
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet für Limnologie

Phylogenetische Untersuchungen
zum *Nitzschia palea*-Sippenkomplex anhand von
Morphologie und molekularbiologischen Methoden

Thorsten S. Rennebarth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Melzer

2. Univ.-Prof. Dr. W. Huber

Die Dissertation wurde am 09.12.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.05.2010 angenommen.

„So how many algae are there?

The answer is simple: no one knows.“

(NORTON, T. A., MELKONIAN, M., ANDERSEN, R. A. 1996)

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract.....	1
2. Einleitung.....	3
3. Die Gattung Nitzschia.....	6
4. Material und Methoden.....	14
4.1 Probengewinnung / Isolation.....	14
4.1.1 Exclosures.....	14
4.1.2 Epiphyton.....	15
4.1.3 Epilithon.....	15
4.1.4 Epipsammon.....	15
4.1.5 Isolation.....	16
4.2 Kultur.....	17
4.2.1 Kulturmedien.....	17
4.2.1.1 Wright's Cryptophyte-Medium.....	18
4.2.1.2 CHU-10 Medium-Varianten.....	20
4.2.1.3 DIAT-Medium.....	23
4.2.1.4 Hartwassermedium („HWD“).....	25
4.2.1.5 CR-1 Medium.....	28
4.2.2 Kultorraum.....	28
4.2.3 Dokumentation.....	28
4.2.4 Vorversuch zur Eignung unterschiedlicher Kulturmedien.....	31
4.3 Genetische Analyse.....	33
4.3.1 DNA-Extraktion.....	33
4.3.2 DNA-Amplifikation.....	36
4.3.2.1 GenomiPhi-Amplifikation.....	36
4.3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	39
4.3.2.3 Kettenabbruchreaktion.....	44
4.3.3 Analyse der Sequenzen.....	46
4.4 Morphologische Analysen.....	46
4.4.1 Herstellung mikroskopischer Präparate.....	47
4.4.1.1 Untersuchung vollständiger Diatomeenzellen.....	47

4.4.1.2 Präparate von Diatomeenschalen.....	48
4.4.2 Untersuchung am Lichtmikroskop.....	49
4.4.3 Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop (REM).....	49
4.4.4 Erfassung Morphologischer Parameter.....	50
4.4.4.1 Quantitativ erfassbare Merkmale.....	50
4.4.4.2 Qualitativ erfassbare Merkmale.....	55
4.4.5 Untersuchungen zur Merkmalskonstanz.....	58
4.4.5.1 Freilandversuche.....	58
4.4.5.2 Laborversuche.....	59
4.4.6 Reproduzierbarkeit und Fehler der Messungen.....	62
4.4.7 Eignung zur Abgrenzung zwischen phylogenetisch begründeten Gruppen von Stämmen.....	63
5. Ergebnisse.....	64
5.1 Vergleich unterschiedlicher Nährmedien.....	64
5.2 Genetik.....	69
5.2.1.1 Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1).....	70
5.2.1.2 Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2).....	75
5.2.1.3 Small Subunit (SSU).....	79
5.2.1.4 Supertree Genetik.....	86
5.3 Morphologie.....	89
5.3.1 Eignung der Messmethoden.....	89
5.3.1.1 Reproduzierbarkeit.....	89
5.3.1.2 Konstanz der Merkmale.....	93
5.3.2 Beschreibung der Stämme.....	99
5.3.2.1 Allgemeine Merkmale.....	99
5.3.2.2 Einzelbeschreibungen der Stämme.....	102
5.3.3 Bildtafeln.....	153
5.4 Vergleich der morphologischen Eigenschaften zwischen phylogenetisch begründeten Gruppen.....	172
6. Diskussion.....	178
6.1 Artkonzepte in der Systematik.....	178
6.2 Verwendbarkeit von Merkmalen für merkmalsbasierte Artkonzepte...181	181
6.3 Anwendbarkeit der untersuchten Merkmale.....	187
6.4 Vergleich der morphologischen Merkmale mit den Ergebnissen der	

DNA-Analysen.....	196
6.5 Anwendung der Artkonzepte auf die Ergebnisse.....	198
6.6 Schlussfolgerungen für die Taxonomie.....	203
7. Literatur.....	204
Anhang.....	212
DNA-Sequenzen eigener Stämme.....	212
Danksagungen.....	240

1. Abstract

Within the genus *Nitzschia* (*Bacillariophyceae*) the species complex around *Nitzschia palea* contains some of the most spread taxa of the genus in fresh waters. The *Nitzschia palea* complex is particularly poor in diagnostic characters. Thus there are problems with the taxonomy within this complex.

For this study a number of isolates from the *Nitzschia palea* complex were taken from different sites and grown under equal conditions. The morphological characters of these isolates were studied, if possible by using planometric methods. The reproductivity of the measurements when carried out by different people was tested. The DNA sequences of the ITS1, ITS2 and SSU regions of the isolates were used for phylogenetic analysis. The results of the genetic and the morphologic analysis were compared.

The phylogenetic analysis shows that among the isolates there are three well supported groups. Among the examined morphological characters with a good reproductivity (when analysed by different people) no character or combination of characters was found which is unique for one of the groups supported by the phylogenetic analysis. Following different species concepts the results of this study show that within the *Nitzschia palea* complex there are at least three cryptic species.

Abstract

2. Einleitung

Zahlreiche Aktivitäten des Menschen, insbesondere seit der Industrialisierung, verursachen einen erhöhten Kohlendioxidgehalt in der Atmosphäre. Heute ist unstrittig, dass diese Erhöhung zu Klimaveränderungen führt. Um das Ausmaß des Klimawandels zu modellieren, wurde eine Vielzahl von Untersuchungen zur möglichst genauen Quantifizierung der umgesetzten Mengen von Kohlenstoff im globalen Kohlenstoffkreislauf durchgeführt.

In aktuellen Veröffentlichungen wird die Menge an Kohlenstoff, die der Atmosphäre jedes Jahr durch Photosynthese entzogen wird, auf rund 105 Pg geschätzt. Von dieser Menge nehmen tropische Regenwälder ca. 17,8 Pg auf, die Savannen 14,2 Pg. Von den übrigen Wäldern weltweit werden ca. 9,1 Pg/a fixiert, auf Agrarflächen ca. 8,0 Pg/a (FIELD & BEHRENBURG 1998). Der Anteil an Kohlenstoff, der global von aquatischen Primärproduzenten festgelegt wird, liegt bei etwa 50 Pg/a. Von diesem Kohlenstoff fixieren alleine die Kieselalgen 20 bis 26 Pg/a (SCALA & BOWLER 2001).

Kieselalgen, Diatomeen oder Bacillariophyceae sind einzellige, unbegeißelte Mikroalgen. Allen gemein ist die charakteristische Zusammensetzung der Pigmente aus Chlorophyll a und c, Fucoxanthin, Diadinoxanthin und Diatoxanthin sowie eine Zellwand aus Silikat, die bei einem Großteil der Taxa charakteristisch käseschachtelartig aus einer Ober- und einer Unterschale zusammengesetzt ist. Nach den Angiospermen werden die Diatomeen als die artenreichste Gruppe innerhalb der photoautotrophen Organismen angesehen. NORTON, MELKONIAN ET AL. (1996) geben eine zu erwartende Taxazahl von 100 000 bis 10 000 000 bei derzeit 10 000 – 12 000 bekannten Taxa an.

Hinter dieser Organismengruppe verbergen sich gewaltige Ressourcen, die bisher nur in wenigen Ansätzen einer direkten Nutzung zugeführt werden. LEBEAU (2003 A, B) nennt als bisherige Nutzung nur die Verwendung als Futterorganismen in Aquakulturen sowie die Verwendung von Kieselgur – fossilem gereinigtem Schalenmaterial – als Filtermaterial und Absorbens z.B. für die Sprengstoffherstellung. Daneben gibt es quantitativ unbedeutendere Anwendungen wie die Produktion von Marenin, einem blaugrünen Farbstoff aus der Kieselalge *Haslea ostrearia*, der den begehrten Marennes-Oléron-Austern ihre charakteristische smaragdgrüne Färbung verleiht.

Als weitere mögliche Nutzungen scheinen vor allem die Speicherfette der Kieselalgen attraktiv, die mit ihrem hohen Gehalt an Eicosapentaensäure und Arachidonsäure ernährungsphysiologisch sehr wertvoll wären. WEN & CHEN beschreiben 2002 ein Perfusionskulturverfahren zur Fettsäureproduktion mit *Nitzschia laevis*, das im Labormaßstab, allerdings bei heterotropher Ernährung der Algen, eine Ausbeute bis zu 1112 mg extrahierbarer Eicosapentaensäure pro Liter Kultursuspension erreichte. In Versuchen mit photoautotroph wachsenden Kieselalgen konnten YONGMANITCHAI & WARD (1991) Ausbeuten von 107,3 mg Eicosapentaensäure pro Liter Kultursuspension bei insgesamt 337,8 mg Fettsäureproduktion pro Liter erreichen.

Interessant sind auch die hohen Vitamingehalte einiger Arten sowie antibakteriell und antimykotisch wirkende Stoffe (LEBEAU 2003 B). Vereinzelt wurden Stoffe isoliert, die in vitro das Wachstum von Krebszellen (BERGÉ, BOURGOUNON ET AL. 1997) oder die Vermehrung von HI-Viren gehemmt haben (BERGÉ, BOURGOUNON ET AL. 1999).

Kieselalgen besitzen eine Zellwand aus amorpher Kieselsäure. Die Zellwand verwittert nicht und weist neben dem charakteristischen Aufbau aus zwei Schalenhälften artspezifische Feinstrukturen auf, die sich gut zur Bestimmung der Taxa eignen. Daher lässt sich die Zusammensetzung von rezenten und fossil im Sediment vorkommenden Kieselalgenpopulationen anhand der Kieselalgeschalen gut rekonstruieren. Da viele Diatomeentaxa spezifische Präferenzen und Toleranzen für verschiedene Umweltparameter besitzen, eignen sie sich hervorragend zur Charakterisierung des Milieus und werden seit rund 30 Jahren als Bioindikatoren eingesetzt. ALLES (1999) verwendet Diatomeen zur ökologischen Bewertung der Fließgewässerversauerung im Schwarzwald. Weitere Arbeiten zur Indikation von Gewässerversauerungen stammen beispielsweise von MILLS (1986) oder STEINBERG (1992). Daneben gibt es Arbeiten, in denen Kieselalgentaxa zur Indikation der Wassertemperatur (CHOLNOKY 1968, HEIN & KOPPEN 1979 zitiert in HÜRLIMANN 1993), der Saprobie (ROTT 1997) oder der Trophie herangezogen wurden. Insbesondere zur Trophieindikation sind weltweit zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden. Als Beispiele seien hier die Untersuchungen von HOFMANN (1993) zu Bioindikation in mitteleuropäischen Seen oder von SALOMONI & ROCHA (2006) zur Indikation in brasilianischen Fließgewässern genannt. Die Trophieindikation anhand von Diatomeen findet über die Umsetzung der europäischen Wasserrahmenrichtlinie Eingang in die routinemäßige Untersuchung der Oberflächengewässer.

Ein wichtiges Werkzeug für die Verwendung von Kieselalgen in der Bioindikation ist die Taxonomie. Erst wenn sinnvolle Grenzen zwischen morphologischen Typen gezogen werden können, ist die Voraussetzung gegeben, in einer Kieselalgen-Gesellschaft Taxa zu bestimmen und darauf aufbauend Rückschlüsse über die Wasserqualität zu ziehen.

3. Die Gattung *Nitzschia*

Die erste vollständige Entschlüsselung eines Kieselalgen-genoms, des Genoms von *Thalassosira pseudonana* (ARMBRUST, BERGES ET AL. 2004), offenbarte einige Überraschungen. Bei der Entschlüsselung der Gensequenzen stellte sich heraus, dass Diatomeen in der Lage sind, neben 865 als rein pflanzlich geltenden Proteinen und 271 cyanobakterientypischen Proteinen auch 806 Proteine zu synthetisieren, die bisher als rein tierisch galten. Weiterhin zeigen Untersuchungen zur aktiven Fortbewegung der raphiden Kieselalgen, dass die Bewegung mit Aktin und Myosinfilamenten realisiert wird, was für das Pflanzenreich untypisch ist (vgl. SITTE, ZIEGLER ET AL. 1991).

Stellen die Diatomeen also seltsame Chimären zwischen den großen Reichen der klassischen Systematik dar?

Lange Zeit wurden Diatomeen als Subdivision der Heterokontophyta angesehen. Auf diese Einteilung deutet das Vorkommen von Chlorophyll a und c, während Chlorophyll b fehlt, sowie der charakteristische Bau der Chloroplasten hin. In diesen sind die Stapel aus je drei Thylakoiden zusammengesetzt. Der ganze Chloroplast ist, neben der überall im Pflanzenreich verbreiteten doppelten Membran, zusätzlich von einer weiteren Membran umhüllt, die dem endoplasmatischen Retikulum zugehörig ist. Ferner besitzen Kieselalgen die gleichen akzessorische Pigmente wie die Heterokontophyta, vor allem Fucoxanthin, aber auch Diadinoxanthin und Diatoxanthin (METZNER 1973). Das Vorkommen von Chrysolaminarin als Speicherstärke und der dicht an die Kernmembran angepresste Golgi-Apparat weisen ebenfalls auf die Zugehörigkeit der Diatomeen zu den Heterokontophyta hin. Laut VAN HOEK, JAHNS & MANN (1993) kann auch die Struktur der Geißel, die nur bei wenigen männlichen Gameten der Centrales auftritt, trotz gewisser Abweichungen der Geißelstruktur, von den Heterokontophyta abgeleitet werden. Wegen ihrer zahlreichen Eigenarten werden die Diatomeen mittlerweile als eigene Division der Strameopiles angesehen (SOGIN & PATTERSON 1995)

Die Vielfältigkeit der potentiell in Kieselalgen vorkommenden Proteine lässt sich neben dieser etwas isolierten Stellung in der Systematik auch mit der mehrfachen Aufnahme von Endosymbionten erklären (ARMBRUST, BERGES ET AL. 2004).

