Populationsgenetische Untersuchungen an hessischen Populationen von *Cypripedium calceolus* [1]

Andreas Opitz, Christina M. Müller, Birgit Gemeinholzer & Volker Wissemann

Zusammenfassung: 34 hessische Populationen von *Cypripedium calceolus* wurden populationsgenetisch untersucht, um neue Erkenntnisse zur genetischen Differenzierung im Verbreitungsgebiet zu erlangen und um wissenschaftsbasierte Aussagemöglichkeiten zur Populationsstärkung von *C. calceolus* in Hessen zu geben.

Zur populationsgenetischen Analyse wurden ISSR und AFLP verwendet, was in 60 beziehungsweise 810 auswertbaren Merkmalen resultierte, die für die weitere statistische Analyse herangezogen wurden. Beide molekulare Methoden resultierten in ähnlichen populationsspezifischen Diversitätswerten. Es konnte mit beiden Methoden eine kleine genetische Differenzierung zwischen den untersuchten Regionen von Proben aus den drei Bundesländern Hessen, Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern festgestellt werden. Die ISSR-Daten wiesen auf Populationsebene eine große genetische Differenzierung auf (AMOVA), während die genetische Differenzierung zwischen den verschiedenen Regionen (Nord-, Nordost-, Ost-Hessen, Thüringen und Rügen) gering ist. Der Manteltest ergab keine Korrelation zwischen der genetischen und der geografischen Distanz und weder die PCoA noch die Structure-Analyse ließen signifikante populationsgenetische Strukturen erkennen.

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

Population genetics of *Cypripedium calceolus* in Hesse

Summary: The population genetics of 34 *Cypripedium calceolus* populations in Hesse were investigated to gain new insight into genetic differentiation between these populations and to provide scientific evidence for predicting the effects of stabilising Hessian populations of C. calceolus.

ISSR and AFLP were used to analyse population genetics, yielding 60 and 810 markers, respectively, that could be used for statistic evaluation. Both molecular methods yielded similar population-specific diversity values. The genetic differentiation between populations in Hesse, Thuringia and Mecklenburg-Western Pomerania was low according to both methods. At the population level, the ISSR data revealed a high degree of genetic differentiation in individual populations (AMOVA), while the genetic differentiation between regions was low. The Mantel test showed no correlation between genetic and geographic distance, and neither PCoA nor a structure analysis revealed significant differences in population genetics.

[1] Kurzfassung einer Dissertation an der Universität Gießen. Die vollständige Arbeit ist unter http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/12491/ verfügbar.

Stabilization measures for populations of *C. calceolus* have been controversial in Hesse and other states for some time because few data existed on the genetic diversity of this species. Our results demonstrate that populations of *C. calceolus* are genetically similar across Hesse, and therefore populations from other parts of Hesse can be used for stabilization measures within Hesse.

Andreas Opitz, Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie (HLNUG), Abteilung Naturschutz, Europastraße 10, 35394 Gießen; Andreas.Opitz@hlnug.hessen.de
Christina M. Müller, Justus-Liebig-Universität, AG Spezielle Botanik, Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Gießen; Christina. M. Mueller@bot1.bio.uni-giessen.de
Birgit Gemeinholzer, Justus-Liebig-Universität, AG Spezielle Botanik, Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Gießen; Birgit.Gemeinholzer@bot1.bio.uni-giessen.de
Volker Wissemann, Justus-Liebig-Universität, AG Spezielle Botanik, Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Gießen; Volker.Wissemann@bot1.bio.uni-giessen.de

1. Einleitung

Zu den bekanntesten und aufsehenerregendsten Orchideen in Europa gehört der Frauenschuh (*Cypripedium calceolus*). Als großblütige und auffällige Art hat der Frauenschuh schon früh Aufmerksamkeit bei botanisch Interessierten geweckt und steht oft als populäre Art stellvertretend für alle Orchideen im Fokus der Öffentlichkeit (Heinrich & al. 2014).

Der Frauenschuh (Abbildung 1) ist langlebig und hat einen komplexen Lebenszyklus. Die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt etwa 100 Jahre (Kull 1988 & 1999), nach Modellrechnungen von Nicole & al. (2005) kann *C. calceolus* sogar eine Lebenserwartung von 110 bis 350 Jahren erreichen. Der Lebenszyklus beziehungsweise die Lebensdauer der indigenen Art ist plurienn-pollakanth, das heißt sie blüht und fruchtet mehrmals in ihrem Leben. Neben der außergewöhnlichen Lebensdauer zeigt sich beim Frauenschuh auch eine Besonderheit bei der Samenkeimung. Die Samen des Frauenschuhs benötigen für die Keimung einen Mykorrhiza-Pilz, um die feste Testa zu durchdringen. Der Pilz, der mit *C. calceolus* eine Symbiose eingeht, wird in die Gattung *Rhizoctonia* eingeordnet (Shefferson & al. 2005b). Durch die geringe Samengröße von Orchideen können zum einen große Mengen an Samen in einer Kapsel produziert werden, zum anderen können sich die Samen durch das damit verbundene geringe Gewicht mit dem Wind von wenigen Metern (Jacquemyn & al. 2007) bis zu 10 km (Fay & al. 2009) oder sogar bis zu 2 000 km (Arditti & Ghani 2000) weit ausbreiten.

Nach der Keimung erfolgt die Bildung eines Protokorms. Dabei ist das Protokorm vollkommen von der Versorgung des Pilzes durch mineralische Nährsalze, Kohlenhydrate und Kohlenstoffe abhängig. Erst wenn die ersten Blätter des Protokorms gebildet werden, kann die Pflanze den Pilz versorgen. Nach neuesten Erkenntnissen wird *C. calceolus* nicht mehr als „autotroph“ (Fuchs & Ziegenspeck 1926) sondern als „partiell mykoheterotroph“ eingeordnet, weil anhand von Isotopenanalysen nachgewiesen wurde, dass der Pilz den



Abb. 1: Blüte von *Cypripedium calceolus*, Mai 2013 in Nordost-Hessen; Andreas Opitz. – Inflorescence of *Cypripedium calceolus*, May 2013 in north-east Hesse.

