	59,6	10	50
19	Nordsee	38,8	10	30
20	Nordsee	38,0	10	30
21	Nordsee	87,7	10	80
22	Nordsee	66,8	10	60
23	Nordsee	105,8	10	90
24	Nordsee	54,6	10	45
25	Nordsee	50,2	10	40
26	Nordsee	42,4	10	32
27	Nordsee	68,8	10	60
28	Nordsee	57,1	10	45
29	Nordsee	58,9	10	48
30	Nordsee	50,5	10	40
31	Ostgrönland	51,2	10	40
32	Ostgrönland	57,3	10	45
33	Ostgrönland	51,2	10	40
34	Ostgrönland	34,5	10	25
35	Ostgrönland	63,8	10	53
36	Ostgrönland	42,7	10	32
37	Ostgrönland	41,0	10	30
38	Ostgrönland	37,8	10	27
39	Ostgrönland	37,4	10	27

Laufende Nummer	Region	Verdünnung auf 10 ng/μL		
		DNS-Gehalt (ng/μL)	Volumen Probe (μL)	Volumen Puffer 4 (μL)
40	Ostgrönland	41,5	10	30
41	Ostgrönland	49,6	10	40
42	Ostgrönland	52,8	10	42
43	Ostgrönland	36,6	10	25
44	Ostgrönland	46,3	10	35
45	Ostgrönland	54,1	10	44
46	Ostgrönland	19,5	20	20
47	Ostgrönland	44,7	10	35
48	Ostgrönland	54,1	10	44
49	Ostgrönland	39,4	10	30
50	Ostgrönland	35,4	10	25
51	Ostgrönland	46,3	10	35
52	Ostgrönland	31,3	10	20
53	Ostgrönland	27,6	20	34
54	Ostgrönland	35,8	10	25
55	Ostgrönland	28,9	10	20
56	Ostgrönland	31,7	10	21
57	Ostgrönland	32,5	10	22
58	Ostgrönland	50,4	10	40
59	Ostgrönland	22,4	20	24
60	Nordost-Arktis	44,6	10	35
61	Nordost-Arktis	54,5	10	44
62	Nordost-Arktis	56,3	10	45
63	Nordost-Arktis	61,1	10	50
64	Nordost-Arktis	70,2	10	60
65	Nordost-Arktis	65,0	10	55
66	Nordost-Arktis	63,0	10	53
67	Island	55,9	10	45
68	Island	57,4	10	45
69	Island	43,9	10	35
70	Island	76,0	10	65
71	Island	27,9	20	34
72	Island	30,4	10	20
73	Island	30,2	10	20
74	Island	68,7	10	60
75	Island	33,6	10	23
76	Island	56,0	10	45
77	Island	30,4	10	20
78	Island	34,1	10	24
79	Island	22,1	10	12
80	Island	34,7	10	25
81	Island	35,6	10	25

Laufende Nummer	Region	Verdünnung auf 10 ng/μL		
		DNS-Gehalt (ng/μL)	Volumen Probe (μL)	Volumen Puffer 4 (μL)
82	Island	16,4	20	12
83	Island	28,8	10	20
84	Island	45,8	10	35
85	Island	24,0	20	30
86	Island	46,7	10	35
87	Island	28,7	10	20
88	Island	56,4	10	45
89	Island	29,7	10	20
90	Island	33,8	10	25
91	Island	72,8	10	60
92	Island	70,2	10	60
93	Island	53,1	10	43
94	Island	18,1	20	16
95	Island	20,2	20	20
96	Island	23,6	20	26
97	Island	17,8	20	16
98	Island	36,5	10	25
99	Island	32,3	20	44
100	Island	27,0	10	17
101	Nordsee	19,4	10	10
102	Nordsee	23,8	20	26
103	Nordsee	78,2	10	72
104	Nordsee	51,9	10	44
105	Nordsee	33,1	10	24
106	Nordsee	44,2	10	35
107	Nordsee	32,2	10	23
108	Nordsee	37,1	10	27
109	Nordsee	81,6	10	70
110	Nordsee	39,0	10	29
111	Nordsee	74,3	10	63
112	Nordsee	79,8	10	69
113	Nordsee	40,8	10	30
114	Nordsee	51,4	10	40
115	Nordsee	46,8	10	35
116	Nordsee	42,5	10	32
117	Nordsee	47,3	10	37
118	Nordsee	56,6	10	45
119	Nordsee	46,4	10	35
120	Nordsee	45,0	10	35
121	Nordsee	72,0	10	60
122	Nordsee	47,2	10	35
123	Nordsee	76,9	10	65