Innerhalb der Kieselalgen konnte durch die jüngeren molekularbiologischen Untersuchungen viel zur Systematik beigetragen werden. Beispielsweise wird heute entgegen der bisher verwendeten Zweiteilung in Centrales und Pennales von drei Klassen ausgegangen. Nach MEDLIN, KOOISTRA ET AL. (1996) stellt sich die Systematik der Kieselalgen nach heutigem Stand wie folgt dar: Die Coscinodiscophyta, die im wesentlichen den früheren Centrales entsprechen, teilen sich in zwei Gruppen auf. MEDLIN, KOOISTRA ET AL. unterscheiden dabei die Coscinodiscophyceae, die als evolutiv am ursprünglichsten angesehen werden und die Mediophyceae, in denen die Thalassiosirales und die bipolaren Centrischen wie z.B. *Rhaphoneis* enthalten sind. Die Pennales oder Bacillariophyceae stellen ein Monophyllum dar, sie werden in Raphide und Araphide unterteilt.

In der taxonomischen Einordnung nach dem National Center for Biotechnology Information (NCBI) werden die Diatomeen (Bacillariophyta) in drei Klassen unterschieden (Abb. 1): Coscinodiscophyceae (inkl. der Thalassiosirales), Fragilariophyceae, in denen bipolare, araphide Taxa vereinigt werden, und Bacillariophyceae mit den pennaten, raphiden Taxa.

Innerhalb der Raphiden werden zunächst die Eunotiophycidae vom Rest („Bacillariophycidae“) abgetrennt. Die Bacillariophycidae enthalten u.A. die Klassen Achnanthes, Surirellales, Cymbellales, Naviculales, und Bacillariales. Letztere enthält die Familia der Bacillariaceae mit den Gattungen *Bacillaria*, *Cylindrotheca*, *Psammodictyon*, *Pseudonitzschia*, *Hantzschia*, *Denticula*¹, *Fragilariopsis* und *Nitzschia*.

Die Gattung *Nitzschia* wurde 1845 von HASSALL mit der Typusart *Nitzschia elongata* begründet. Die Beschreibung von *Nitzschia elongata* von HASSALL war jedoch nicht gültig. Der Speziesname ist daher als *nomen illegalis* eingestuft, wobei der Gattungsname *Nitzschia* als *nomen conservandum* eingestuft wurde. Infolge dessen ist die nächste gültig beschriebene *Nitzschia*-Art, *Nitzschia sigmoidea*, der Typus der Gattung. Diese war 1817 von NITZSCH in „Beiträge zur In-

¹ KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1988) stellen *Denticula* nicht in die Bacillariaceae, sondern in die Epithemiaceae. Grund hierfür sind vor allem die Sphäroidkörper, die sich bei den Epithemiaceae und auch den meisten *Denticula*-Taxa im Zellplasma befinden. Die Untersuchungen von LOIBL (2005) zeigen jedoch, dass *Denticula* und *Nitzschia* sehr nahe verwandt sind.

Die Gattung *Nitzschia*

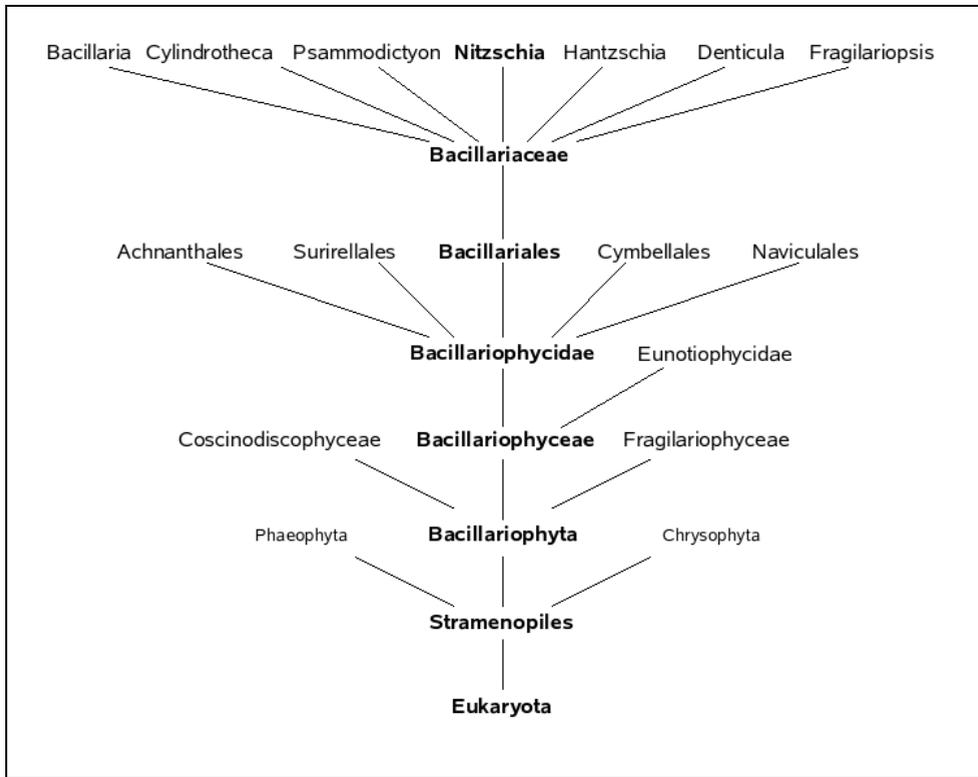


Abbildung 1: Systematische Stellung der Gattung *Nitzschia* (Einteilung nach NCBI)

fusorienkunde“, Neue Schriften der Naturforschenden Gesellschaft, als *Bacillaria sigmoidea* beschrieben worden. SMITH versetzte das Taxon 1853 in die Gattung *Nitzschia*.

Die Gattung *Nitzschia* ist gekennzeichnet durch den Besitz zweier, im Regelfall diagonal opponierter oder auf den Theken zentral gelegener Kanalaraphen, die durch Stützelemente, den Fibulae, überspannt werden. Weitere Kennzeichen sind isopole Longitudinal-, Transversal- und Transapikalachsen.

Regelmäßig ist eine variable Zahl von Gürtelbändern zu finden. Die Frusteln einiger Taxa sind sigmoid gekrümmt, der Querschnitt häufig nicht rechteckig sondern rhomboid oder leicht trapezförmig. In der Regel liegen zwei, gelegentlich komplex gelappte Chloroplasten vor, die jeweils einzeln zum Zellende hin angeordnet sind.

Die Gattung *Nitzschia*

Die Gattung *Nitzschia* sensu lato, wie sie von KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1988) definiert wird, umfasst mehrere Sektionen oder Artengruppen, in die die Gattung aufgeteilt werden kann. Die Autoren geben folgende, z.T. historische Sektionen an:

Sektion	Merkmale
Nitzschiellae	<ul style="list-style-type: none"> • Raphenkiel mehr oder weniger exzentrisch • Kein Conopeum ausgebildet • Mittelteil der Zellen spindelförmig, Spitzen lang vorgezogen
Lanceolatae	<ul style="list-style-type: none"> • Raphenkiel ohne Conopeum • Fehlen von Merkmalskombinationen, die für andere Sektionen typisch sind. <p>Bei den Lanceolatae handelt es sich um eine Sammelsektion, in der merkmalsarme Taxa zusammengefasst sind.</p>
Tryblionellae	<ul style="list-style-type: none"> • Umriss abweichend vom Rest breiter und stärker symmetrisch • Deutliche Längsfalte oder Welle in der Schalenoberfläche • Transapikalrippen auf der Außenseite
Apiculatae	Merkmale weitgehend übereinstimmend mit Tryblionellae, werden von KRAMMER & LANGE-BERTALOT mit diesen zusammengefasst.
Panduriformes	<ul style="list-style-type: none"> • Zwischenraum zwischen den Chloroplasten (abweichend von anderen <i>Nitzschia spec.</i>) gegenüber der Transapikalebene schief. • Poren ein hexagonales Muster bildend • keine Transapikalrippen auf der Außenseite

Die Gattung Nitzschia

Sektion	Merkmale
	Merkmale ansonsten weitgehend übereinstimmend mit Tryblionellae, werden von KRAMMER & LANGE-BERTALOT mit diesen zusammengefasst.
Bilobatae	<ul style="list-style-type: none"> • Raphe mit Zentralknoten • Kein Conopeum ausgebildet • Raphenkiel etwas exzentrisch • Frusteln in der Mitte deutlich konkav eingeschnürt • Zelle durch zahlreiche Gürtelbänder relativ hoch
Dubieae	Raphenkiel stärker exzentrisch als bei Bilobatae, Merkmale ansonsten übereinstimmend mit diesen, werden von KRAMMER & LANGE-BERTALOT mit diesen zusammengefasst.
Lineares	Merkmalsarme Gruppe, lt. KRAMMER & LANGE-BERTALOT unzureichend definiert
Dissipatae	<ul style="list-style-type: none"> • Raphe durchgehend, ohne Zentralknoten • Raphe (relativ) wenig exzentrisch oder zentrisch • Raphenkiel mit Conopeum • Schalen nicht sigmoid gekrümmt
Insignes	<ul style="list-style-type: none"> • Sehr langschalige Formen • Raphe stark exzentrisch • Raphe durchgehend, ohne Zentralknoten • Raphenkiel deutlich ausgeprägt • Kein Conopeum ausgebildet • Fibulae ins Schaleninnere hinein verlängert

Die Gattung Nitzschia

Sektion	Merkmale
	<ul style="list-style-type: none"> • Werden meist mit den Sculares vereinigt
Sculares	Werden meist mit Insignes vereinigt, Merkmale siehe dort
Grunowia	<ul style="list-style-type: none"> • Raphenkiel deutlich exzentrisch • Raphe durchlaufend, ohne Zentralknoten • Kein Conopeum ausgebildet • Fibulae relativ weit über dem Raphenkanal, erscheinen daher verlängert
Epithe- mioideae	<ul style="list-style-type: none"> • Raphe mit Zentralknoten • Kein Conopeum ausgebildet • Raphenkiel etwas exzentrisch • Fibulae in die Schale hineinverlängert • Schale mit Querrippen • Zelle meist mit zahlreichen Gürtelbändern
Sigmoideae	<ul style="list-style-type: none"> • Frusteln in Pleuralansicht mehr oder weniger sigmoid gekrümmt • Raphe durchgehend, ohne Zentralknoten • Raphenkiel mit Conopeum
Spathulatae	<ul style="list-style-type: none"> • Raphe durchgehend, ohne Zentralknoten • Raphe nur wenig exzentrisch • Raphenkiel mit Conopeum • Frusteln nicht sigmoid gekrümmt
Sigmata	<ul style="list-style-type: none"> • Raphe mit Zentralknoten

Die Gattung *Nitzschia*

<i>Sektion</i>	<i>Merkmale</i>
	<ul style="list-style-type: none">• Kein Conopeum• Raphe stark exzentrisch• Frusteln in Gürtelbandansicht sigmoid gekrümmt
Obtusae	<ul style="list-style-type: none">• Raphe mit Zentralknoten• Kein Conopeum• Raphe distal deutlicher exzentrisch als proximal• Frusteln in Gürtelbandansicht sigmoid gekrümmt

Einige dieser Sektionen wurden von anderen Autoren (z.B. ROUND, CRAWFORD & MANN 1990) bereits als eigene Gattung aufgefasst, wie beispielsweise die Tryblionellae als Gattung *Tryblionella*, Panduriformes als Gattung *Psammodictyon* oder die Grunowia als Gattung *Grunowia*.

Während sich die gerade erwähnten Sektionen und die Epithemioidae sowie die zusammengefassten Dubiae und Bilobatae relativ gut ansprechen lassen, ist die Zuordnung von Taxa zu den übrigen Sektionen problematisch. Hier erscheint ein natürliches System hinter den Sektionen zweifelhaft. Genetische Untersuchungen zur Klärung, inwieweit die genannten Sektionen natürliche Gruppen darstellen, wären hierzu sehr wünschenswert. Sie sind allerdings aufgrund der Seltenheit und der stark unterschiedlichen Standorte einiger Taxa sehr aufwändig. Die Befunde von LOIBL (2005) lassen aber erwarten, dass im Zuge einer weiterreichenden Überarbeitung der Gattung *Nitzschia* selbige in mehrere neue Gattungen aufgeschlüsselt wird.

Die Lanceolatae stellen innerhalb der Gattung *Nitzschia* eine Sammelgruppe dar, in der Taxa zusammengefasst werden, die aufgrund ihrer Merkmalsarmut nicht in eine der übrigen Sektionen passen. Ihnen gemein ist das Fehlen eines Conopeums, das Fehlen einer sigmoiden Krümmung, das Fehlen verlängerter Fibulae oder verstärkter Transapikalrippen, das Fehlen von Längsfalten und eine mehr oder weniger linear-lanzettliche bis spindelförmige Form ohne Besonderheiten. In der angewandten Forschung sind die Lanceolatae interessant,

weil viele häufige Taxa wie *N. palea*, *N. paleacea* oder *N. frustulum* oder für die Bioindikation wichtige Taxa wie *N. inconspicua* (eutraphent) oder *N. alpina* (oligotraphent) in diese Sektion eingeordnet werden. Der Mangel an Differenzierungsmerkmalen macht die Unterscheidung der Taxa dieser Sektion oft schwierig.

Der Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit ist der Formenkreis um *Nitzschia palea*, der in der gegenseitigen Abgrenzung problematisch ist. Neben dem erwähnten Taxon mit seinen Varietäten bzw. Formen *N. palea* f. *major* RABENHORST 1864, *N. palea* var. *minuta* BLEISCH IN RABENHORST 1863, *N. palea* var. *tenuirostris* LANGE-BERTALOT 1976 und *N. palea* var. *debilis* KÜTZING 1844 gehören hierzu u.a. die Taxa *Nitzschia pilum* HUSTEDT 1942, *Nitzschia gracilis* HANTZSCH 1860, *Nitzschia graciloides* HUSTEDT 1953, *Nitzschia subrostratoides* CHOLNOKY 1966 sowie einige Formen, die *Nitzschia pura* HUSTEDT 1954 bzw. *Nitzschia acicularioides* HUSTEDT 1959 zugerechnet werden.