Frauenschuh auch im höheren Alter (und nicht nur bei der Keimung) mit organischen Substanzen versorgt (Gebauer & al. 2016). Das Erscheinen des ersten Blattes aus diesem Protokorm zeigt sich nach mehreren Protokormstadien meist nach circa drei bis vier Jahren (Kull 1998, Nicole & al. 2005, Brunzel 2010). Hierbei bildet der Keimling des Frauenschuhs im Verlauf der Jahre ein Rhizom aus und gehört daher zu den Geophyten (Kull 1999). Das Rhizom verläuft circa 10 cm tief horizontal im Boden und beginnt nach circa 20 Jahren am älteren Ende abzusterben (Kull & Kull 1991). Nach 6–10 Jahren entstehen die ersten Blüten (Kull 1995). Zur Blütezeit von Mai bis Juni (Jäger 2011) können an einem Trieb eine bis zwei (bei sehr guten Habitatbedingungen auch drei) Blüten ausgebildet werden. Unter guten Bedingungen können Rhizome bis zu 40 Blütentriebe ausbilden. Die Blüten des Frauenschuhs besitzen keinen Nektar zum Anlocken der Insekten (Cozzolino & Widmer 2005), sie sind Täuschblumen (Jagel & Margenburg 2011). Die Bestäuber werden durch die auffällige Gestalt der Blüte angelockt. Durch vielfältige Nachweise bestätigt (Daumann 1968, Müller 1873, Nilsson 1979, Kull 1998, Antonelli & al. 2009, Grell 2010, Pemberton 2013), gehören die Sand- oder Erdbienen (*Andrena* spec.) zu den häufigsten Besuchern der Blüten.

Neben der generativen Vermehrung verbreitet sich der Frauenschuh zusätzlich vegetativ durch klonales Wachstum (Daumann 1968, Heinrich & Lorenz 1996, Kull 1998, Nicole & al. 2005). Als Geophyt bildet *C. calceolus* ein unterirdisches Rhizom aus. Durch jährliches Wachstum des unterirdischen Rhizoms entstehen weitere oberirdische Sprosse beziehungsweise Triebe (Rameten) (Kull 1999), welche sich genetisch von der Mutterpflanze (Genet) nicht unterscheiden. Kull (1999) beschreibt, dass durchschnittlich 4,9 Jahre benötigt werden, damit an einem Rhizom eine neue Verzweigung entsteht. Durch das unterirdische Rhizom ist der Frauenschuh in der Lage ungünstige Umweltbedingungen wie Beschattung oder Blattfraß kurzfristig zu überdauern, indem in manchen Jahren kein Austrieb von Sprossen erfolgt (van Groenendael & al. 1996, Shefferson & al. 2005a). Der Genet mit seinen Rameten wird als Stock beziehungsweise Horst bezeichnet (Lohr 2013).

In Deutschland sind die Hauptwuchsorte des Frauenschuhs Bayern, Baden-Württemberg, Thüringen, Niedersachsen und Hessen, wobei sie in westlicher Richtung Randgebiete des gesamten Verbreitungsareals darstellen. Einzelne Populationen kommen laut BfN & BMUB (2013) noch in Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt, Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz vor.

Abbildung 2 zeigt die Verbreitung von *C. calceolus* in Hessen bis 2013 (Barth & Opitz 2014). Aus dieser Verbreitungskarte ist ersichtlich, dass der Frauenschuh in Hessen vor 1990 nicht nur im Norden und Osten Hessens in zahlreichen Populationen vorkam, sondern auch in anderen Kalkgebieten im Süden und Westen Hessens. Ein deutlicher und dramatischer Rückgang ist in der Zeitspanne von 1990–2007 zu erkennen, das hessische Hauptverbreitungsgebiet liegt nunmehr im Norden und Osten des Landes. Im Westen von Hessen sind nur noch drei Vorkommen des Frauenschuhs vorhanden. Der dramatische Rückgang setzt sich in der Zeitspanne von 2008–2013 fort. Im Hauptverbreitungsgebiet hat sich die Anzahl der Vorkommen halbiert und im südlichen und westlichen Teil Hessens sind alle Vorkommen erloschen. Aufgrund der schlechten Situation von *C. calceolus* in Hessen startete ein Artenhilfskonzept für den Frauenschuh in Hessen (Barth 2007). Dank dieses Artenhilfskonzepts und der Beteiligung von ehrenamtlichen Botanikerinnen und Botanikern konnten Daten zu neuen Frauenschuhgebieten gewonnen werden; die Situation des Frauenschuhs in Hessen ist jedoch nach wie vor bedenklich.