Laufende Nummer	Region	Verdünnung auf 10 ng/μL		
		DNS-Gehalt (ng/μL)	Volumen Probe (μL)	Volumen Puffer 4 (μL)
124	Nordsee	47,6	10	38
125	Nordsee	87,5	10	78
126	Nordsee	39,8	10	30
127	Nordsee	74,8	10	65
128	Nordsee	54,5	10	45
129	Nordsee	46,6	10	35
130	Nordsee	82,8	10	70
131	Nordsee	49,3	10	39
132	Nordost-Arktis	30,6	10	20
133	Nordost-Arktis	46,4	10	35
134	Nordost-Arktis	50,4	10	40
135	Nordost-Arktis	42,0	10	32
136	Nordost-Arktis	73,8	10	63
137	Nordost-Arktis	38,3	10	30
138	Nordost-Arktis	58,8	10	50
139	Nordost-Arktis	44,0	10	35
140	Nordost-Arktis	47,4	10	37
141	Nordost-Arktis	68,7	10	60
142	Nordost-Arktis	49,7	10	40
143	Nordost-Arktis	63,7	10	55
144	Nordost-Arktis	58,5	10	50
145	Nordost-Arktis	66,0	10	55
146	Nordost-Arktis	87,4	10	80
147	Nordost-Arktis	25,2	20	30
148	Nordost-Arktis	54,9	10	45
149	Nordost-Arktis	51,4	10	40
150	Nordost-Arktis	58,4	10	50
151	Nordost-Arktis	72,4	10	62
152	Nordost-Arktis	24,2	20	30
153	Nordost-Arktis	87,0	10	80
154	Nordost-Arktis	65,6	10	55
155	Nordost-Arktis	64,5	10	55
156	Nordost-Arktis	75,8	10	65
157	Nordost-Arktis	95,2	10	85
158	Nordost-Arktis	57,6	10	50
159	Nordost-Arktis	81,2	10	75
160	Nordost-Arktis	66,7	10	60
161	Nordost-Arktis	99,7	10	90

Tabelle 37: Relative Längenverteilung der Seelachse aus der Nordsee Teil 1 (h Rel. =Relative Häufigkeit, h Abs.= Absolute Häufigkeit)

Länge in cm		Eigersundbank		Viking Bank		Fair Isle Bank		Tampen	
Untergrenze	Obergrenze	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.
30	40	2	0,040	6	0,130	0	0,000	2	0,040
40	50	46	0,920	38	0,826	2	0,182	34	0,680
50	60	2	0,040	2	0,043	5	0,455	7	0,140
60	70	0	0,000	0	0,000	2	0,182	6	0,120
70	80	0	0,000	0	0,000	2	0,182	0	0,000
80	90	0	0,000	0	0,000	0	0,000	1	0,020
90	100	0	0,000	0	0,000	0	0,000	0	0,000
100	110	0	0,000	0	0,000	0	0,000	0	0,000

Tabelle 38: Relative Längenverteilung der Seelachse aus der Nordsee Teil 2 (h Rel. =Relative Häufigkeit, h Abs.= Absolute Häufigkeit)

Länge in cm		Eigersund		The Patch		Handelsproben	
Untergrenze	Obergrenze	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.
30	40	0	0,000	0	0,000	0	0,000
40	50	28	0,560	3	0,158	16	0,516
50	60	17	0,340	11	0,579	12	0,387
60	70	4	0,080	5	0,263	3	0,097
70	80	1	0,020	0	0,000	0	0,000
80	90	0	0,000	0	0,000	0	0,000
90	100	0	0,000	0	0,000	0	0,000
100	110	0	0,000	0	0,000	0	0,000

Tabelle 39: Relative Längenverteilung der Seelachse aus Ostgrönland (h Rel. =Relative Häufigkeit, h Abs.= Absolute Häufigkeit)