Zum besseren Verständnis des Formenkreises um *Nitzschia palea* wird folgende Vorgehensweise gewählt.

1. Mit ausgewählten Vertretern dieses Formenkreises werden phylogenetische Analysen durchgeführt. Dazu werden bestimmte DNA-Sequenzen der Taxa miteinander verglichen, um natürliche Gruppen innerhalb des Formenkreises aufzuspüren.
2. Im Weiteren werden zahlreiche morphologische Merkmale der untersuchten Taxa des Komplexes um *Nitzschia palea* detailliert untersucht.
3. Schließlich wird geprüft, inwieweit die Ergebnisse der morphologischen Differenzierung der ausgewählten Formen mit den Befunden der phylogenetischen Analysen übereinstimmen. Durch diese Vorgehensweise soll geklärt werden, ob sich bestimmte morphologische Parameter als Merkmale zur Differenzierung zwischen natürlichen Gruppen eignen.

4. Material und Methoden

4.1 Probengewinnung / Isolation

Die Kultur von Kieselalgenstämmen stellt eine wichtige Grundlage dieser Arbeit dar. Zum einen dient die Kultur von monoklonalen Stämmen der Gewinnung ausreichender Mengen von Material für die DNA-Analyse, zum anderen erlauben Kulturen eine Beobachtung der phänotypischen Plastizität eines Stammes über viele Zellgenerationen hinweg. Diese Tatsache ist eine wichtige Voraussetzung um das Größen- und Formenspektrum sowie die Merkmalskonstanz innerhalb eines monoklonalen Stammes abzuschätzen zu können. Statistisch gesicherte Aussage über die Merkmalsausprägungen und Kenntnisse über die Variabilität innerhalb eines Klones, wie sie über Kulturen gewonnen werden können, liefern für taxonomische Fragestellungen wichtige Informationen.

Mit Ausnahme eines Stammes, der von der Sammlung für Algenkulturen Göttingen (SAG) bezogen wurde, wurden alle in dieser Arbeit behandelten Stämme selbst isoliert. Die Freilandproben, aus denen die Stämme isoliert wurden, stammten aus Exclosures, aus Epiphyton, aus Epilithon und aus Epipsammon.

4.1.1 Exclosures

Aus der Überlegung heraus, Proben mit einem möglichst hohem Anteil an *Nitzschia*-Zellen zu gewinnen und ein selektives Grazing, wie es z.B. von McCORMICK & STEVENSON (1989), NICOTRI (1977) oder später von AZOVSKY & SABUROVA (2005) beschrieben wurde, zu vermeiden, waren zunächst Exclosures verwendet worden. Diese bestanden aus Acrylglaskästen, deren Boden mit Siebgewebe bespannt war. Das Siebgewebe hatte eine Maschenweite von 10 µm, wodurch Kieselalgen einwandern konnten, Grazer aber weitgehend ausgeschlossen wurden. Im Deckel waren zur Entlüftung Löcher vorgesehen, die ebenfalls mit Siebgewebe gegen das Eindringen von Grazern geschützt waren. In diese Exclosures wurden Objektträger aus Glas (7,8 x 2,5 cm) zur Besiedlung gelegt. In den Versuchen wurden die Exclosures für drei Wochen in den Eis-

haussee, den Herrensee und den Fischkaltersee eingebracht. Nach diesem Zeitraum wurden die Objektträger entnommen und bis zur weiteren Verwendung in Wasser aus dem Exclosure aufbewahrt.

Aufgrund der geringen Ausbeute, der langen Wartezeit bis zur Besiedlung und des hohen technischen Aufwandes wurde die Methode nach den ersten Versuchen nicht fortgeführt.

4.1.2 Epiphyton

Zur Gewinnung von Isolaten aus dem Aufwuchs von Röhrichtpflanzen wurden Stängel von *Phragmites australis*, *Schoenoplectus lacustris* und *Cladium mariscus* mit einer Gartenschere etwa 30 – 50 cm unter der Wasseroberfläche abgeschnitten und bis zur weiteren Verarbeitung in Standortwasser aufbewahrt.

Auch Stoppel von Stängeln der Vorjahre, welche teilweise mit bis zu 1,5 cm mächtigen Biofilmen überzogen waren und Blätter von Schwimmblattpflanzen wurden auf diese Weise gesammelt. Von submersen Pflanzen wurden Proben mit Hilfe eines Rechens genommen. Aus dem Starnberger See wurden Proben von *Najas marina*, *Potamogeton perfoliatus*, *P. pectinatus* und von grobem Detritus aus einer Tiefe von 2 – 5 m durch Taucher entnommen.

4.1.3 Epilithon

Zur Gewinnung von Proben des Epilithons wurden Steine unterschiedlicher Größe aus dem Gewässer entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in Standortwasser aufbewahrt.

4.1.4 Epipsammon

Von der Oberfläche weicher Sedimente wurden mit einem Schlauch, an dessen unteren Ende ein Gewicht befestigt war, Proben angesaugt. Zur Erzeugung des nötigen Unterdrucks diente eine Handvakuumpumpe. Die Proben wurden in einem Auffangbehälter gesammelt, der zwischen Saugschlauch und Vakuumpumpe befestigt war, und mit Standortwasser bis zu weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.1.5 Isolation

Die Isolation der Algen erfolgt bei allen Proben nach folgendem Schema:

Zunächst wurde eine Algensuspension hergestellt, indem Sedimentproben mit autoklaviertem Leitungswasser (121°C, 20 min) direkt suspendiert wurden. Proben von Makrophyten, grobem Detritus, Steinen, Schilfstoppeln oder Objektträgern aus Exclosures aus den jeweiligen Probegewässern wurden mit einer Zahnbürste abgebürstet. Der Aufwuchs wurde anschließend aus der Zahnbürste mit sterilisiertem Leitungswasser (s. o.) ausgewaschen und die Suspension in einer Petrischale aufgefangen.

Aus den Algensuspensionen wurden Aliquote in eine Verbundkammer für das Umkehrmikroskop gegeben und bei Bedarf mit sterilem Leitungswasser oder Nährmedium verdünnt.

Zur Isolation einzelner *Nitzschia*-Zellen wurden Pasteurpipetten über dem Bunsenbrenner erhitzt und die Spitze zu einer dünnen Kapillare ausgezogen. Diese Kapillare wurde auf ca. 4 cm gekürzt und vor der Verwendung mit sterilem Medium oder sterilem Leitungswasser gefüllt.

Mit den so ausgezogenen Pipetten wurden die Algen unter dem Umkehrmikroskop bei 100 – 400facher Vergrößerung einzeln angesaugt und auf vorbereiteten Nährboden gegeben.

Der nötige Unter- bzw. Überdruck beim Ansaugen bzw. Übertragen der Isolate wurde über einen Schlauch mit dem Mund erzeugt. Um Kontaminationen über evtl. eingesaugten Speichel zu verhindern, wurde zwischen dem Schlauchende mit dem Mundstück und dem Schlauchende mit der Kapillare eine Woulff'sche Flasche eingebaut.

Nach jedem Isolationsversuch wurde die Spitze mit sterilem Medium gespült und neu gefüllt.

4.2 Kultur

4.2.1 Kulturmedien

Bei der Kultur von Algen kommt den verwendeten Nährmedien eine Schlüsselrolle zu. Diese müssen alle zum Wachstum nötigen Stoffe in ausreichender Menge liefern und dabei zumindest annähernd den osmotischen Bedingungen entsprechen, die die zu kultivierenden Algen auch in ihrer natürlichen Umgebung vorfinden. Aus den verschiedenen Standardwerken zur Algenkultur (z.B. STEIN 1973) ist eine Vielzahl von Medien und Modifikationen zu finden.

4.2.1.1 Wright's Cryptophyte-Medium

Aufgrund der in der Limnologischen Station Iffeldorf vorhandenen Erfahrungen mit Algenkulturen wurde zunächst ein modifiziertes Wright's Cryptophyte-Medium² (=“WC-Medium“) nach Goos (1999) zur Kultur der Algen verwendet.

Zur Herstellung des WC-Mediums wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

Tabelle 1: Stammlösungen mit Inhaltsstoffen für die Herstellung von WC-Medium

Lösung	Inhalt	Einwaage auf 1 l	Hersteller	Dosierung (bezogen auf 1 l fertiges Medium)
WC 1	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	36,76 g	Fluka	1 ml
WC 2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	36,97 g	Merck	1 ml
WC 3	Na ₂ CO ₃	7,95 g	Merck	1 ml
WC 4	K ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	1,00 g	Merck	1 ml
WC 5	KNO ₃	110,00 g	Fluka	1 ml
WC 6	Na ₂ SiO ₃ · 5 H ₂ O	21,21 g	Sigma	1 ml
Spurenelemente	EDTA	3,55 g	Merck	1 ml
	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	3,15 g	Merck	
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01 g	Fluka	
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,022 g	Merck	

² Wofür das viel zitierte Acronym „WC-Medium“ steht, ist nicht eindeutig zu klären. In ANDERSON 2005 „WC“ als „Wright's Cryptophyte“ erklärt. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist „Whright's CHU“

Material und Methoden

Lösung	Inhalt	Einwaage auf 1 l	Hersteller	Dosierung (bezogen auf 1 l fertiges Medium)
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,01 g	Sigma	
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,18 g	Fluka	
	Na ₂ MoO ₄	6,0 mg	Sigma	
	H ₃ BO ₄	1,0 g	Merck	
Vitaminlösung	Thiamin	0,1 mg	Sigma	1 ml
	Biotin	0,5 mg	Sigma	
	Cyanocobalamin	0,5 mg	Sigma	

Von den Stammlösungen wurde jeweils 1 ml/l zur Herstellung des fertigen Mediums pipettiert. Zum Auffüllen auf 1 l wurde Wasser aus einer Reinstwasseranlage verwendet.

Desweiteren wurden 0,5 % Agar (Merck) zugesetzt, das Medium bei 121°C 20 min autoklaviert und jeweils 5 ml in sterile Petrischalen aus Polypropylen (Greiner) gefüllt.

4.2.1.2 CHU-10 Medium-Varianten

Da auf WC-Medium nur wenige Isolate anwuchsen, wurden Versuche mit anderen Medien durchgeführt (Durchführung s. Kap. 4.2.4, Ergebnisse Kap. 5.1), in deren Verlauf sich das Medium „CHU-10“ nach STEIN (1973) bzw. eine Kombination dieses Mediums mit sterilisiertem Wasser des Herkunftsgewässers als am besten geeignet erwies.

Zur Herstellung des Chu-10 Medium wurden folgende Stammlösungen verwendet:

Tabelle 2: Stammlösungen und Inhaltsstoffe für die Herstellung von CHU-10 Medium

Lösung	Inhalt	Einwaage auf 1 l Lösungs- volumen	Hersteller	Dosierung (bezogen auf 1 l fertiges Medium)
CHU 1	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	5,8 g	Sigma	10 ml
CHU 2	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	57,58 g	Fluka	1 ml
CHU 3	K_2HPO_4 was- serfrei	10 g	Merck	1 ml
CHU 4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	25 g	Merck	1 ml
CHU 5	Eisencitrat- Monohydrat	33,5 g	Fluka	1 ml
	Zitronensäure	33,5 g	Riedel-de Haen	
CHU 6	Na_2CO_3	20 g	Merck	1 ml

Material und Methoden

Lösung	Inhalt	Einwaage auf 1 l Lösungs- volumen	Hersteller	Dosierung (bezogen auf 1 l fertiges Medium)
Spurenelemente	H ₃ BO ₄	2,86 g	Merck	0,5 ml
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1,81 g	Fluka	
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,22 g	Merck	
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,39 g	Sigma	
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	79,0 mg	Fluka	
	Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O	49,4 mg	Fluka	
Vitaminlösung	Thiamin	0,1 mg	Sigma	1 ml
	Biotin	0,5 mg	Sigma	
	Cyanocobalamin	0,5 mg	Sigma	

Die Lösungen 1-5 und die Spurenelementlösung wurden auf das zweifache der Endkonzentration zusammenpipettiert. Lösung Chu 6 wurde separat auf das zweifache der Endkonzentration verdünnt. Beide zweifach konzentrierten Gemische wurden getrennt bei 121°C für 20 min autoklaviert und nach dem Abkühlen vermischt. Diese Trennung der beiden „Vorstufen“ ist nötig, um die Bildung von Niederschlag im Medium während des Autoklavierens zu verhindern.

Die Vitaminlösung wurde nach dem Erkalten zugesetzt.

Der pH-Wert des fertigen Mediums wurde mit autoklavierter 1 %iger HCl und 1 %iger KOH-Lösung auf 6,5 eingestellt.

Die fertigen Medien wurden analog zum WC-Medium mit 0,5 % Agar versetzt und in Petrischalen gefüllt.

Die Verwendung von flüssigem Nährmedium stellte sich im Verlauf der Arbeit als weniger aufwändig heraus. Aufgrund des wesentlich geringeren Platzbedarfs und Materialverbrauchs wurden desweiteren die Petrischalen durch Mikrowellplatten mit 96 U-förmigen Vertiefungen (TPP) ersetzt. Diese wurden mit 200 µl Medium pro Vertiefung (= Well) befüllt. Zur Weiterkultur angewachsener Isolate wurden Mikrowellplatten mit 24 Vertiefungen mit ebenem Boden (TPP) verwendet. Die Wells auf diesen Platten wurden mit jeweils 1 ml Medium befüllt.