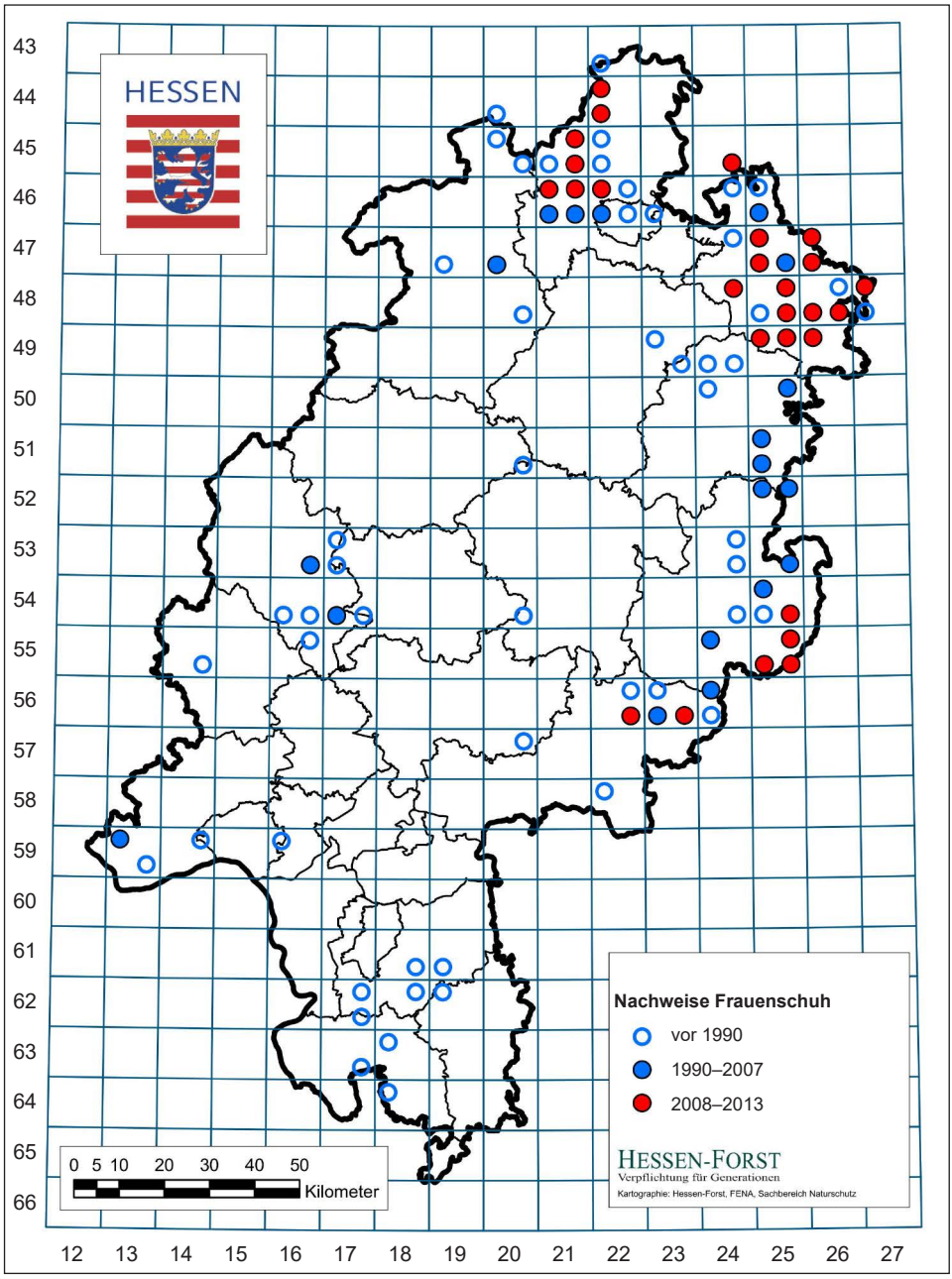


Abb. 2: Verbreitung von *Cypripedium calceolus* in Hessen aus den Jahren vor 1990–2013 (Barth & Opitz 2014). – Distribution of *Cypripedium calceolus* in Hesse from before 1990–2013.

Die Monokotyle *C. calceolus* ist nicht nur durch ihr äußeres Erscheinungsbild, sondern auch durch das relativ große Genom eine interessante Pflanze. Die Chromosomenzahl beträgt 2n = 20, der DNA-Gehalt für den haploiden Chromosomensatz 32,4 pg (Bennett & al. 2000; Cribb 1997).

Ergebnisse von Datenauswertungen aus genetischen Untersuchungen von *C. calceolus* enden oft mit dem Fazit, dass verschiedene genetische Fingerabdruck-Techniken wie RAPD, AFLP (Vos & al. 1995) und SSR verwendet wurden (McGregor & al. 2000), aber die Ergebnisse nicht ausreichend Informationen boten. Leitch & al. (2009) schrieb: "… in *C. calceolus* … the AFLP traces were uninformative, giving just a few strongly amplifying bands with no variation, not only between individuals of different populations, but also when compared with other species *of Cypripedium* such as *C. macranthos*."

Auch Fay & al. (2005) berichten, dass sie beim großen Genom des Frauenschuhs gescheitert sind, eine hohe Qualität an Banden mit Hilfe der AFLP-Methode zu erhalten. Nach weiteren Bemühungen resumieren Fay & al. (2009): "When the standard AFLP protocol is used with genomes as large as that in *C. calceolus*, levels of genetic variation are dramatically underestimated".

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

Die Populationen des Frauenschuhs gehen in ganz Europa stark zurück. Es gab nach Informationen vom HLNUG (Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie) mehrere Anstrengungen für Populationsstärkungen und Wiederansiedlungen des Frauenschuhs 2009 und 2011 in Hessen, 2002 in Nordrhein-Westfalen (Klingenstein & al. 2002) sowie 2006–2009 Aussaatexperimente in Hessen, Thüringen und Bayern (Brunzel 2010). Dennoch gibt es selten Erfolge zu verzeichnen. Zum einen liegt dies an biologischen Besonderheiten wie dem schwierigen Lebenszyklus, den speziellen Keimungsbedingungen unter Beteiligung einer Mykorrhiza und der besonderen Bodenansprüche. Zum anderen besteht auch Unsicherheit darüber, welches Saatgut für welche Gebiete geeignet ist. Diese Arbeit untersucht unter anderem unter Anwendung der molekularen Methoden ISSR und AFLP die Frage der genetischen Diversität hessischer Populationen und ob genetische Differenzierungen zu Populationen in Thüringen und auf Rügen existieren. Resultierend aus diesen beiden Fragestellungen wird eine naturschutzfachliche Empfehlung gegeben.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial und DNA-Extraktion

Im Auftrag des Sachbereichs Naturschutz des Servicezentrums Forsteinrichtung und Naturschutz (FENA) von Hessen-Forst (heute: HLNUG Abteilung Naturschutz) wurde 2013 das Gutachten „Landesmonitoring 2013 des Frauenschuhs (*C. calceolus*) in Hessen (Art