Länge in cm		Ostgrönland 1		Ostgrönland 2	
Untergrenze	Obergrenze	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.
30	40	0	0,000	0	0,000
40	50	0	0,000	0	0,000
50	60	0	0,071	1	0,071
60	70	0	0,286	4	0,286
70	80	0	0,429	6	0,429
80	90	3	0,214	3	0,214
90	100	7	0,000	0	0,000
100	110	5	0,000	0	0,000

Tabelle 40: Relative Längenverteilung der Seelachse aus der Nordostarkt (h Rel. =Relative Häufigkeit, h Abs.= Absolute Häufigkeit)

Länge in cm		Lofoten		Fuglöybanken		Nordkap	
Untergrenze	Obergrenze	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.	h Abs.	h Rel.
30	40	0	0,000	0	0,000	0	0,000
40	50	8	0,800	9	0,450	0	0,000
50	60	2	0,200	11	0,550	1	0,143
60	70	0	0,000	0	0,000	1	0,143
70	80	0	0,000	0	0,000	2	0,286

80	90	0	0,000	0	0,000	3	0,429
90	100	0	0,000	0	0,000	0	0,000
100	110	0	0,000	0	0,000	0	0,000

Tabelle 41: Relative Längenverteilung der Seelachse aus Island (h Rel. =Relative Häufigkeit, h Abs.= Absolute Häufigkeit)

Länge in cm		Island		
Untergrenze	Obergrenze	h Abs.	h Rel.	
30	40	0	0,000	
40	50	3	0,060	
50	60	29	0,580	
60	70	17	0,340	
70	80	1	0,020	
80	90	0	0,000	
90	100	0	0,000	
100	110	0	0,000	

Tabelle 42: Berechnung der Doppelbande (Act 2F/2R)

Region	Probennummer	Länge der Bande (bp)	
Nordsee		15	901,41
Nordsee		15	864,92
Ostgrönland		51	905,25
Ostgrönland		51	862,80
Nordost-Arktis		62	894,84
Nordost-Arktis		62	864,56
Island		93	887,12
Island		93	846,22
	Mittelwert		897
			860
	Standardabweichung		7,951
			8,983

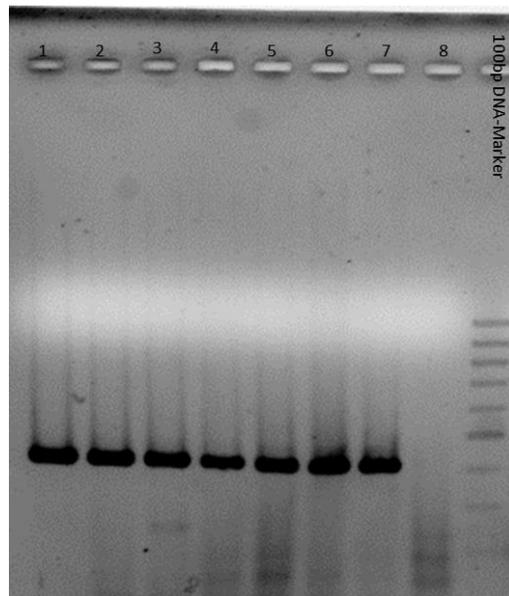


Abbildung 24: PCR-Produkt IFF 232/233 im Agarosegel (2,5%ig), HT= 58 °C (Ethidium Bromid-Färbung) (1-7: Isländischer Seelachs,8: Blindwert)

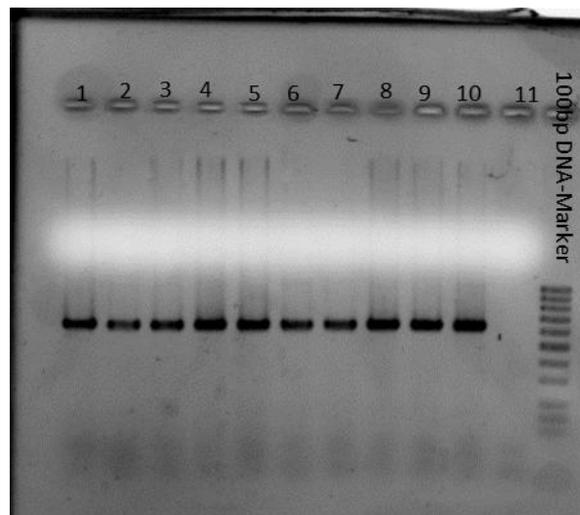


Abbildung 25: PCR-Produkt CALMex 4F/5R im Agarosegel (2,5%ig), HT= 58 °C (Ethidium Bromid-Färbung) (1-10: Isländischer Seelachs,11: Blindwert)