CHU-10 mit Standortwasser („CHU-E“)

Das Wasser der Herkunftsgewässer („Standortwasser“) wurde zunächst mit einem Celluloseacetatfilter der Porenweite 0,2 µm (Sartorius, Göttingen) filtriert und anschließend 4 Stunden mit einer 35 W UV-C-Röhre (Osram) bestrahlt. Das sterilisierte Wasser wurde dann mit dem CHU-10 Medium im Verhältnis 1:1 gemischt.

CHU-10 mit Chloramphenicol („CHU-A“)

Um bakterielle Kontaminationen zu vermindern, wurde bei der Isolation und für Erhaltungskulturen aus Proben bzw. Kulturen mit starker bakterieller Besiedlung ein Antibiotikum zugegeben. Aufgrund seiner sehr breiten Wirkung gegen gramnegative und grampositive Bakterien wurde hierfür Chloramphenicol ausgewählt. Zu einem Liter fertigem Medium wurde 1 ml einer Stammlösung mit 63 mg Chloramphenicol (Fluka) pro ml Wasser beigemischt. Eine Wachstumshemmung der Algen wurde bei der gewählten Konzentration nicht beobachtet.

4.2.1.3 DIAT-Medium

Für den unter Punkt 4.2.4 beschriebenen Versuch zum Vergleich häufig verwendeter Nährmedien wurde das von der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen (SAG) angewandte Bacillariophyceenmedium „DIAT“ verwendet.

Tabelle 3: Stammlösungen zur Herstellung des DIAT-Mediums

Lösung	Inhalt	Einwaage auf 1 l Lösungsvolumen	Hersteller	Dosierung bezogen auf 1 l fertiges Medium
Diat 1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g	Fluka	20 ml
Diat 2	K_2HPO_4 wasserfrei	1,0 g	Merck	10 ml
Diat 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g	Merck	25 ml
Diat 4	Na_2CO_3	1,0 g	Merck	20 ml
Diat 5	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g	Sigma	50 ml
Diat 6	Eisencitrat-Monohydrat	1,0 g	Fluka	10 ml
Diat 7	Zitronensäure	1,0 g	Riedel-de Haen	10 ml
Bodenextrakt				30 ml
Spurenelemente	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 mg	Merck	5 ml
	$\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,0 mg	Merck	

Material und Methoden

<i>Lösung</i>	<i>Inhalt</i>	<i>Einwaage auf 1 l Lö- sungsvolu- men</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Dosierung bezogen auf 1 l fertiges Medium</i>
	H ₃ BO ₄	20,0 mg	Merck	
	Co(NO ₃) ₂ · H ₂ O	6 1,0 mg	Fluka	
	Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	2 1,0 mg	Sigma	
	CuSO ₄ ·5 H ₂ O	5 µg	Fluka	
	EDTA	0,8 g	Merck	
	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,7 g	Merck	
Vitaminlö- sung	Thiamin	0,1 mg	Sigma	0,5 ml
	Biotin	0,5 mg	Sigma	
	Cyanocobala- min	0,5 mg	Sigma	

Zur Herstellung des Medium wurden die in Tabelle 3 angegebenen Stammlösungen entsprechend der dort angegebenen Mengen gemischt und 20 min bei 121°C autoklaviert.

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und nach dem Erkalten des autoklavierten Mediums zugesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes vom Medium auf 6,5 erfolgte mit autoklavierter 1 %iger HCl bzw. autoklavierter 1 %iger KOH-Lösung.

Der benötigte Bodenextrakt wurde folgendermaßen hergestellt: In eine 6 l-Flasche wurden ca. 2 l humoser Wald- oder Gartenboden gegeben und soviel Wasser aufgefüllt, dass dieses etwa 5 cm über der Erde steht. Bei der Wahl des Bodens wurde darauf geachtet, dass das Material einen gewissen mineralischen Anteil besitzt und keine Pestizid- oder Düngerrückstände enthält. Das Wasser-Erde-Gemisch wurde nun eine Stunde bei 121°C gedämpft und nach 24 Stunden ein weiteres Mal für eine Stunde gedämpft. Die Flüssigkeit wurde dekantiert und verbliebene Reste der Erde abzentrifugiert. Der Extrakt wurde anschließend bei 121°C 20 min autoklaviert.

Um Ausfällungen zu verhindern, kann die Spurenelement-Stammlösung nicht als Ganzes autoklaviert werden. Es wurde daher eine Lösung mit ca 800 ml Wasser, den Salzen ohne Eisensulfat und nur der Hälfte des EDTA und eine zweite Lösung mit ca 100 ml Wasser, dem Eisensulfat und der verbliebenen Menge EDTA angesetzt. Beide Lösungen wurden separat autoklaviert und nach dem Erkalten zusammengeführt und auf 1 l mit sterilem H₂O_{bidest} aufgefüllt.

4.2.1.4 Hartwassermedium („HWD“)

Da alle verwendeten Kieselalgenproben aus Gewässern mit hartem Wasser stammen, wurde ein Medium mit deutlich erhöhtem Carbonatgehalt konzipiert. Die Herstellung erfolgte aus den in Tabelle 4 aufgeführten Stammlösungen. Zunächst wurden die Stammlösungen CHU 1, CHU 2, CHU 3 und die Spurenelemente in etwa 800 ml H₂O_{bidest} pipettiert. Diese Vorlösung, die Stammlösung CHU 5, die Karbonatlösung und die Mg-Lösung wurden separat bei 121°C für 20 min autoklaviert. Nach dem Erkalten wurden alle autoklavierten Stamm- und Vorlösungen sowie die Vitaminlösung in den entsprechenden Dosierungen zusammengegeben und auf 1 l aufgefüllt.

Material und Methoden

Tabelle 4: Stammlösungen, die zur Herstellung des HWD-Mediums verwendet wurden

Lösung	Inhalt	Einwaage auf 1 l Lösungsvolumen	Hersteller	Dosierung bezogen auf 1 l fertiges Medium
CHU 1	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	5,8 g	Sigma	10 ml
CHU 2	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	57,58 g	Fluka	1 ml
CHU 3	K_2HPO_4 wasserfrei	10,0 g	Merck	1 ml
CHU 5	Eisencitrat-Monohydrat	33,5 g	Fluka	1 ml
	Zitronensäure	33,5 g	Riedel-de Haen	
Spurenelemente	H_3BO_4	1,43 g	Merck	1 ml
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,91 g	Fluka	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,20 g	Merck	
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,0 g	Fluka	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	10,0 mg	Fluka	
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	25,0 mg	Fluka	
	H_2SeO_3	2,0 mg	Fluka	
Karbonatlösung	Na_2CO_3	20,0 g	Merck	1 ml
	NaHCO_3	20,0 g	Merck	

Material und Methoden

Lösung	Inhalt	Einwaage auf 1 l Lösungsvolumen	Hersteller	Dosierung bezogen auf 1 l fertiges Medium
Mg-Lösung	$Mg_5(CO_3)_4(OH)_2$	11,9 g	Aldrich	1 ml
	H_2SO_4	26,17 g	Fluka	
	KOH	6,40 g	Riedel-de Haen	
Vitaminlösung	Thiamin	0,1 mg	Sigma	1 ml
	Biotin	0,5 mg	Sigma	
	Cyanocobalamin	0,5 mg	Sigma	

Bei Herstellung der Mg-Lösung wurden Schwefelsäure und KOH jeweils abwechselnd in kleinen Portionen zugegeben, so dass der pH-Wert der Lösung schwach alkalisch bis neutral blieb.

4.2.1.5 CR-1 Medium

Das CR-1 Medium nach CZARNECKI (persönliche Mitteilung) wird in der Kieselalgensammlung des Loras College in Dubuque, Iowa, erfolgreich für die Kulturen vieler Kieselalgen verwendet. Es besteht aus einem Ansatz aus 8 ml Flusssediment vulkanischen Ursprungs, das auf 100 ml mit H₂O_{bidest} aufgefüllt und nach Zugabe von 0,8 g Magnesiumhydroxidcarbonat für 30 min bei 121°C autoklaviert wird.

Da ein entsprechendes Sediment nicht zur Verfügung stand, wurde ersatzweise Lavamehl („BIOLIT“ Sanvita GmbH) verwendet. Um den organischen Bestandteil des Flusssediments zu ersetzen, wurden dem Ansatz pro 100 ml 0,1 g Pepton (Sigma) zugesetzt.

4.2.2 Kulturraum

Die Kultur der Algen erfolgte bei konstant 16°C. Der Kulturraum wurde mit einer Kombination aus einer 400 W-Hochdrucknatriumdampfampe (Typ Son-T 400W, Phillips) und einer 400 W Quecksilberdampfampe (Typ HPI-T 400W, Phillips) beleuchtet. Die Beleuchtung war 16 Stunden pro Tag eingeschaltet.

Da ab Juni 2004 die Klimakammer noch für andere Versuche benötigt wurde, wurde die Beleuchtung auf drei Metallhalogenidlampen vom Typ HQI-BT-D 400 W (Osram) umgestellt. Um die Kieselalgen vor zu viel Licht zu schützen, wurden die Mikrowellplatten mit Pergamentpapier abgedeckt.

4.2.3 Dokumentation

Zur genauen Dokumentation wurde eine Datenbank mit Access XP (Microsoft) angelegt und gepflegt, in der alle angelegten Kulturen, Isolationsversuche und Stämme festgehalten wurden.

Jede Einzelkultur wurde mit einer eindeutigen Bezeichnung nach folgendem Muster gekennzeichnet und in der Datenbank geführt: AAAUDDMMY, wobei AAA die fortlaufende Nummer der Kultur am entsprechenden Verarbeitungstag bzw. die fortlaufende Nummer der Mikrowellplatte und die Position der

Kultur auf der Mikrowellplatte ist. So steht 1B5 beispielsweise für Well B5 (siehe Abbildung 2) auf der ersten Mikrowellplatte am entsprechenden Verarbeitungstag. UU steht für das Kürzel des Ursprungsgewässers (siehe Tabelle 5). DD und MM beziehen sich auf Tag bzw. Monat des Verarbeitungsdatums, Y auf die letzte Stelle des Verarbeitungsjahrs. Zusätzlich wurden in der Datenbank die genaue Herkunft des kultivierten Materials, das Nährmedium, der aktuelle Zustand bzw. der Zustand bei Entsorgung der Kultur und ggf. der kultivierte Stamm erfasst.

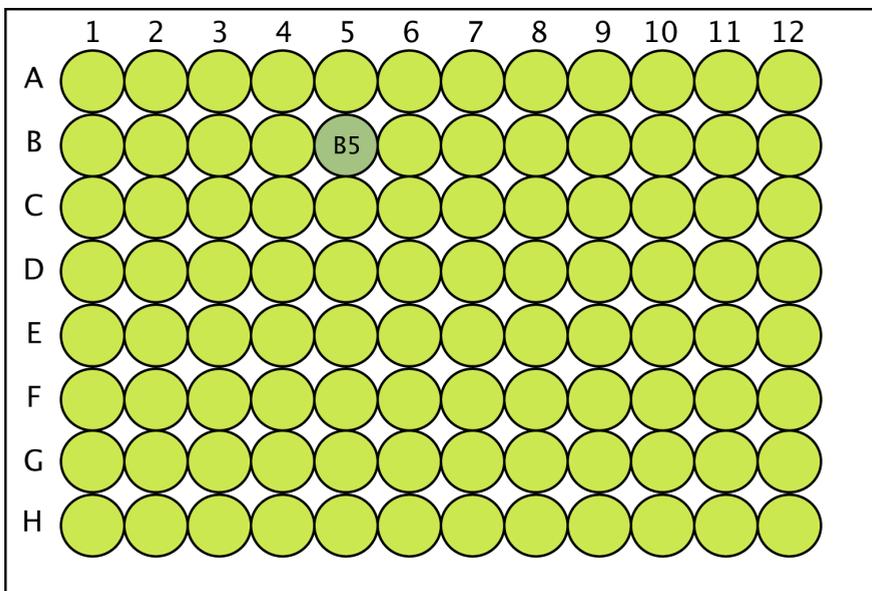


Abbildung 2: Nummerierung der Wells in einer Microwell-Platte mit 96 Well, dunkelgrün hervorgehoben Well Nr. B5 (Beispiel aus dem Text)

Die Stämme wurden mit einer eindeutigen Bezeichnung nach dem Muster UUNN gekennzeichnet, wobei UU das Kürzel für das Ursprungsgewässer ist (siehe Tabelle 5) und NN die fortlaufende Nummer des Stammes für das ent-

Material und Methoden

sprechende Gewässer ist. In der Datenbank wurden außerdem die Kulturen, in denen der Stamm kultiviert wurde, der Isolationstag sowie das Vorhandensein von isolierter DNA und mikroskopischen Präparaten festgehalten.

Tabelle 5: Tabelle mit verwendeten Probestellenkürzeln

1.Stelle des Kürzels	2. Stelle des Kürzels	Ursprungsgewässer/ Probestelle
L		Lauterbach (bei Eschenlohe)
	G	Nähe Golfplatz
O		Osterseen
	A	Ameisensee
	B	Bräuhaussee
	C	Schiffhüttensee
	E	Eishaussee
	F	Fohnsee
	G	Gröbensee
	H	Herrensee
	I	Fischkaltersee
	L	Lustsee
	O	Großer Ostersee
	Q	Waschsee (Quellen)
	R	Forchensee

1.Stelle des Kürzels	2. Stelle des Kürzels	Ursprungsgewässer/ Probestelle
	S	Sengsee
	W	Westlicher Breitenauer See
S		Starnberger See
	G	Nähe Garatshausen
	U	Nähe Unterzeismering
T		Tiefenbach
	P	Polling

4.2.4 Vorversuch zur Eignung unterschiedlicher Kulturmedien

Das zunächst verwendete WC-Medium erbrachte nur geringe Erfolge bei der Isolation von *Nitzschia*-Klonen. Aus diesem Grund wurde der Wachstumserfolg von verschiedenen Diatomeenstämmen auf WC-Medium, CHU-10 Medium und DIAT-Medium verglichen.