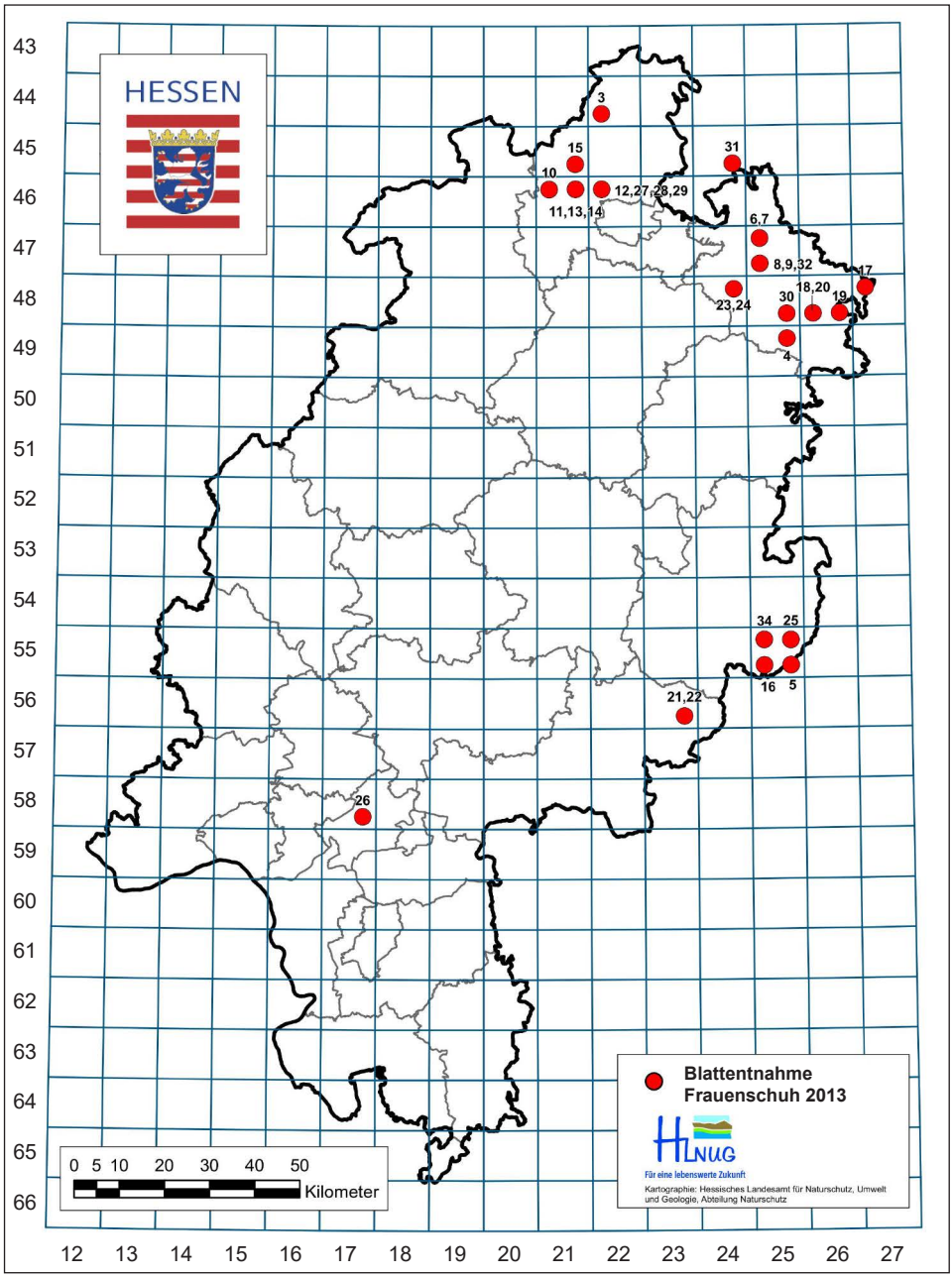


Abb. 3: Lage der Populationen von *Cypripedium calceolus* mit Blatt- und Samenentnahme in Hessen (HLNUG). Population 26 bezieht sich auf eine Pflanze im Botanischen Garten Frankfurt. – Location of *Cypripedium calceolus* populations used for the extraction of leaves and seeds in Hesse. Population 26 refers to a plant in the Botanical Garden in Frankfurt/Main.

des Anhangs II und IV der FFH-Richtlinie)“ in Auftrag gegeben. Das Gutachten (Barth & Ploß 2014) untersuchte die 46 bekannten hessischen Populationen. Im Zuge der Begutachtung aller hessischen Populationen konnte in enger Zusammenarbeit mit Uwe Barth das benötigte Pflanzenmaterial sowie Samen gesammelt werden. Es wurden dazu alle benötigten Genehmigungen eingeholt. Abbildung 3 zeigt die Lage der 34 Populationen von *C. calceolus* mit Blatt- und Samenentnahme in Hessen.

Aus dem zerkleinerten Blattmaterial wurde die DNA mittels Extraktion standardgemäß mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) mit leichten Veränderungen (Müller & al. 2016) gewonnen.

2.2. ISSR-Methode (Inter Simple Sequence Repeats)

Diese Methode wurde gewählt, weil nach Sharma & al. (2013) die ISSR-Methode an den Orchideen *Cymbidium aloifolium* und *C. tigrinum* erfolgreich war und akzeptable Ergebnisse erbrachte. Für die ISSR Methode wurde das Protokoll nach Dogan & al. (2010) leicht verändert. Es wurden 19 Primer (Tabelle 1) getestet und für die Optimierungen der Protokolle verwendet. Dabei haben die Primer ISSR-12, I-845, I-852, ISSR-09 und ISSR-10 (Sharma & al. 2013) die besten Ergebnisse geliefert.

Tab. 1: Verwendete ISSR-Primer mit Ihren Sequenzen nach Sharma & al. (2013) sowie Dogan & al. (2010) (V = Adenin, Cytosin oder Guanin; H = Adenin, Cytosin oder Thymin). – ISSR Primer used, with sequences according to Sharma & al. (2013) and Dogan & al. (2010) (V = adenine, cytosine or guanine; H = adenine, cytosine or thymine).

Primer	Sequenz (5′–3′)	Referenz
I-27	ACA CAC ACA CAC ACA CG	Sharma & al. (2013)
I-35	AGA GAG AGA GAG AGA GTC	Sharma & al. (2013)
I-845	CTC TCT CTC TCT CTC TGG	Sharma & al. (2013)
I-852	TCT CTC TCT CTC TCT CAA	Sharma & al. (2013)
ISSR-04	TGT GTG TGT GTG TGT GA	Sharma & al. (2013)
ISSR-05	VHV CTC TCT CTC TCT CTC T	Dogan & al. (2010)
ISSR-09	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	Sharma & al. (2013)
ISSR-10	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA	Sharma & al. (2013)
ISSR-12	CAT GGT GTT CAT CAT TGT TCC A	Sharma & al. (2013)
ISSR-4	GAC AGA CAG ACA	Dogan & al. (2010)
ISSR-F1	GAG CAA CAA CAA CAA CAA	Dogan & al. (2010)
ISSR-F2	CTC GTG TGT GTG TGT GTG T	Dogan & al. (2010)
ISSR-F5	AGA GAG AGA GAG AGA G	Dogan & al. (2010)
ISSR-F6	CCA CCA CCA CCA CCA	Dogan & al. (2010)
ISSR-F7	ACA CAC ACA CAC ACA C	Dogan & al. (2010)
ISSR-M8	ACA CAC ACA CAC ACA CAC G	Dogan & al. (2010)
ISSR-M12	GAC ACG ACA CGA CAC GAC AC	Dogan & al. (2010)
ISSR-M15	CAC ACA CAC ACA CAC AAG	Dogan & al. (2010)
ISSR-N2	GTG GTG GTG GTG GTG	Dogan & al. (2010)

2.3. AFLP-Methode (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Diese Methode wurde gewählt, weil nach Xin & al. (2013) die AFLP-Methode an Populationen von *Cypripedium japonicum* erfolgreich war. Für die Durchführung wurde als Grundlage das Protokoll von Vos & al. (1995) verwendet. Es wurden 12 Primer, die in Tabelle 2 aufgelistet sind, getestet und optimiert. Dabei haben die vier Primer preNot1 und E03 (prePCR) und selNot1 und E78 (selPCR) in Verbindung mit den Restriktionsenzymen Not1 und Eco RI (Restriktion) und den Primeradaptern Not1+ und EA +/− (Ligation) die besten Ergebnisse geliefert.

Tab. 2: Verwendete Restriktionsenzyme mit ihren Schnittstellen oder Sequenzen nach Vos & al. (1995) und teilweise verändert nach Xin & al. (2013). – Restriction enzymes used, with cutting points or sequences according to Vos & al. (1995) and partially modified according to Xin & al. (2013).