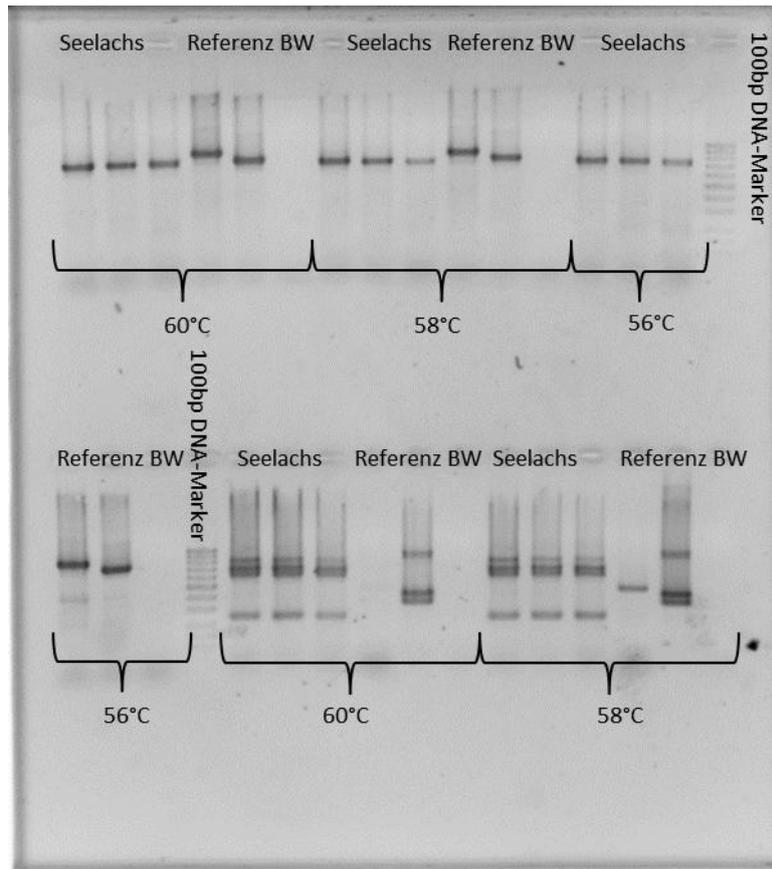


Abbildung 26: PCR-Produkte S7 RPEX 1F/2R (oben) und Aktin 2F/2R (unten) im Agarosegel (2,5%ig) bei unterschiedlichen HT (Ethidium Bromid-Färbung) (Referenzen: S7 RPEX: 1. Ketalachs, 2. Gelbflossenthun; Act 2F/2R: 1. Hechtdorsch, 2. Sardine)

Tabelle 43: Berechnung der Länge des 175bp Restriktionsfragments (HpyCH4IV)

175 bp Bande HpyCH4IV	Mittelwert der errechneten Länge (bp)
Nordsee	178,083
Ostgrönland	172,387
Nordost-Arktis	172,792
Island	171,953
Handelsproben	179,772
Mittelwert	175

Tabelle 44: Berechnung der Länge des 295 bp Restriktionsfragments (HpyCH4IV)

295 bp Bande HpyCH4IV	Mittelwert der errechneten Länge (bp)
Nordsee	294,343
Ostgrönland	293,209
Nordost-Arktis	292,551
Island	299,558
Handelsproben	294,712
Mittelwert	295

Tabelle 45: Aus Haplotypen (ELB-Algorithmus) rekonstruierte Genotypen (Calmodulin-Marker)