Dazu wurden von fünf Kieselalgenstämmen jeweils 50 µl Algensuspension in zwei Parallelen auf eine Petrischale (Polypropylen, 50 mm Durchmesser, Greiner) mit den verschiedenen Medien angeimpft. Zusätzlich wurde für jedes Medium eine Kontrolle mit autoklaviertem Wasser „beimpft“. Die beimpften Schalen wurden 28 Tage unter den im Punkt 4.2.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Danach wurden die Entwicklung der Diatomeenstämmen am Binokular betrachtet und ihr Wachstum beurteilt.

Zum Beeimpfen wurden zwei unbenannte Stämme aus dem Lustsee, die Stämme OR01 und OR02 aus dem Forchensee und der Stamm OGo2 aus dem Gröbensee verwendet.

4.3 Genetische Analyse

4.3.1 DNA-Extraktion

Nach der Kontrolle am Lichtmikroskop wurden aus vitalen, nicht mit Pilzen oder anderen Eukaryonten (soweit erkennbar) kontaminierten Kulturen 200 µl Zellsuspension bzw. ein etwa 10 mm² bedeckendes Stück der Agaroberfläche entnommen und in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Von Zellsuspensionen wurde bei 1000 Upm 10 min lang die Flüssigkeit abzentrifugiert und diese bis auf kleine Reste abgesaugt.

Die weiteren Schritte zur Isolierung der Diatomeen-DNA folgten im wesentlichen den Herstelleranweisung für das DNeasy® Plant Mini-Kit (QIAGEN). Im einzelnen waren dies:

- Zellyse und Ausfällen von Zellbestandteilen

Den Proben wurde jeweils 600 µl AP1-Puffer (QIAGEN), vorgewärmt auf 65°C, und eine Spatelspitze (entspricht ca 20 mg) gewaschene und hitzesterilisierte Glassbeads mit 425 – 600 µm Durchmesser (Sigma) zugesetzt. Der Ansatz wurde in einem Mikrodismembrator (B. Braun – Melsungen AG) ca. 30 s lang geschüttelt, wobei die Zellwände zerstört wurden. Zur Lysis der Zellbestandteile wurden die so behandelten Proben bei 65°C für 15 min im Wasserbad inkubiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt.

- Abtrennen der Zellreste

650 µl der gekühlten Proben wurden hierzu mit Large Orifice Tips (StarLab) aufgenommen, auf QIAshredder-Säulchen (QIAGEN) überführt, diese in Collection-Tubes (zum Dneasy®-Kit gehörend) gestellt und bei 13000 Upm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulchen mit den abgetrennten Zellresten verworfen.

- Hydrierung der DNA

Das Zentrifugat aus dem vorigen Schritt wurde (wiederum mit Large Orifice Tips) ohne Pellets in frische, sterile 2ml-Reaktionsgefäße überführt. Der Flüssigkeit wurde jeweils 750 µl AP3/E-Puffer (QIAGEN; pro 125 ml Konzentrat mit 250 ml Ethanol, puriss., Riedel-de Haen) zugesetzt und die Ansätze durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette sofort gut gemischt.

- Binden der DNA

650 µl jeder Probe wurden auf DNeasy® -Säulchen (QIAGEN) übertragen, diese in frische Collection Tubes gestellt und bei 8000 Upm 1 min zentrifugiert. Die gefilterte Flüssigkeit wurde verworfen. Zum Freilegen von Bindestellen wurden je 500 µl Ethanol (puriss., Riedel-de Haen) auf die Säulchen aufgetropft und erneut bei 8000 Upm 1 min zentrifugiert, das filtrierte Ethanol verworfen. Anschließend wurde der Rest der Proben auf die Säulchen aufgetragen und bei 8000 Upm 1 min zentrifugiert und die filtrierte Flüssigkeit entsorgt.

- Waschen der DNA

Die Säulchen mit der gebundenen DNA wurden in frische Collection-Tubes gestellt. Pro Säule wurden 500 µl AW-Puffer (QIAGEN, pro 81 ml Konzentrat mit 190 ml Ethanol, puriss., Riedel-de Haen) aufpipettiert und bei 8000 Upm 1 min zentrifugiert. Die filtrierte Flüssigkeit wurde entfernt. Es folgte analog zum ersten Waschgang ein zweiter Waschgang, wobei jedoch 2 min zentrifugiert wurde. Das Filtrat wurde

wiederrum verworfen. Um letzte Reste des Eluenten zu entfernen, wurden die Proben ein weiteres Mal 2 min zentrifugiert, wobei die Umdrehungszahl auf 13000 Upm heraufgesetzt wurde. Anschließend wurden die Säulchen mit der gebundenen Diatomeen-DNA in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße (BioPlastic) gestellt.

- Eluieren der DNA

Auf die Säulchen wurden je 50 µl AE-Puffer (QIAGEN) aufpipettiert, der zuvor auf 65 °C vorgewärmt wurde. Nach einer Ruhezeit von 5 min wurden die Proben 1 min lang bei 8000 Upm zentrifugiert. Für eine bessere Ausbeute wurde ein weiterer Elutionschritt mit 60 µl vorgewärmtem AE-Puffer, 5 min Ruhezeit und 2 min Zentrifugation bei 8000 Upm durchgeführt.

Um die Menge und die Qualität der isolierten DNA abzuschätzen, wurden jeweils 2 µl der aufgereinigten Probe zusammen mit 2 µl Auftragspuffer (Roti®-Load DNA mit Glycerin, Carl Roth) auf ein Gel aus TBE-Puffer (1 Volumenteil Rotiphorese® TBE-Pufferkonzentrat (Carl Roth) auf 9 Volumenteile Reinstwasser) und 1 % Agarose aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard wurde ein Verdau von Lambda-DNA mit EcoR1 und HindIII (MBI Fermentas) 1:10 verdünnt und analog zu den Proben 2 µl Verdünnung mit 2 µl Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Zur Anfärbung der DNA wurde dem Gel pro 100 ml 5 µl Ethidiumbromidlösung (1 %ig in H₂O, Merck, Darmstadt) zugesetzt.

Die extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Bei längerer Lagerung wurde die DNA-Lösung bei -21 °C eingefroren

4.3.2 DNA-Amplifikation

4.3.2.1 *GenomiPhi-Amplifikation*

Wenn nach der DNA-Extraktion in der Gelelektrophorese keine DNA-Bande sichtbar war, wurde zunächst eine Vervielfältigung der DNA mit Hilfe des GenomiPhi-Kits (Amersham) durchgeführt.

Bei der GenomiPhi-Amplifikation (siehe Abbildung 3) binden kurze Hexamer-Primer an vielen Stellen der DNA. An den gebundenen Hexamer-Primern setzt eine DNA-Polymerase an, die ein mehrere hundert Basenpaare langes Stück der genomischen DNA vervielfältigt. Diese neu synthetisierten Stränge werden durch die Polymerase wieder vom Template-Strang gelöst. Es können nun an alle neu gebildeten Stränge und an das Template Primer ansetzen, die Amplifikation an neuen Stellen beginnen. Auf diese Weise wird das gesamte Genom der Zelle in unterschiedlich langen Fragmenten amplifiziert, bis die Primer und die Triphosphatnucleotide verbraucht sind. Das Produkt dieser Amplifikation ist nach einer kurzen Denaturierung der Polymerase ohne weitere Aufreinigung für eine weitere Verwendung in einer PCR verwendbar.

Die Proben wurden gemäß des Protokolls von Amersham 16 Stunden bei 30°C inkubiert. Die für einen Reaktionsansatz verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Für die GenomiPhi-Amplifikation verwendete Reagenzien, Mengenangaben bezogen auf einen Reaktionsansatz

Reagenz	Hersteller	Menge
DNA-Extrakt	-	1 μ l
Probenpuffer (sample buffer)	Amersham	9 μ l
Reaktionspuffer (reaction buffer)	Amersham	9 μ l
Enzymmix (enzyme mix)	Amersham	1 μ l

Zunächst wurde 1 μ l der Probe mit 9 μ l Probenpuffer 3 min bei 94°C denaturiert und anschließend schnellstmöglich auf 4°C gekühlt. Der so vorbereitete Ansatz wurde mit einer Mischung aus 9 μ l Reaktionspuffer und 1 μ l Enzymmix versetzt und für 16 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 4 min lang bei 65°C denaturiert.

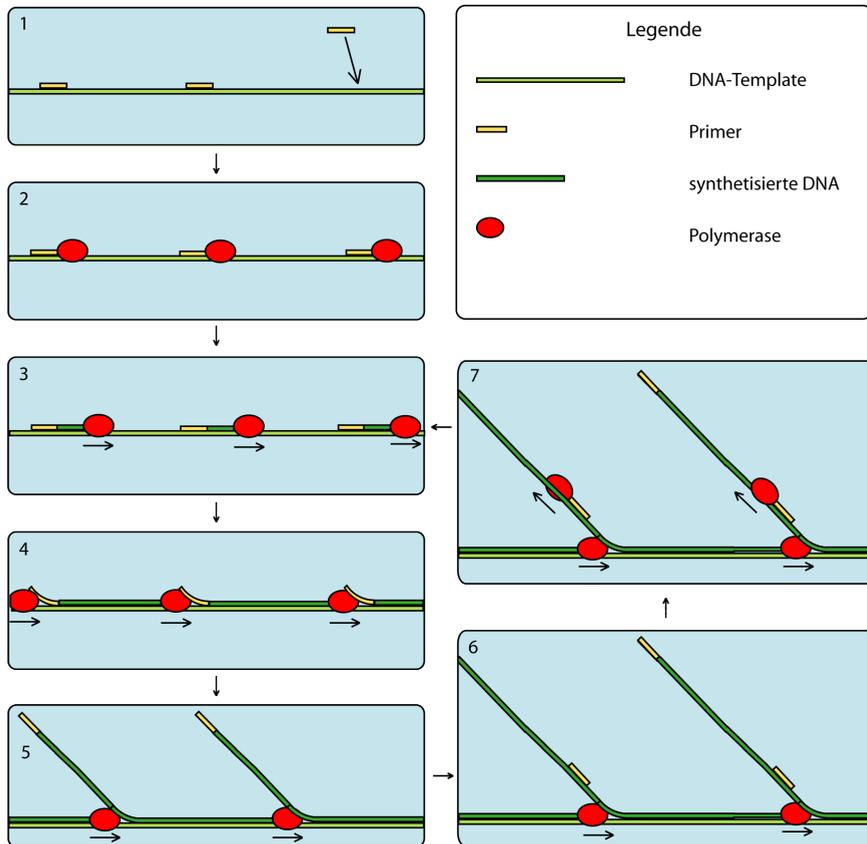


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Abläufe bei der GenomiPhi-Amplifikation:

- *Anlagern der Hexamer-Primer*
- *Beginn der DNA-Amplifikation*
- *Verlängerung der synthetisierten DNA-Stränge*
- *Beginn der Ablösung der synthetisierten DNA vom Template*
- *weitere Verlängerung der synthetisierten DNA*
- *Anlagern neuer Primer an den neu synthetisierten Strängen*
- *Beginn der DNA-Amplifikation an den neuen Strängen*

4.3.2.2 *Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)*

Um eine Sequenzierung durchführen zu können, muss zunächst die zu sequenzierende DNA-Region vervielfältigt werden. Hierzu wurde bei ausreichender DNA-Menge nach der Extraktion bzw. nach der GenomiPhi-Amplifikation eine **Polymerase Chain Reaction (PCR)** verwendet (Reaktionschema siehe Abbildung 4).

Zu Beginn der PCR wird die DNA zunächst durch Erhitzen auf 94° in Einzelstränge aufgetrennt.

Bei einer Annealingtemperatur, die von den jeweils verwendeten Primern abhängt, werden an die Einzelstränge 15-25 Basen lange Primer mit bekannten Sequenzen am Anfang und am Ende des zu vervielfältigenden Stückes angelagert und bei 72°C mit SilverStar-Polymerase (Eurogentec) ausgehend von den Primern die komplementären Stränge ergänzt. Um ein erneutes Anlagern von Primern an Einzelstränge zu ermöglichen, folgt ein kurzer Denaturierungsschritt bei 94°C. Anschließend wird diese Abfolge von Annealing, Elongation und Denaturierung noch 33 weitere Male wiederholt.

Abschließend wird der Reaktionsansatz für 10 min bei 72°C gehalten, um eine Elongation von bereits ansynthetisierten Fragmenten bis zur endgültigen Länge zu ermöglichen.

Nach der PCR wurde der Versuchsansatz bis zur weiteren Verwendung auf 4°C gekühlt und lichtgeschützt gelagert bzw. bei längerer Lagerung bei -21°C eingefroren.

Pro Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden standardmäßig verwendet:

Tabelle 7: Für die PCR verwendete Reagenzien, Mengenangaben bezogen auf einen Reaktionsansatz

Reagenz	Hersteller	Menge	Bemerkungen
Reaction Buffer 10x	Eurogentec	2 µl	
MgCl 50 mM	Eurogentec	0,6 µl	
NTP mix	Fermentas	2 µl	Verdünnt auf 2 pmol/µl
Primer vorwärts	Thermo	0,8 µl	Verdünnt auf 10 pmol/µl
Primer rückwärts	Thermo	0,8 µl	Verdünnt auf 10 pmol/µl
Silverstar-Polymerase	Eurogentec	0,08 µl	
H ₂ O _{bidest}	-	3,72 µl	
DNA	-	10 µl	

Eine Auflistung aller verwendeten Primer findet sich in Tabelle 8. Die Sequenzen sind nach IUB-Codes gelistet. Soweit nicht anderes angegeben, wurden die Primer selbst entwickelt.

Der Erfolg der PCR wurde, wie in Punkt 4.3.1 beschrieben, mittels einer Gelelektrophorese bewertet. Nach erfolgreicher PCR sollten auf dem Gel distinkte Banden von DNA mit der molaren Masse des zu amplifizierenden Stückes sichtbar sein.