Name		Schnittstellen bzw. Sequenz (5′ - 3′)	Referenz
Eco RI	Restriktionsenzym	5‘...G↓A A T T C...3‘	Vos & al. (1995)
		3‘...C T T A A↑G...5‘	
Not1	Restriktionsenzym	5‘...G C↓G G C C G C...3‘	New England BioLabs GmbH
		3‘...C G C C G G↑C G...5‘	
Not1+	Primeradapter	GGC CCT CAG GAC TCA T	metabion international AG
EA+/− (Eco +/−)	Primeradapter	(Eco-) 5‘ - AATTGGTACGCAGTCTAC - 3‘	metabion international AG
		(Eco+) 5‘ - CTCGTAGACTGCGTACC - 3‘	
E03	Primer	GAC TGC GTA CCA ATT CG	verändert nach Xin & al. (2013)
E78 (FAM)	Primer	GAC TGC GTA CCA ATT CGT T	verändert nach Xin & al. (2013)
M03	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AG	Vos & al. (1995)
M67	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC A	Xin & al. (2013)
M67+A	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC AA	verändert nach Xin & al. (2013)
M67+T	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC AT	verändert nach Xin & al. (2013)
M70	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC T	Xin & al. (2013)
M70+A	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC TA	verändert nach Xin & al. (2013)
M70+C	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC TC	verändert nach Xin & al. (2013)
M70+T	Primer	GAT GAG TCC TGA GTA AGC TT	verändert nach Xin & al. (2013)
preNot1	Primer	GAT GAG TCC TGA GGG CCA	metabion international AG
selNot1	Primer	GAT GAG TCC TGA GGG CCA CTG	metabion international AG

2.4. Statistik

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

AFLPsurv (Software AFLPsurv 1.0, Vekemans 2002) berechnet die genetische Diversität und populationsgenetische Strukturen von Individuen oder Populationen, die zum Beispiel aus Daten der AFLP, ISSR, SRAP analysiert wurden und berechnet daraus genetische Distanzmatrizen. Diese Berechnung basiert auf Allelfrequenzen, die dominant und aus zwei Allelen (ein dominantes Marker-Allel für das Vorhandensein einer Bande an

einer bestimmten Position und ein rezessives Null-Allel für die Abwesenheit der Bande) bestehen (Vekemans 2002). Nach dem Ansatz von Lynch & Milligan (1994) ermittelt AFLPsurv die durchschnittliche, voraussichtliche Heterozygotie der Marker-Loci (Nei's gene diversity – Hj), welche als Maß für die genetische Diversität benutzt wird, und den Prozentsatz der polymorphen Loci (PLP) (Vekemans 2002).

GenAlEx ist ein „Add on" für Excel und beinhaltet populationsgenetische Optionen, wie frequenzbasierende (F-Statistik, Heterozygotie, Populationszuordnungen) und distanzbasierende Analysen (AMOVA, PCoA, Manteltest) (Peakall & Smouse 2006). Für die Untersuchungen an den Proben von *C. calceolus* wurde die PCoA (Principal Coordinates Analysis) benutzt, womit prozentuale Variationen zwischen vorher bestimmten Gruppen ermittelt werden können. Dazu wurden alle Proben in fünf Regionen (Nord-, Nordost-, Ost-Hessen, Thüringen und Rügen) unterteilt, weil sonst Populationen mit nur einer Probe in der Berechnung von GenAlEx nicht berücksichtigt werden. Das Ergebnis der Auswertung wurde in Excel 07 grafisch dargestellt. Anhand der grafischen Darstellung können Rückschlüsse gezogen werden, in wie weit die einzelnen Individuen in den einzelnen Regionen Gemeinsamkeiten oder Unterschiede bilden.

ARLEQUIN ist in der Populationsgenetik ein statistisches Analyseprogramm mit vielen Funktionen, welches auf große Datenmengen ausgerichtet ist, um Informationen über genetische und demografische Merkmale der gesammelten Proben zu erhalten (Exoffier & Lischer 2010). Eine dieser Funktionen von ARLEQUIN ist die AMOVA (analysis of molecular variance), ein statistisches Verfahren basierend auf Varianzanalysen von Genfrequenzen zur Untersuchung von populationsgenetischen Strukturen unter Berücksichtigung der Anzahl von Mutationen zwischen molekularen Haplotypen (Exoffier & al. 1992, Storch & al. 2013). Die Varianzanalysen erlauben durch einen paarweisen Vergleich der Proben eine Partitionierung der genetischen Variationen auf Individuenebene (innerhalb der Populationen – FST), Populationsebene (zwischen den Populationen innerhalb der Gruppen – FSC) und Regionenebene (zwischen den Gruppen – FCT). Die berechneten FST-, FSC- und FCT-Werte befinden sich stets im Bereich von 0–1, wobei 0 keine genetischen Unterschiede zwischen Proben oder keine unterschiedlichen Haplotypen und 1 den höchsten Grad der Differenzierung aufzeigt (Wright 1978).

R ist eine Programmiersprache für statistische Berechnungen mit zahlreichen Grafiken und Werkzeugen zur Datenanalyse, welche durch Funktionen und Pakete erweitert werden kann (Dixon 2003). Eines dieser Pakete ist das für ökologische Auswertungen nützliche und auf große Datenmengen ausgerichtete vegan-Paket (Oksanen & al. 2008), das auch einen Mantel-Test beinhaltet (Dixon 2003, Diniz-Filho & al. 2013).

Mittels der Software STRUCTURE Version 2.3.3 (Pritchard & al. 2000) wurde die genetische Zugehörigkeit der Proben zu genetischen Clustern anhand des Genotyps ohne eine vorher vorgegebene Zuordnung in Regionen oder Populationen untersucht. Dabei werden in mehreren Wiederholungen die Zuordnungswahrscheinlichkeiten jedes Individuums zu jedem Cluster ermittelt sowie eine Gesamtwahrscheinlichkeit P für jede vorgegebene Anzahl K von Clustern (Liesebach 2012).

3. Ergebnisse

Mit den fünf Primern der ISSR-Methode konnten insgesamt 60 auswertbare Eigenschaften/Loci aus 195 Proben in 34 Populationen (Hessen, Thüringen, Mecklenburg-Vorpommern) von *C. calceolus* ermittelt werden. Die AFLP-Auswertung ergab 810 auswertbare Eigenschaften. Bei einem direkten Vergleich der Tabelle 3 und Tabelle 4 ist ersichtlich, dass die Hj-Werte der 34 Populationen sehr ähnlich sind sowie gleiche Abweichungen vom Mittelwert aufzeigen. Dass dies bei zwei unterschiedlichen Methoden als Resultat erzeugt wurde, lässt eine Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit beider Methoden vermuten.