Probennummer	Region	Calmodulin-Marker					
		Haplotyp 1			Haplotyp 2		
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32
1	Nordsee	G	G	G	T	A	A
2	Nordsee	G	G	G	T	A	A
3	Nordsee	G	G	G	T	A	A
4	Nordsee	G	G	G	G	G	G
5	Nordsee	G	G	G	T	A	A
6	Nordsee	T	A	A	T	A	A
7	Nordsee	T	A	A	T	G	A
8	Nordsee	T	A	A	T	A	A
9	Nordsee	G	G	G	G	G	G
10	Nordsee	T	A	A	T	G	A
11	Nordsee	G	G	G	T	A	A
12	Nordsee	G	G	G	T	A	A
13	Nordsee	G	G	G	T	A	A
14	Nordsee	G	G	G	G	G	G
15	Nordsee	G	G	G	G	G	G
17	Nordsee	G	G	G	T	A	A
19	Nordsee	G	G	G	T	A	A
21	Nordsee	T	A	A	T	A	A
22	Nordsee	G	G	G	T	A	A
23	Nordsee	G	G	G	T	G	A
24	Nordsee	G	G	G	G	G	G
25	Nordsee	G	G	G	T	A	A
26	Nordsee	G	G	G	T	A	A
27	Nordsee	G	G	G	T	A	A
28	Nordsee	T	A	A	T	A	A
29	Nordsee	G	G	G	G	G	G
30	Nordsee	T	A	A	G	G	A
1111	Nordsee	G	G	G	G	G	G
1114	Nordsee	T	A	A	T	A	A
31	Ostgrönland	T	A	A	G	G	A
34	Ostgrönland	T	A	A	T	G	A
35	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
40	Ostgrönland	G	G	G	T	A	A
41	Ostgrönland	G	G	G	T	A	A
42	Ostgrönland	G	G	G	T	G	A
43	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
44	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
45	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G

		Calmodulin-Marker					
Probenummer	Region	Haplotyp 1			Haplotyp 2		
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32
46	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
47	Ostgrönland	G	G	G	T	A	A
48	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
49	Ostgrönland	G	G	G	T	G	A
50	Ostgrönland	T	A	A	T	G	A
51	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
52	Ostgrönland	G	G	G	T	A	A
53	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
54	Ostgrönland	T	A	A	T	G	A
55	Ostgrönland	T	A	A	G	G	A
56	Ostgrönland	G	G	G	T	G	A
57	Ostgrönland	G	G	G	G	G	G
58	Ostgrönland	G	G	G	T	A	A
59	Ostgrönland	T	A	A	T	A	A
60	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
61	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
62	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
63	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
64	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
65	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
66	Nordost-Arktis	G	G	A	T	G	A
132	Nordost-Arktis	T	G	A	T	G	A
135	Nordost-Arktis	G	G	G	T	G	G
136	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
137	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
138	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
140	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
143	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
144	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
145	Nordost-Arktis	G	G	G	T	G	A
146	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
148	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
149	Nordost-Arktis	T	A	A	T	A	A
150	Nordost-Arktis	T	A	A	T	A	A
151	Nordost-Arktis	T	A	A	G	G	A
152	Nordost-Arktis	G	G	A	T	G	A
153	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
154	Nordost-Arktis	G	G	G	G	G	G
156	Nordost-Arktis	G	G	A	T	G	A
157	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A

		Calmodulin-Marker					
Probenummer	Region	Haplotyp 1			Haplotyp 2		
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32
160	Nordost-Arktis	T	A	A	T	A	A
161	Nordost-Arktis	G	G	G	T	A	A
67	Island	G	G	G	T	G	A
68	Island	G	G	G	G	G	G
69	Island	T	A	A	G	G	A
70	Island	G	G	G	G	G	G
71	Island	G	G	G	T	A	A
72	Island	T	A	A	T	G	A
73	Island	G	G	G	G	G	G
74	Island	G	G	G	T	A	A
75	Island	T	A	A	G	G	A
76	Island	G	G	G	G	G	G
77	Island	T	A	A	G	G	A
78	Island	G	G	G	G	G	G
79	Island	G	G	G	G	G	G
80	Island	G	G	G	T	A	A
81	Island	G	G	G	T	A	A
82	Island	T	A	A	T	A	A
83	Island	G	G	G	T	A	A
84	Island	G	G	G	T	A	A
85	Island	T	A	A	T	G	A
88	Island	G	G	G	T	A	A
89	Island	G	G	G	T	A	A
90	Island	G	G	G	T	A	A
92	Island	G	G	G	G	G	G
93	Island	G	G	G	G	G	G
94	Island	T	A	A	T	G	A
96	Island	G	G	G	T	A	A
97	Island	T	A	A	T	A	A
99	Island	G	G	G	G	G	G
100	Island	G	G	G	G	G	G
1404	Island	G	G	G	T	A	A
101	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
102	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
103	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
104	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
105	Handelsproben	T	A	A	T	A	A
106	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
107	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
108	Handelsproben	T	A	A	G	G	A