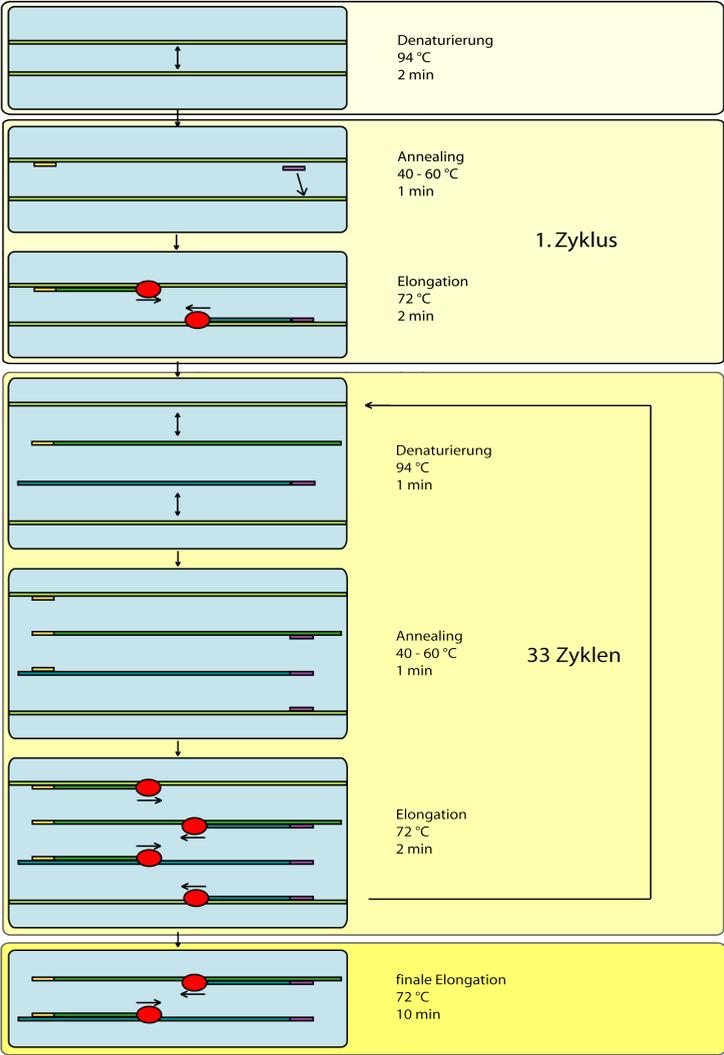
Nach erfolgreicher PCR wurden die Proben mittels des QiaQuick PCR-Purifikation Kits der Firma Qiagen von überschüssigen Triphosphatnucleotiden und Primern sowie Salzen, Pyrophosphat und Resten der Polymerase befreit. Das Vorgehen folgte dabei dem Standardprotokoll des Herstellers.

Material und Methoden

Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer

Bezeichnung	Bereich	Sequenz (5' – 3')	Quelle
1-F	SSU (vorwärts)	AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT A	RIMET 2004
528-F		GCG GTA ATT CCA GCT CCA A	RIMET 2004
1055-F		GGT GGT GCA TGG CCG TTC TT	RIMET 2004
536-R	SSU (rückwärts)	AAT TAC CGC GGC KGC TGG CA	RIMET 2004
1055-R		ACG GCC ATG CAC CAC CAC CCA T	RIMET 2004
1528-R		CTT CTG CAG GTT CAC CTA C	RIMET 2004
1800-F	ITS (vorwärts)	1 ACC TGG GGA AGG ATC ATT	BENKE 2002
1800-F DIAT		ACC TGS GGA AGG ATC ATT	
ITS 2N	ITS (rückwärts)	1 TCG CTG CGT TCT TCA TCG	MANNSCHRECK 2002
ITS 3-R		CGT TCT TCA TCG ATG C	
ITS 2-F	ITS (vorwärts)	2 GAT GAA GAA CGC AGC GA	FRAUNHOLZ 1999
ITS 3		GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	
ITS 4	ITS (rückwärts)	2 TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	BENKE 2002
ITS DIAT 4		TTC CTC CGC TTA ATT ATA TGC	

Material und Methoden



- DNA-Template
- Primer (vorwärts)
- Primer (rückwärts)
- synthetisierte DNA (vorwärts)
- synthetisierte DNA (rückwärts)
- Polymerase

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reaktionsschritte während der PCR

4.3.2.3 Kettenabbruchreaktion

Gibt man in einen PCR-Ansatz neben den Triphosphatnucleotiden auch Nucleotide, die anstelle der Desoxyribose den Zucker Didesoxyribose enthalten, führt dies an der Stelle, an der das Didesoxynucleotid eingebaut wird zu einem Abbruch der Strangsynthese. Werden die vier Basen als unterschiedlich Fluoreszenzmarkierte Didesoxynucleotidtriphosphate (DDNTPs) hinzugegeben, erhält man unterschiedlich lange Fragmente, die aufgrund der speziellen Fluoreszenzmarkierung mit einer bekannten Base enden. Durch die Verwendung nur eines Primers sinkt zwar die Effizienz dieser Reaktion, aber es ist sichergestellt, dass alle Fragmente nur von einem Strang stammen. Mittels einer hochauflösenden Gelelektrophorese und einer genauen Fluoreszenzdetektion kann bei ausreichender Zahl der Strangabbrüche und Replikate die Folge der Basen innerhalb des Stranges direkt aus der Folge und der Fluoreszenz der sich in der Länge um eine Base unterscheidenden Fragmente ermittelt werden.

Für die Kettenabbruchreaktion wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v 1.1 verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 9: Für die Sequenzierreaktion verwendete Reagenzien, Mengenangaben bezogen auf einen Reaktionsansatz

Reagenz	Hersteller	Menge	Bemerkungen
Cycle Sequencing Buffer	Applied Biosystems	2 µl	
Reaction Premix	Applied Biosystems	4 µl	
H ₂ O _{bidest}	-	3,68 µl	
Primer	Thermo	0,32 µl	Verdünnt auf 10 pmol/µl
Gereinigtes PCR-Produkt	-	10 µl	

Vor der Gelelektrophorese wurden die Produkte mittels des DyeEx Kits von Qiagen von überschüssigen Fluoreszenzmarkern und Oligonukleotiden befreit. Für die Gelelektrophorese und die Fluoreszenzdetektion wurde der Sequencer ABIprism 377 und ein Acrylamidgel verwendet. Als Puffer diente im Gel und in der Gelelektrophorese TBE-Puffer (Rotiphorese[®] 10x TBE-Puffer, Carl Roth)

Zur Herstellung des Acrylamidgels wurden zunächst 18 g Harnstoff (Amresco) mit 26 ml H₂O_{bidest}, 5 ml TBE-Pufferkonzentrat (Rotiphorese[®] 10x TBE-Puffer, Carl Roth) und 5 ml Long Ranger Gel Solution (Cambrex) gelöst. Die Lösung wurde anschließend durch einen Zelluloseacetatfilter, Porengröße 0,2 µm (Sartorius) filtriert und 15 min im Vakuum entgast. Danach wurden 35 µl TEMED (Amresco) und 250 µl 1 %ige Ammoniumpersulfatlösung (Ammoniumpersulfat: Amresco) zugegeben und das Gel sofort zwischen die vorbereiteten Glastplatten (48 cm Länge) des Sequenzers gegossen. Die Komponenten des Acrylamidgels sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Erkennung und Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte automatisch mit der ABI Prism DNA Sequencing Analysis Software v. 3.3 (Applied Biosystems).

Tabelle 10: Für die Herstellung des Sequenziergels verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Menge	Bemerkungen
Harnstoff	Amresco	18 g	
TBE Puffer	Carl Roth	5 ml	
H ₂ O _{bidest}	-	26 ml	
Long Ranger Gel Solution	Cambrex	5 ml	
TEMED	Amresco		
Ammoniumpersulfat	Amresco		

4.3.3 Analyse der Sequenzen

Die vom Sequencer bzw. der o.g. Software gelieferten Sequenzen wurden zunächst manuell auf Erkennungsfehler der Software überprüft. Aus den verschiedenen Sequenzabschnitten der jeweiligen Stämme wurden mit dem Programm Bioedit Version 7.0.1 (HALL 1999) eine zusammenhängende Sequenz errechnet. Das Gesamtalignment, also das Nebeneinanderlegen gleicher Sequenzbereiche aller Proben, wurde mit dem Programm Clustal W (THOMPSON 1994) vorgenommen und per Hand korrigiert. Beim Alignment wurde zwischen fehlenden Sequenzabschnitten und durch Deletionen entstandene Lücken bzw. durch Insertionen beim Alignment nötigen Lücken in den übrigen Sequenzen unterschieden.

Die fertig angeordneten Sequenzen wurden weiter mit dem Programm PAUP Version 4.0b10 für Macintosh (SWOFFORD 2003) analysiert.

Für jeden untersuchten DNA-Bereich, also ITS1, ITS2 und SSU wurden jeweils Dendrogramme nach Parsimony-Kriterien und nach Distance-Kriterien errechnet. Verwendet wurden dabei weitgehend die im Programm PAUP vorgegebenen Standardeinstellungen. Lücken („gaps“) wurden entgegen der Standardeinstellung als fünfte Base behandelt. Die maximale Zahl an Bäumen im Zwischenspeicher des Programms wurde fest auf 5000 eingestellt.

Aus den Stammbäumen der phylogenetischen Einzelanalysen nach Parsimony-Kriterien wurde mit Hilfe des Programms Rainbow (CHEN ET AL. 2004) ein Gesamtbaum („Supertree“) generiert. Die Dendrogramme der Analysen nach Distance-Kriterien wurden nicht in den Supertree einbezogen, da aufgrund der unterschiedlichen Sequenzlängen bei den SSU-Sequenzen die Gefahr von Artefakten bestand.

4.4 Morphologische Analysen

Die Systematik der *Nitzschia lanceolatae* basiert derzeit im Wesentlichen auf der morphologischen Unterscheidung der Algenzellen. Um einen Vergleich der Ergebnisse aus genetischen Untersuchungen mit der „klassischen“ Systematik ziehen zu können, ist es nötig, die genetisch untersuchten Algenklone auch

morphologisch genau zu charakterisieren. Darüber hinaus sind die Untersuchungsmöglichkeiten im Bereich der morphologischen Analyse durch Rasterelektronenmikroskopie und computerbasierte Bilderfassungs- und Analysemethoden in den vergangenen Dekaden deutlich gegenüber dem Stand von 1979, als die letzte umfassende Revision des hier untersuchten Sippenkomplexes veröffentlicht wurde (LANGE-BERTALOT & SIMONSEN, 1979), erweitert worden. In Kombination mit den Ergebnissen der Sequenzanalysen ist auch die Möglichkeit gegeben, Merkmale auf ihre Eignung zur Differenzierung natürlicher Gruppen zu überprüfen. Die angewandten Methoden zur morphologischen Analyse der untersuchten Stämme seien im folgenden dargestellt.

4.4.1 Herstellung mikroskopischer Präparate

Die Untersuchung der Schalen- und Zellmorphologie der isolierten und molekularbiologisch analysierten *Nitzschia*-Stämme stellt verschiedene Anforderungen an die Präparation des Materials für die Mikroskopie. Zur Untersuchung von Zellorganellen und Strukturen sowie zur Bewertung des Verhaltens und der Beweglichkeit der lebenden Zelle ist es wichtig, diese möglichst wenig zu stören, um Artefakte zu vermeiden. Bei der Untersuchung der Schalenmorphologie am Lichtmikroskop ist es in Hinblick auf die ausreichende Kontrastierung durch Phasenkontrast- oder Interferenzkontrastverfahren wichtig, die *Nitzschia*-Schalen möglichst weitgehend von Membranen und Zellinhaltsresten zu befreien. Eine Abtrennung der Ober- von der Unterschalen ist in den meisten Fällen bei der Untersuchung der Schalenmorphologie erwünscht. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Frusteln ist es schließlich nötig, jegliche Stoffe aus der Probe zu entfernen, die im Hochvakuum verdampfen.

4.4.1.1 Untersuchung vollständiger Diatomeenzellen

Zur Beobachtung lebender Zellen wurden 20 µl der zuvor durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen mit einer Kolbenhubpipette suspendierten Kultur auf einen Objektträger getropft und mit einem Deckglas mit 12 mm Durchmesser (Marienfeld) abgedeckt.

Zur besseren Darstellung von Vakuolen und anderen Zellinhalten wurden die lebenden Zellen auf dem Objektträger mit einer 0,15% igen wässrigen Brilliantkresylblaulösung (Merck) angefärbt.

Für die Fotografie von Chloroplasten und Membransystemen im Fluoreszenzmikroskop wurde zu dem aufgetropften und abgedeckten, vitalen Zellmaterial für 10 min in eine Lösung aus 100 ml H₂O und 10 mg Rhodamin B (Fluka) gegeben. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt und Farbstoffreste mit sterilfiltriertem Leitungswasser ausgewaschen.

Um Dauerpräparate von kompletten Zellen herzustellen, wurden die Zellen zunächst mit einer Fixierlösung aus 10 ml Formaldehydlösung 40 %ig (Fluka), 10 ml Essigsäurelösung 12 %ig (Prolabo) und 90 ml Methanol (J. T. Baker) behandelt. 20 µl des fixierten Materials wurden auf einen Objektträger aufgetropft und für einige Zeit stehen gelassen, so dass der größte Teil der Flüssigkeit verdunsten konnte, die Präparate jedoch nicht vollständig austrockneten. Zu den auf diese Weise vorbereiteten Diatomeen wurde ein Tropfen Polyvinylalcohol-Einbettmedium (KREMER 2002) gegeben und ein Deckglas mit 12 mm Durchmesser (Marienfeld) aufgelegt und das Präparat mindestens 24 Stunden zum Trocknen bzw. Polymerisieren ruhig liegen gelassen.