Tab. 3: Populationsgenetische Diversität nach ISSR-Analyse pro untersuchter Population; n = Anzahl an untersuchten Proben, loc = Gesamtzahl der Loci, PLP = prozentualer Anteil polymorpher Loci, Hj = Nei-Diversitätsindex nach Lynch & Milligan (1994). – Genetic diversity of populations based on ISSR analysis; n = number of samples, loc = total number of loci, PLP = polymorphic loci in percent, Hj = Nei's diversity index according to Lynch & Milligan (1994).

Population	n	loc	PLP	Hj
1	15	60	66,7	0,19483
2	15	60	70,0	0,22844
3	12	60	56,7	0,19109
4	17	60	55,0	0,18810
5	9	60	48,3	0,20000
6	4	60	100,0	0,31374
7	10	60	51,7	0,20436
8	2	60	100,0	0,36382
9	2	60	100,0	0,39411
10	16	60	55,0	0,16976
11	6	60	100,0	0,25712
12	6	60	100,0	0,24652
13	7	60	100,0	0,21427
14	6	60	100,0	0,20843
15	3	60	100,0	0,32958
16	1	60	100,0	0,48208
17	5	60	100,0	0,26661
18	1	60	100,0	0,47521
19	1	60	100,0	0,48667
20	2	60	100,0	0,39882
21	2	60	100,0	0,39032
22	12	60	55,0	0,21005
23	2	60	100,0	0,40086
24	2	60	100,0	0,38654
25	12	60	50,0	0,21364
26	2	60	100,0	0,37477
27	1	60	100,0	0,48438
28	2	60	100,0	0,40005
29	3	60	100,0	0,33289
30	1	60	100,0	0,46833
31	2	60	100,0	0,42021
32	2	60	100,0	0,41355
33	10	60	60,0	0,24116
34	2	60	100,0	0,38070

Tab. 4: Daten der AFLP-Methode der untersuchten Populationen; n = Anzahl an untersuchten Proben; loc. = Gesamtzahl der Loci; PLP = Anteil polymorpher Loci; Hj = Nei-Diversitätsindex nach Lynch & Milligan (1994). – Genetic diversity of populations based on AFLP analysis; n = number of samples, loc = total number of loci, PLP = polymorphic loci in percent, Hj = Nei's diversity index according to Lynch & Milligan (1994).

Population	n	loc	PLP	Hj
1	15	810	85,6	0,20317
2	15	810	90,4	0,21677
3	12	810	88,0	0,23434
4	17	810	93,2	0,21395
5	9	810	79,3	0,24308
6	4	810	100,0	0,32105
7	10	810	84,2	0,24005
8	2	810	100,0	0,37688
9	2	810	100,0	0,39879
10	16	810	91,2	0,21600
11	6	810	100,0	0,26760
12	6	810	100,0	0,27345
13	7	810	100,0	0,25138
14	6	810	100,0	0,26705
15	3	810	100,0	0,34230
16	1	810	100,0	0,46969
17	5	810	100,0	0,27708
18	1	810	100,0	0,47156
19	1	810	100,0	0,47394
20	2	810	100,0	0,37966
21	2	810	100,0	0,37806
22	12	810	85,9	0,22717
23	2	810	100,0	0,38268
24	2	810	100,0	0,37822
25	12	810	88,6	0,23156
26	2	810	100,0	0,38056
27	1	810	100,0	0,47071
28	2	810	100,0	0,39612
29	3	810	100,0	0,33804
30	1	810	100,0	0,47326
31	2	810	100,0	0,38979
32	2	810	100,0	0,39272
33	10	810	67,4	0,19311
34	2	810	100,0	0,38892

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

Tab. 5: Übersicht der Ergebnisse der Methoden ISSR und AFLP. – Comparison of results obtained using ISSR and AFLP analyses.

Statistikprogramm	ISSR-Methode (60 Loci)		AFLP-Methode (810 Loci)	
AFLPsurv				
Differenzierung	$F_{ST} = 0{,}01$	kleine Differenz	$F_{ST} = -0{,}02$	homogen
Arlequin				
Amova				
Differenzierung	zwischen Gruppen: F_{CT}: 0,03	kleine Differenz	zwischen Gruppen: F_{CT}: 0,001	kleine Differenz
	$p < 0{,}05$	signifikant	$p > 0{,}05$	nicht signifikant
	zwischen Populationen innerhalb von Gruppen F_{SC}: 0,16	große Differenz	zwischen Populationen innerhalb von Gruppen F_{SC}: −0,004	homogen
	$p < 0{,}05$	signifikant	$p > 0{,}05$	nicht signifikant
	innerhalb von Populationen F_{ST}: 0,19	große Differenz	innerhalb von Populationen F_{ST}: −0,002	homogen
	$p < 0{,}05$	signifikant	$p > 0{,}05$	nicht signifikant
GenAlEx				
PCoA	nach 7 Regionen unterteilt	homogen	nach 7 Regionen unterteilt	homogen
R				
Manteltest				
	$r = 0{,}041$	keine Korrelation	$r = 0{,}262$	geringe Korrelation
Signifikanz	$p > 0{,}05$	nicht signifikant	$p < 0{,}05$	signifikant
Structure				
Differenzierung	K = 3	kleine Differenz	K = 3	homogen

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

Die AFLP-Methode zeigt, dass die untersuchten Proben zwischen den Regionen eine kleine genetische Differenzierung aufweisen, wobei keine genetische Differenzierung zwischen den Populationen innerhalb der Regionen und innerhalb der Populationen auftritt. Laut Manteltest gibt es eine geringe Korrelation zwischen der genetischen und geografischen Distanz.

4. Diskussion

Es konnte mit den verwendeten Methoden keine Differenzierungen zwischen den untersuchten Populationen und keine oder nur eine geringe Differenzierung zwischen den Regionen festgestellt werden. Der Manteltest lieferte keine signifikanten Korrelationen zwischen den genetischen und den geografischen Daten. Eine erwartete genetische Isolierung der Rügener Population wurde nicht bestätigt. Die Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass die untersuchten Populationen in Hessen, Thüringen und Mecklenburg-Vorpommern Teil eines Areals mit hohem genetischen Austausch sind. Dieser kann allerdings bedingt durch die Langlebigkeit der Art durchaus in der Vergangenheit gelegen haben.

Wie schon beschrieben, wird aus Beobachtungen von Barth & Ploß (2014) ein Rückgang der Populationen des Frauenschuhs in Hessen durch zahlreiche Pflegemaßnahmen verlangsamt. Die hessischen Populationen gehören zum derzeit westlichen Randbereich des Verbreitungsgebietes von *C. calceolus*. Die Randbereiche eines Verbreitungsgebiets sollten nach Rehm & al. (2015) vordringlich erhalten bleiben, weil Individuen in diesen Randpopulationen veränderte Genvariationen durch Anpassung an teilweise verschiedene Umweltbedingungen ausbilden, zum Genpool der gesamten Art beitragen und die geografische Verteilung der Art erhalten und/oder erweitern können. Bei Wegfall der lokal adaptierten Randpopulationen reduziert sich die Fähigkeit der Arten sich anzupassen (Rehm & al. 2015).