		Calmodulin-Marker					
Probenummer	Region	Haplotyp 1			Haplotyp 2		
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32
109	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
110	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
111	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
112	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
113	Handelsproben	T	A	A	T	A	A
114	Handelsproben	T	A	A	T	A	A
115	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
116	Handelsproben	T	A	A	T	A	A
117	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
118	Handelsproben	T	A	A	T	G	A
119	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
120	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
122	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
123	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
124	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
125	Handelsproben	T	A	A	T	G	A
126	Handelsproben	G	G	G	G	G	G
127	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
128	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
130	Handelsproben	G	G	G	T	A	A
131	Handelsproben	G	G	G	T	A	A

Tabelle 46: Codierungstabelle Genotypen (Diskriminanzanalyse)

	A	G	T
TGA	1		1
GGG	0		1
TAA	1		0
GGA	1		1
TGG	0		1

Tabelle 47: Binär codierte Rohdatentabelle für alle Marker

Probe- nummer	Region	Calmodulin-Marker						Aktin-Marker						
		Haplotyp 1			Haplotyp 2			HpyCH4IV			Taq alpha I			Unge- schnitten
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32	175 bp	300 bp	373 bp	113 bp	322 bp	433 bp	
1	Nordsee	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
2	Nordsee	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
3	Nordsee	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
4	Nordsee	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
5	Nordsee	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
6	Nordsee	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
7	Nordsee	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
8	Nordsee	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
9	Nordsee	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
10	Nordsee	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
11	Nordsee	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
12	Nordsee	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
13	Nordsee	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
14	Nordsee	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
15	Nordsee	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
16	Nordsee							0	0	1	0	0	1	0
17	Nordsee	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1
18	Nordsee							0	0	1	1	1	0	0
19	Nordsee	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
20	Nordsee							0	1	1	1	0	1	0
21	Nordsee	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
22	Nordsee	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
23	Nordsee	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
24	Nordsee	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
25	Nordsee	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
26	Nordsee	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
27	Nordsee	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
28	Nordsee	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
29	Nordsee	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
30	Nordsee	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
1111	Nordsee	0	1	0	0	1	0							
1114	Nordsee	1	0	1	1	0	1							
31	Ostgrönland	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
32	Ostgrönland							1	0	0	1	0	0	0
33	Ostgrönland							0	1	1	1	1	1	0
34	Ostgrönland	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
35	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1

Probe- nummer	Region	Calmodulin-Marker						Aktin-Marker						
		Haplotyp 1			Haplotyp 2			HpyCH4IV			Taq alpha I			Unge- schnitten
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32	175 bp	300 bp	373 bp	113 bp	322 bp	433 bp	
36	Ostgrönland							1	0	1	1	1	0	0
37	Ostgrönland							1	0	1	1	1	0	0
38	Ostgrönland							1	1	1	0	0	1	0
39	Ostgrönland							1	1	1	0	1	0	1
40	Ostgrönland	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1
41	Ostgrönland	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
42	Ostgrönland	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
43	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	1	1	1				0
44	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
45	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
46	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
47	Ostgrönland	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
48	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1
49	Ostgrönland	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
50	Ostgrönland	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
51	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
52	Ostgrönland	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
53	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1
54	Ostgrönland	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
55	Ostgrönland	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0
56	Ostgrönland	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0
57	Ostgrönland	0	1	0	0	1	0				1	0	1	1
58	Ostgrönland	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
59	Ostgrönland	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
60	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
61	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
62	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
63	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
64	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
65	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
66	Nordost- Arktis	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
132	Nordost- Arktis	1	1	1	1	1	1				1	1	1	0