4.4.1.2 Präparate von Diatomeenschalen

Nach der Entnahme der für die DNA-Extraktion notwendigen Menge an Algenzellen aus den Kulturen wurden weitere 200 µl der Zellsuspension für eine Erhaltungskultur entnommen und der Rest der Kultur sehr gründlich durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausdrücken mit einer Kolbenhubpipette in Suspension gebracht. Diese Suspension wurde komplett in ein Reaktionsgefäß mit 2 ml Volumen gegeben und bei 3000 Upm 15 min lang zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 1 ml 30%igem H₂O₂ (Fluka) aufgespült. Die weitere Präparation folgt der Methode von VAN DER WERFF (1955).

Das oxidierte Schalenmaterial wurde auf Deckgläser mit 10 mm Durchmesser (Marienfeld) aufgetropft, die zuvor 1 Stunde bei 400°C ausgeglüht wurden, und zum Trocknen über Nacht stehen gelassen.

Für die Analyse am Lichtmikroskop wurden die Kieselalgenschalen, die sich nach dem Trocknen auf den Deckgläsern befanden, in Naphrax™ (Brunel Microscopes Ltd.) eingebettet. Für die Verwendung am Rasterelektronenmikroskop wurden die Deckgläschen mit den sich auf ihrer Oberseite befindenden Diatomeen mit Hilfe eines selbstklebenden Leittabs, (G3347 von Plano GmbH) auf einen Probenteller aus Aluminium mit 15 mm Durchmesser (G3313 von Plano GmbH) aufgeklebt und in einem Sputter-Coater (Polaron SC502 von Fisons Instruments) mit einer dünnen Goldschicht überzogen.

4.4.2 Untersuchung am Lichtmikroskop

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen der kompletten Zellen wurde das Mikroskop Leitz DMR 180 mit Interferenz- oder Phasenkontrasteinrichtung bzw. nach Fluoreszenzfärbungen mit Epifluoreszenzeinrichtung und -filtern verwendet. Die Kieselalgen wurden dabei bei 400facher und 1000facher Vergrößerung beobachtet und digital fotografiert. Hierzu diente die Kamera Kappa DX20 in Verbindung mit der Software Kappa ImageBase 2.7.2 (KAPPA opto-electronics GmbH). Zur Archivierung der Bilddaten wurde die in ImageBase enthaltene Datenbank Noah verwendet.

Die präparierten Schalen der Kieselalgen wurden jeweils mit 1000facher Vergrößerung mit dem Mikroskop Leitz DMR 180 bzw. 1200facher Vergrößerung mit dem Mikroskop Leitz Aristoplan untersucht. Zur digitalen Fotografie diente die oben erwähnte Kamera und Software. Sofern es die Präparate zuließen, wurden pro Stamm mindestens 20 vollständige Schalenhälften bzw. Zellen fotografiert und die Bilddaten archiviert.

4.4.3 Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop (REM)

Für die Aufnahme der morphologischen Merkmale stand ein Rasterelektronenmikroskop S2300 von Hitachi zur Verfügung. Das Gerät ist mit einem System zur digitalen Bildverarbeitung und Strahlsteuerung des REM der Firma Point-Elektronik nachgerüstet.

Die Speicherung der Bilder erfolgte mit dem Datenbankprogramm Noah des Programmpakets Kappa ImageBase 2.7.2 (KAPPA opto-electronics GmbH)

Ganze Frusteln wurden am REM je nach Größe der Schalen mit 1000facher bis 4000facher Vergrößerung aufgenommen, Details des Schalenbaus mit bis zu 20000 facher Vergrößerung. Im Gegensatz zum LM, dass ein „Durchblick“ durch die Schalen ermöglicht, ist am REM nur ein Betrachten der Oberfläche möglich. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Möglichkeiten, die die vorhandenen Präparate boten, darauf geachtet, möglichst ausreichend Innen- und Aussenansichten aufzunehmen, um die untersuchten Merkmale sicher zu erfassen. Zur Erfassung der quantitativen Merkmale wurde versucht, mindestens 20 geeignete Schalenansichten zu untersuchen.

4.4.4 Erfassung Morphologischer Parameter

4.4.4.1 Quantitativ erfassbare Merkmale

Bei der Erhebung der morphologischen Merkmale der untersuchten *Nitzschia*-Stämme wurde versucht, möglichst viele der nur subjektiv erfassten Merkmale, wie „etwas kopfige Enden“ oder „Spitzen stumpf gerundet“ durch objektiv messbare Merkmale zu ersetzen.

Die Vermessung der quantitativen Schalenmerkmale erfolgte mit Metreo 2.7.2, dem Planimetrieprogramm des oben genannten Kappa-Programmpakets. Da die lichtmikroskopischen Aufnahmen mit einheitlicher Vergrößerung aufgenommen wurden, war nur eine Kalibrierung des Vermessungsprogrammes für jedes Mikroskop nötig. Diese wurde mit Hilfe eines Objektmikrometers vorgenommen, das bei den gleichen Einstellungen an Mikroskop und Software fotografiert wurde, die auch für die Untersuchung der Algen gewählt wurden. Während des Arbeitens wurde anhand eines solchen Bildes des Objektmikrometers die Kalibrierung gelegentlich überprüft. Am REM waren für jede der verwendeten Vergrößerungen und Aufnahmeauflösungen eine eigene Kalibrierungen nötig. Diese wurde mit Hilfe der in die Bilder eingebrannten Meßbalken erstellt. Vor der Vermessung jedes Bildes wurde anhand dieses Meßbalkens überprüft, ob die ausgewählte Kalibrierung korrekt ist. Die für die Erzeugung der Meßbal-

ken nötige Software wurde bei der Installation des digitalen Bildverarbeitungssystem WINDISS II vor Ort durch einen Mitarbeiter der Firma Point Electronic kalibriert.

Folgende quantitativ erfassbare Merkmale wurden vermessen bzw. errechnet, sofern die Qualität der Präparate die Messungen zuließ:

Gesamtlänge der Schale (Abbildung 5a)

Die Gesamtlänge (l) der Schale wurde als die gerade Strecke zwischen den beiden äußersten Schalenrändern der Zellpole vermessen.

Breite der Schale (Abbildung 5b und 5c)

Bei den über einen größeren Teil der Schalenlänge weitgehend parallel verlaufenden Rändern der Frusteln vieler *Nitzschia*-Stämme wurde die Breite (b) der Schale etwa in der Schalenmitte vermessen. Bei einer innerhalb eines Stammes regelmäßig auftretenden Einschnürung der Schale an der Mitte wurde abgeschätzt, wo die (intakte) Schale am breitesten ist und die entsprechende Breite (b_{\max}) gemessen. Zusätzlich wurde in einem solchen Fall auch die Breite der Schale an der eingeschnürten Mitte (b_{mitte}) ermittelt (Abbildung 5c).

Zellproportion

Hierzu wurde das Verhältnis der Gesamtlänge (l) zur Breite (b) bzw. der maximalen Breite (b_{\max}) einer Frustel gebildet.

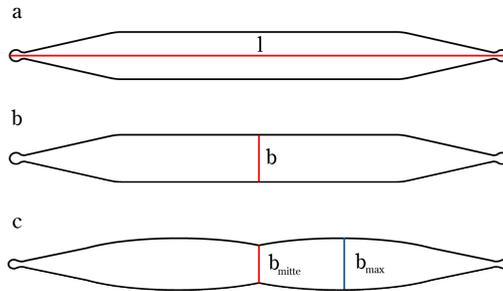


Abbildung 5a: Messung der Gesamtlänge l ;
b: Messung der Gesamtbreite b ;
c: Breitenmessung bei eingeschnürten Zellende

Köpfchen (Abbildung 6)

Im Falle eines deutlich vorhandenen Köpfchens am Schalenende wurde die maximale Breite des Köpfchens (k) sowie die geringste Breite der Einschnürung (i), die das Köpfchen von dem Rest der Frustel absetzt, vermessen. Um Vergleichsdaten mit Stämmen mit wenig ausgeprägten oder ohne Köpfchen zu erhalten, wurde anstelle der Köpfchenbreite die Breite der Schale an der Stelle ermittelt, an der die starke Rundung des Zellpols in den deutlich schwächer gerundeten Bereich übergeht. Anstelle der Breite der Einschnürung am Zellende wurde die Breite an der Stelle gemessen, an der die konvexe Rundung des Zellpols in die leicht konkave Rundung am Ende der Zelle übergeht. Der Quotient aus der Köpfchenbreite (k) und der Isthmusbreite (i) wurde errechnet und verwendet, um eine Aussage über das Vorhandensein bzw. die Ausprägung eines Köpfchens am Zellpol machen zu können.

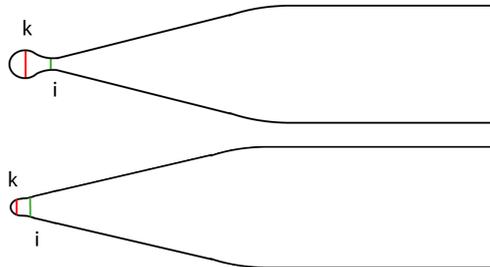


Abbildung 6: Vermessung der Köpfchenbreite k (rot dargestellt) und Isthmusbreite i (grün dargestellt)

Öffnungswinkel der Zellspitze (Abbildung 7)

Im sich verjüngenden distalen Bereich der Schalen wurde der Winkel (α) gemessen, den die aufeinander zulaufenden Schalenseiten bilden. Der Zellpol mit seiner Ausbildung als Köpfchen bzw. als leicht schnabelförmig vorgezogenes Ende wurde hierbei nicht mit einbezogen.

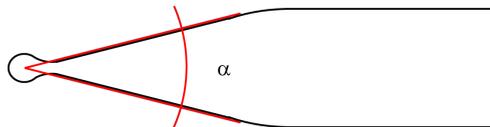


Abbildung 7: Vermessung des Öffnungswinkels der Zellspitze

Fibulae (Abbildung 8)

Zur objektiven Beschreibung der Fibulae wurde die Dichte der Fibulae als Zahl der Fibulae auf $10\ \mu\text{m}$ Zelllänge, die Länge und Breite der Fibulae sowie deren Abstand zueinander gemessen. Da eine exakte Bestimmung der Fibulalänge (f) aufgrund deren räumlicher Anordnung und Wölbung nur in einem Zellquerschnitt möglich wäre, wurde als vergleichbares, reproduzierbares Maß die Länge in der Projektion gewählt. Gemessen wurde demnach vom Innenrand der Schale bis zu der gedachten Linie, an der sich die Kante zwischen Zellinnenseite und Raphenkanal befinden würde. Die Breite der Fibulae (w) und die Abstände (d) wurden jeweils in den Mitten der Fibulae gemessen. Als Kenngröße

für die Regelmäßigkeit der Fibulae wurde die Standardabweichung des Abstandes zwischen den Fibulae ermittelt. Desweiteren wurde das Verhältnis von projizierter Länge zur Breite der Fibulae errechnet, um ein Maß für die Proportionen der Fibulae zu erhalten.

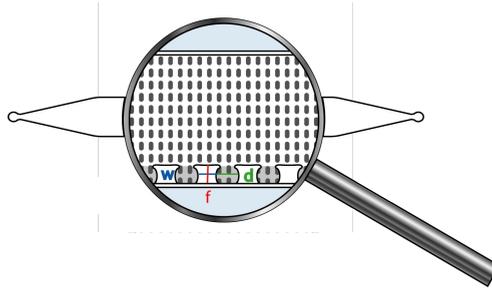


Abbildung 8: Messungen der Fibulalänge f (rot), der Fibulabreite w (blau) und des Abstandes zwischen zwei Fibulae d (grün)

Streifen und Areolen

Die Dichte der Streifen wurde als Anzahl der Streifen pro $10\ \mu\text{m}$ ermittelt, die Dichte der Areolen als Anzahl der Areolen pro $1\ \mu\text{m}$.

Projektionsfläche und Umfang

Der maximale Umfang der Schalen in der Valvaransicht sowie die Projektionsfläche der Valvaransicht wurde mit Hilfe der Polygonfunktion des Programms Metreo ermittelt. Es handelt sich hierbei zwar um eine Näherung, die Abweichungen gegenüber dem tatsächlichen Umfang bzw. der tatsächlichen Fläche sind jedoch als vernachlässigbar anzusehen. Aus dem Umfang wurde weiterhin die Fläche eines Kreises mit dem gleichen Umfang errechnet und diese mit der Projektionsfläche der Schale ins Verhältnis gesetzt. Dieser Quotient erlaubt eine Abschätzung, wie weit der Zellumriss von einer Kreisform entfernt ist. Im Folgenden wird dieses Verhältnis als Rundheit bezeichnet.