Nach dieser Studie ist es unproblematisch, kleine Populationen in Hessen mit Saatgut beziehungsweise Pflanzenmaterial aus großen Populationen in Hessen zu stärken ohne eine Veränderung möglicher genetischer Differenzierungsprozesse hervorzurufen. Um möglichen Auskreuzungsdepressionen in der zu stärkenden Population entgegenzuwirken, sollten die Spenderpopulationen möglichst aus lokalen Herkünften stammen (Donath & Eckstein 2008) und wenn möglich sollte Saat- beziehungsweise Pflanzgut aus mehreren Spenderpopulationen verwendet werden. Durch Verwendung von mehreren Spenderpopulationen kann sich die Keimungsrate beziehungsweise die Etablierung des Pflanzenmaterials, aufgrund verschiedener möglicher Anpassungen, erhöhen, wobei darauf geachtet werden muss, dass sich die Habitate der Spenderpopulationen und der zu stärkenden Population ähneln (Montalvo & Ellstrand 2001, Donath & Eckstein 2008). Dabei dürfen Bodenbedingungen (Kalkstein) und Konkurrenzverhalten von *C. calceolus* nicht vernachlässigt werden. Die Problematik der genetischen Selbstinkompatibilität bei kleineren Populationen mit nur einem Genet und mehreren Rameten kann durch Populationsstärkungen mit populationsfremden Saatgut umgangen werden. Zusätzlich sollten im Umkreis von maximal 600 Metern um die Populationen geeignete Habitate mit Nistplätzen für die bestäubenden Bienenarten geschaffen werden, um die Bestäuberquote von *C. calceolus* zu erhöhen.

Danksagung

Ich danke der AG spezielle Botanik an der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Finanzierung und die Unterstützung des Projektes. Ein weiterer Dank geht an das HLNUG für die Erlaubnis Pflanzenmaterial von *Cypripedium calceolus* in Hessen entnehmen zu dürfen, sowie an Uwe Barth, Volker Kögler, Lothar Finke, Anja Abdank und Herrn Keller aus Dresden.

5. Literatur

Antonelli A., C. J. Dahlberg, K. H. I. Carlgren & T. Appelqvist 2009: Pollination of the Lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus*) in Scandinavia – taxonomic and conservational aspects. – Nordic J. Bot. **27**(4), 266–273, Kopenhagen.

Arditti J. & A. K. A. Ghani 2000: Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. – New Phytologist **145**, 367–421, Cambridge.

Barth U. M. 2007: Artenhilfskonzept für *Cypripedium calceolus* (Frauenschuh) in Hessen. – Unveröffentlichtes Gutachten im Auftrag des Landes Hessen, vertreten durch Hessen-Forst – Forsteinrichtung und Naturschutz, Gießen. 66 Seiten + Anhang.

Barth U. M. & A. Opitz 2014: Der Frauenschuh in Hessen. – Artenschutzinfo **11**. Hessen-Forst. – Servicezentrum für Forsteinrichtung und Naturschutz, Gießen. 27 Seiten.

Barth U. M. & E. Ploß 2014: Landesmonitoring 2013 des Frauenschuh (*Cypripedium calceolus*) in Hessen (Art des Anhangs II der FFH-Richtlinie). – Hessen-Forst, Servicezentrum für Forsteinrichtung und Naturschutz, Gießen. 79 Seiten + Anhang.

Bennett M. D., P. Bhandol & I. J. Leitch 2000: Nuclear DNA Amounts in Angiosperms and their Modern Uses - 807 New Estimates. – Ann. Bot. **86**(4), 859–909, Oxford.

BfN [Bundesamt für Naturschutz] & BMUB [Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit 2013]: Nationaler Bericht Deutschlands nach Art. 17 FFH-Richtlinie; basierend auf Daten der Länder und des Bundes. Datengrundlage: Verbreitungsdaten der Bundesländer und des BfN. – www.bfn.de/0316_bericht2013.html [aufgerufen am 25. Mai 2016].

Brunzel S. 2010: Ex-situ-Kultivierung und In-situ-Management als Beitrag zum Artenschutz: Am Beispiel von Frauenschuh (*Cypripedium calceolus*), Sumpf-Gladiole (*Gladiolus palustris*), Böhmischer Enzian (*Gentianella bohemica*) und Karpaten-Enzian (*Gentianella lutescens*). – Natursch. Landschaftsplan. **42**(5), 148–156, Stuttgart.

Brzosko E., A. Wróblewska, I. Tałałaj & E. Wasilewska 2011: Genetic diversity of *Cypripedium calceolus* in Poland. – Pl. Syst. Evol. **295**, 83–96, Vienna.

Cozzolino S. & A. Widmer 2005: Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? – Trends Ecol. Evol. **20**(9), 487–494, Amsterdam.

Cribb P. 1997: The genus *Cypripedium*. – Timber, Portland/Oregon. 301 Seiten.

Daumann E. 1968: Zur Bestäubungsökologie von *Cypripedium calceolus* L. – Österreich. Botan. Zeitschr. **115**(4–5), 434–446, Wien.

Dogan B., A. Duran, Y. Bagci, M. Dinc, E. Martin, O. Cetin & M. Ozturk 2010: Phylogenetic relationships among the taxa of the genus *Johrenia* DC. (*Apiaceae*) from Turkey based on molecular method. – Bangladesh J. Pl. Taxon. **17**(2), 113–120, Dhaka.

Donath W. T. & R. L. Eckstein 2008: Bedeutung genetischer Faktoren für die Wiederansiedlung seltener Pflanzengemeinschaften – Genetische Diversität in der Praxis des Naturschutzes. – Natursch. Landschaftsplan. **4**, 21–25, Stuttgart.

Fay M. F., R. Bone, P. Cook, I. M. Kahandawala, J. Greensmith, S. Harris, H. A. E. Pedersen, M. J. Ingrouille & C. Lexer 2009: Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (*Orchidaceae*) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. – Ann. Bot. **104**(3), 517–525, Oxford.

Fay M. F., R. S. Cowan & I. J. Leitch 2005: The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. – Ann. Bot. **95**(1), 237–246, Oxford.

Fuchs A. & H. Ziegenspeck 1926: Entwicklungsgeschichte der Arten der einheimischen Orchideen und ihre Physiologie und Biologie: 1. Teil. *Cypripedium, Helleborine, Limodorum, Cephalantera*. – Botan. Archiv **14**, 165–260, Königsberg.