Probe- nummer	Region	Calmodulin-Marker						Aktin-Marker						
		Haplotyp 1			Haplotyp 2			HpyCH4IV			Taq alpha I			Unge- schnitten
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32	175 bp	300 bp	373 bp	113 bp	322 bp	433 bp	
133	Nordost- Arktis										0	1	1	0
134	Nordost- Arktis										0	1	0	0
135	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	1				1	1	1	0
136	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
137	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
138	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
139	Nordost- Arktis							1	1	1	0	1	1	0
140	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
141	Nordost- Arktis							0	1	1	0	1	1	0
142	Nordost- Arktis										0	0	1	0
143	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1				0	1	1	0
144	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
145	Nordost- Arktis	0	1	0	1	1	1				0	1	1	0
146	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
148	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
149	Nordost- Arktis	1	0	1	1	0	1				0	1	1	0
150	Nordost- Arktis	1	0	1	1	0	1				0	1	1	0
151	Nordost- Arktis	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
152	Nordost- Arktis	1	1	0	1	1	1							0
153	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
154	Nordost- Arktis	0	1	0	0	1	0				0	1	1	0
156	Nordost-	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0

Probe- nummer	Region	Calmodulin-Marker						Aktin-Marker						
		Haplotyp 1			Haplotyp 2			HpyCH4IV			Taq alpha I			Unge- schnitten
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32	175 bp	300 bp	373 bp	113 bp	322 bp	433 bp	
	Arktis													
157	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1				0
158	Nordost- Arktis							1	1	1				0
159	Nordost- Arktis							1	1	1				1
160	Nordost- Arktis	1	0	1	1	0	1	1	1	1				0
161	Nordost- Arktis	0	1	0	1	0	1	1	1	1				0
67	Island	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
68	Island	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
69	Island	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
70	Island	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
71	Island	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
72	Island	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
73	Island	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
74	Island	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
75	Island	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
76	Island	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
77	Island	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0
78	Island	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
79	Island	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
80	Island	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
81	Island	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
82	Island	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
83	Island	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
84	Island	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
85	Island	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
86	Island							1	1	1	1	1	1	0
87	Island							1	0	1	1	1	0	0
88	Island	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
89	Island	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
90	Island	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
91	Island										0	0	1	1
92	Island	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
93	Island	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
94	Island	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
96	Island	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0

Probe- nummer	Region	Calmodulin-Marker						Aktin-Marker						
		Haplotyp 1			Haplotyp 2			HpyCH4IV			Taq alpha I			Unge- schnitten
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32	175 bp	300 bp	373 bp	113 bp	322 bp	433 bp	Doppel- bande
97	Island	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	
98	Island						0	1	1	0	0	1	0	
99	Island	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
100	Island	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
1404	Island	0	1	0	1	0	1							
101	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
102	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
103	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
104	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
105	Handels- proben	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
106	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
107	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
108	Handels- proben	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0
109	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1
110	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1
111	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
112	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
113	Handels- proben	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
114	Handels- proben	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0
115	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0
116	Handels- proben	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
117	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
118	Handels- proben	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
119	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0

Probe- nummer	Region	Calmodulin-Marker						Aktin-Marker						
		Haplotyp 1			Haplotyp 2			HpyCH4IV			Taq alpha I			Unge- schnitten
		Locus 11	Locus 21	Locus 31	Locus 12	Locus 22	Locus 32	175 bp	300 bp	373 bp	113 bp	322 bp	433 bp	Doppel- bande
120	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0
121	Handels- proben							1	1	1	0	0	1	0
122	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0
123	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
124	Handels- proben	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
125	Handels- proben	1	0	1	1	1	1	1			0	1	1	0
126	Handels- proben	0	1	0	0	1	0				0	0	1	0
127	Handels- proben	0	1	0	1	0	1				0	0	1	0
128	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0
129	Handels- proben							1	1	1	0	1	1	0
130	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1
131	Handels- proben	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0

B.5 Daten-CD

B.5.1 RFLP Actin

B.5.2 Sequenzierung Calmodulin

B.5.3 Länge der untersuchten Seelachse