Gebauer G., K. Preiss & A. C. Gebauer 2016: Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. – New Phytologist **211**(11), 11–15, Cambridge.

Grell E. 2010: Duft und natürliche Bestäubung von *Cypripedien*: *Cypripedium calceolus*. – Orch. Zeitschr. **1**, 28–32, Basel.

Heinrich W. & R. Lorenz 1996: Frauenschuh (*Cypripedium calceolus* L.): die Orchidee des Jahres 1996. – Ber. Arbeitskr. Heim. Orch. **13**(1), 61–93.

Heinrich W., H. Voelckel, H. Dietrich, R. Feldmann, A. Geithner, V. Kögler, P. Rode & W. Westhus 2014: Thüringens Orchideen. – Arbeitskreis Heimische Orchideen Thüringen, Uhlstädt-Kirchhasel. 864 Seiten.

Jacquemyn H., R. Brys, K. Vandepitte, O. Honnay, I. Roldán-Ruiz & T. Wiegand 2007: A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. – New Phytologist **176**(2), 448–459, Oxford.

Jagel A. & B. Margenburg 2011: Frauenschuh – *Cypripedium calceolus* (*Orchidaceae*), Orchidee des Jahres 2010. – Jahrb. Bochumer Botan. Ver. **2**, 187–191, Bochum.

Jäger E. J. (Hrsg.) 2011: Rothmaler – Exkursionsflora von Deutschland, Gefäßpflanzen: Grundband, 20. Aufl. – Spektrum, Heidelberg. 930 Seiten.

Klingenstein F., M. von den Driesch & W. Lobin 2002: Bedeutung und Aktivitäten der Botanischen Gärten im ex-situ-und in-situ-Artenschutz in Deutschland auf Grundlage der Biodiversitäts-Konvention. – Schriftenreihe Vegetationsk. **36**, 139–150, Bonn.

Kull T. 1988: Identification of clones in *Cypripedium calceolus* (*Orchidaceae*). – Proc. Est. Acad. Sci. Biol. **37**, 195–199, Tallin.

Kull T. 1995: Genet and ramet dynamics of *Cypripedium calceolus* in different habitats. – Abstracta Botan. **19**, 95–104, Budapest.

Kull T. 1998: Fruit-set and recruitment in populations of *Cypripedium calceolus* L. in Estonia. – Botan. J. Linn. Soc. **126**(1–2), 27–38, London.

Kull T. 1999: *Cypripedium calceolus* L. – J. Ecol. **87**(5), 913–924, Oxford u. a.

Kull T. & K. Kull 1991: Preliminary results from a study of populations of *Cypripedium calceolus* in Estonia. In: T. C. E. Wells & J. H. Willems (Hrsg.): Population Ecology of Terrestrial Orchids, 69–76. – SPB, The Hague.

Leitch I. J., I. M. Kahandawala, J. Suda, L. Hanson, M. J. Ingrouille, M. W. Chase & M. F. Fay 2009: Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. – Ann. Bot. **104**(3), 469–481, Oxford.

Lohr M. 2013: Zur Bestäubungsökologie des Frauenschuh (*Cypripedium calceolus*) im Weserbergland (Orchidaceae, Insecta: Hymenoptera). – Beitr. Naturkunde Egge Weser **24**, 23–40, Borgenteich.

Lynch M. & B. G. Milligan 1994: Analysis of population genetic structure with RAPD markers. – Molec. Ecol. **3**(2), 91–99, Oxford u. a.

McGregor C. E., C. A. Lambert, M. M. Greyling, J. H. Louw & L. Warnich 2000: A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. – Euphytica **113**(2), 135–144, Dordrecht u. a.

Montalvo A. M. & N. C. Ellstrand 2001: Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (*Fabaceae*). – American J. Bot. **88**(2), 258–269, St. Louis/Mo.

Müller C. M., P. Kröning, V. Wissemann & B. Gemeinholzer 2016: Kann genetische Diversität in Botanischen Gärten ex-situ bewahrt werden? – BfN-Skripten **436**, 185–192, Bonn.

Müller H. 1873: Die Befruchtung der Blumen durch Insekten und die gegenseitigen Anpassungen beider: ein Beitrag zur Erkenntniss des ursächlichen Zusammenhanges in der organischen Natur. – W. Engelmann, Leipzig. VIII & 478 Seiten.

Nicole F., E. Brzosko & I. Till-Bottraud 2005: Population viability analysis of *Cypripedium calceolus* in a protected area: longevity, stability and persistence. – J. Ecol. **93**(4), 716–726, Oxford u. a.

Nilsson L. A. 1979: Anthecological studies on the Lady's Slipper, *Cypripedium calceolus* (*Orchidaceae*). – Bot. Not. **132**(3), 329–347, Lund.

Pemberton R. W. 2013: Pollination of slipper orchids (*Cypripedioideae*): a review. – Lankesteriana **13**(1–2), 65–73, San José.

Rehm E. M., P. Olivas, J. Stroud & K. J. Feeley 2015: Losing your edge: climate change and the conservation value of range-edge populations. – Ecol. Evol. **5**(19), 4315–4326.

Sharma S. K., S. Kumaria, P. Tandon & S. R. Rao 2013: Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). – J. Pl. Biochem. Biotechnol. **22**(2), 250–255, New Delhi.

Shefferson R. P., T. Kull & K. Tali 2005a: Adult whole-plant dormancy induced by stress in long-lived orchids. – Ecol. **86**(11), 3099–3104, Washington D.C.

Shefferson R. P., M. Weiss, T. Kull & D. L. Taylor 2005b: High specificity generally characterizes mycorrhizal association in rare lady's slipper orchids, genus *Cypripedium*. – Molec. Ecol. **14**(2), 613–626, Oxford u. a.

van Groenendael J. M., L. Klimes, J. Klimesova & R. J. Hendriks 1996: Comparative ecology of clonal plants. – Philosoph. Trans. Royal Soc. London B: Biolog. Sci. **351**(1345), 1331–1339, London.

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. − Nucleic Acids Res. **23**(21), 4407–4414, Oxford.

Xin Q., L. I. Quanjian, L. Jingjing, W. Caixia & T. Min 2013: Genetic diversity of endangered wild *Cypripedium japonicum* populations: An AFLP analysis. – Chin. J. Ecol. **32**, 1445–1450, Shengyang.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Botanik und Naturschutz in Hessen

Jahr/Year: 2018

Band/Volume: 30

Autor(en)/Author(s): Opitz Andreas, Müller Christina, Gemeinholzer Birgit, Wissemann Volker

Artikel/Article: Populationsgenetische Untersuchungen an hessischen Populationen von Cypripedium calceolus 67-82