4.4.4.2 *Qualitativ erfassbare Merkmale*

Neben den quantifizierbaren Merkmalen wurde eine Reihe von Merkmalen erfasst, die nur qualitativ erfassbar sind. Zum einen sind dies Merkmale, die entweder vorhanden oder nicht vorhanden sein können. Zum anderen handelt es sich auch um solche Charakteristika wie die Form eines Merkmals. Qualitativ erfassbare Merkmale, deren Auftreten bzw. Fehlen in dieser Arbeit berücksichtigt wurden, sind:

- Verdoppelung der Areolenreihen im Bereich des Raphenkanals (Abbildung 9)
- Zentralknoten bzw. zentrale Raphenenden (nach MANN 1981, Abbildung 10)
- Poroide zwischen Helictoglossa und dem Schalenrand am Zellpol (Abbildung 11)

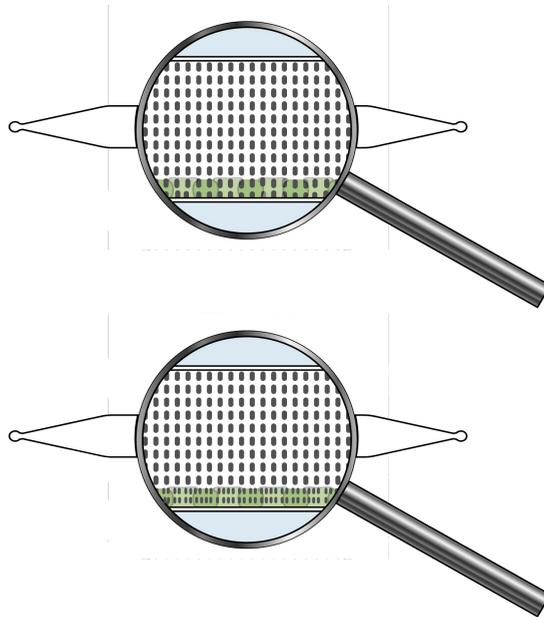


Abbildung 9: Verdoppelte Areolenreihen im Bereich des Raphenkanals (grün hinterlegt); obere Zelle ohne Verdoppelung der Arolenreihen, unter Zelle mit Verdoppelung der Areolenreihen im Bereich des Raphenkanals

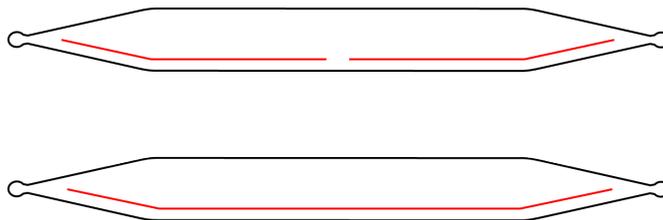


Abbildung 10: Obere Zelle mit zentralen Raphenenenden, unter Zelle ohne zentrale Raphenenende; Raphe rot eingezeichnet

Auf die Ausbildung eines Conopeums, von Stacheln auf der Aussenseite oder sonstigen Besonderheiten wurde während der morphologischen Untersuchungen geachtet. Es traten jedoch keine derartige Merkmale bei einem der untersuchten Stämme auf. Daher wird auf das Fehlen dieser Merkmale bei der morphologischen Beschreibung der einzelnen Stämme nicht gesondert hingewiesen.

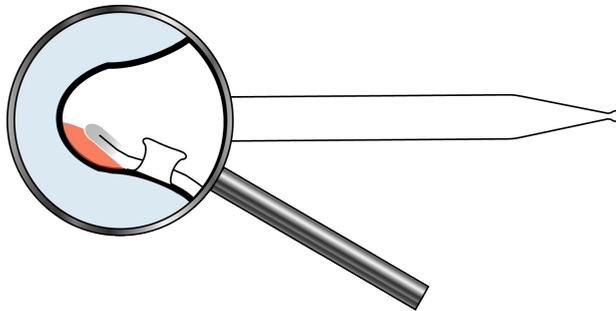


Abbildung 11: schematische Darstellung des Bereichs zwischen Helictoglossa und Schalenrand; Bereich ist rot hinterlegt;

Ergänzend zu den morphometrischen Kenngrößen, die den Schalenumriss beschreiben, wurde die allgemeine Form der Schale verbal beschrieben. Bei der Beschreibung wurde soweit möglich die Terminologie von KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1997) verwendet.

4.4.5 Untersuchungen zur Merkmalskonstanz

Wichtige Voraussetzung für die Verwendung eines morphologischen Parameters als Merkmal für eine taxonomische Unterscheidung ist die Kenntnis, inwieweit morphologische Parameter aufgrund von Umweltparametern variieren. Diese Variabilität wurde sowohl im Freiland als auch im Labor untersucht.

4.4.5.1 Freilandversuche

In Zusammenarbeit mit Silvia Czanderle wurden im Zeitraum von Juli 2002 bis November 2002 in monatlichen Abstand Proben von der Sedimentoberfläche des Waschsees, des Fohnsees, des Lustsees, des Fischkaltersees, des Herrensees und des Eishaussees entnommen. Parallel dazu wurden in Tiefenprofilen pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoffsättigung, Temperatur und Sichttiefe gemessen sowie die Konzentrationen von gelöstem reaktiven Phosphat (SRP), Gesamtphosphat (TP), Nitrat und Ammonium bestimmt. Detaillierte Beschreibungen zu den Messungen finden sich in CZANDERLE (2003).

Von den Sedimentproben wurden Schalenpräparate für das Lichtmikroskop hergestellt (siehe 3.4.1.2). Die in diesen Präparaten enthaltenen *Nitzschia*-Schalen wurden digital fotografiert (siehe 4.4.1), nach morphologischen Gesichtspunkten bestimmt und die als konspezifisch klassifizierten Frusteln bezüglich der Variabilität ihrer Länge, Breite und Fibulaedichte untersucht. Auf die Untersuchungen weiterer Merkmale wurde verzichtet, da diese nur am REM sicher angesprochen werden können und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen den hier gegebenen Rahmen gesprengt hätten. Desweiteren wurde überprüft, ob es Zusammenhänge zwischen den Merkmalsausprägungen und den erfassten Umweltparametern gibt. Hierzu wurden die Daten mittels eines Kolmogorow-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft. Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde nur eine Spearman-rho-Korrelationsanalyse durchgeführt, im Falle von normalverteilten Daten zusätzlich eine Korrelationsanalyse nach Pearson.

4.4.5.2 Laborversuche

Unter den kontrollierten Bedingungen der unter Punkt 4.2.2 beschriebenen Klimakammer wurden mehrere Stämme auf Nährböden unterschiedlicher Phosphat und/oder Stickstoffkonzentrationen kultiviert (EBERLE 2004).

Die Versuche wurden in Mikrowellplatten mit 96 Wells (TPP) durchgeführt. Die Platten wurden mit je acht verschiedenen Konzentrationen und vier Stämmen mit jeweils drei Parallelen beimpft. Für einen kombinierten Versuch mit einem Phosphat- und einem Nitratgradienten wurden acht Phosphatkonzentrationen und vier Nitratkonzentrationen mit einem Stamm in drei Parallelen beimpft. Jedes der Wells wurde mit 200 μ l der Medien befüllt. Als Grundlage für die Nährböden diente das Medium „CHU-10“ (siehe 4.2.1.2).

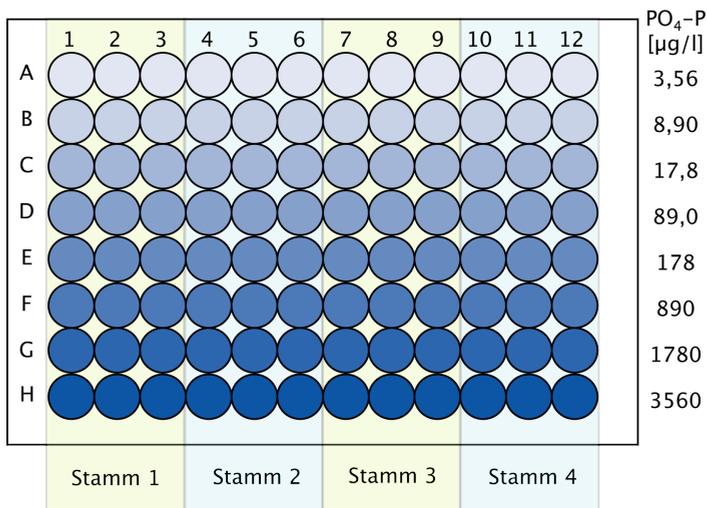


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Phosphatversuchs. Die PO₄-P-Konzentrationen der horizontalen Reihen sind am rechten Rand angegeben. Die Zahlen und Buchstaben am oberen und linken Rand entsprechen der Nummerierung der Wells auf den verwendeten Mikrowellplatten.

Material und Methoden

In der Versuchsreihe mit dem Phosphatgradienten (Versuchsschema und Konzentrationen siehe Abbildung 12) und dem kombinierten Phosphat- und Nitratgradienten (Abbildung 13) wurden statt der Stammlösung CHU3 als Phosphatquelle verschieden konzentrierte Lösungen von K_2HPO_4 (wasserfrei, Merck) verwendet. Im kombinierten Versuch wurden statt der Stammlösung CHU 2 Lösungen mit unterschiedlichen Gehalten an $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$ (Fluka) eingesetzt.

Für die Versuchsreihe über einen Silikatgradienten (Abbildung 14) wurde die Stammlösung CHU 1 durch verschieden konzentrierte Na_2SiO_3 -Lösungen ersetzt.

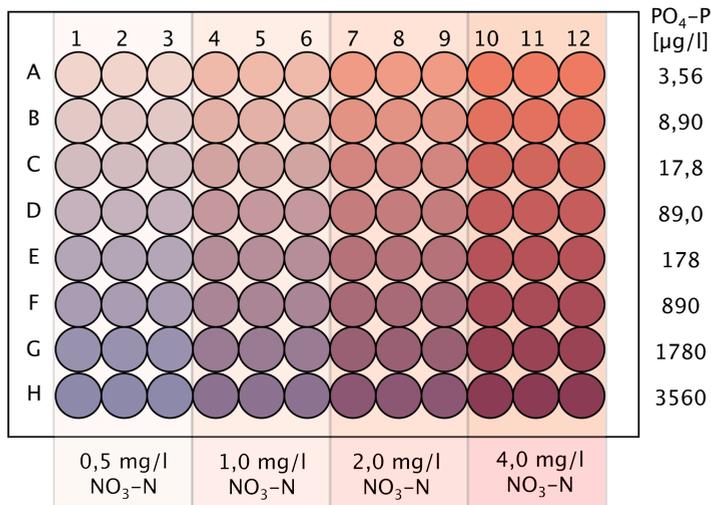


Abbildung 13: Schematische Darstellung des kombinierten Phosphat- und Nitratversuchs; am rechten Rand sind die verwendeten $PO_4\text{-P}$ -Konzentrationen angegeben, am unteren Rand die verwendeten $NO_3\text{-N}$ -Konzentrationen.

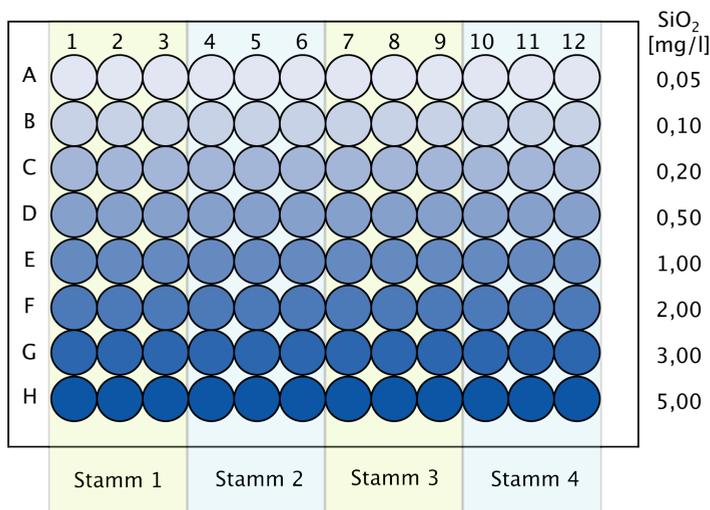


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Silikat-Versuchs; am rechten Rand sind die verwendeten Silikatkonzentrationen angegeben.

Die zum Beimpfen des Phosphatversuches verwendeten monoklonalen Kieselalgenkulturen wurden zwischen November 2003 und April 2004 aus Periphytonproben des Tiefenbachs bei Polling (Stamm TP-M), des Starnberger Sees bei Garatshausen (Stamm SGO₃), des Sengsees (Stamm OS-M) und des Waschsee (Stamm OQ-M) isoliert und auf CHU-10 Medium vorkultiviert.

Für die Silikat- und die kombinierten Nitrat-/Phosphatversuche wurde aufgrund der schlechten Wüchsigkeit der Stämme TP-M, OS-M und OQ-M nur Stamm SGO₃ verwendet.

Die Kulturen in flüssigem Medium wurden vor dem Beimpfen durch vorsichtiges Schütteln in Suspension gebracht. Von der Suspension wurde pro Well 10 µl angeimpft.

Nach jeweils 28 Tagen Kulturzeit wurden die Kulturen durch mehrmaliges Aufziehen und Ausspülen mit einer Kolbenhubpipette in Suspension gebracht und Dauerpräparate für das Lichtmikroskop hergestellt (siehe 4.4.1).

Wie schon in den Freilandversuchen wurden die Zellen der Präparate hinsichtlich ihrer Länge, Breite und Fibulaedichte vermessen.

Die Messdaten wurden mittels Kolmogorow-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung der Daten überprüft. In normalverteilten Datensätzen wurde nach bestätigter Varianzgleichheit (Levene's Test) mit T-Test, One-way ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test nach signifikanten Unterschieden der Merkmale zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Nährstoffe gesucht. Datensätze, die die Kriterien der Normalverteilung und Varianzgleichheit nicht erfüllten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test und Median-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Nährstoffkonzentrationen getestet.

Mit den gleichen statistischen Methoden wurde überprüft, inwieweit sich die Zellen des Stammes SGO3 mit zunehmender Alterung des Stammes verändern.

4.4.6 Reproduzierbarkeit und Fehler der Messungen

Im Hinblick auf eine spätere Verwendung zur Differenzierung zwischen unterschiedlichen Taxa müssen die morphometrischen Merkmale auch von unterschiedlichen Anwendern mit guter Reproduzierbarkeit vermessen sein. Um den Fehler abschätzen zu können, der durch unterschiedliche Anwender entsteht, wurde ein Testdatensatz mit 15 verschiedenen Aufnahmen von Schalen zufällig ausgewählter Stämme erstellt. Mit diesem Datensatz wurden Messungen aller direkt messbaren Parameter von zehn verschiedenen Personen durchgeführt.

Für jeden vermessenen Parameter und jede Aufnahme wurde die Standardabweichung über die Ergebnisse aller vermessenden Personen errechnet. Für die jeweiligen Parameter wurden aus allen Standardabweichungen die Mittelwerte gebildet und gegeneinander verglichen.

4.4.7 Eignung zur Abgrenzung zwischen phylogenetisch begründeten Gruppen von Stämmen

Nach der Abgrenzung genetisch ähnlicher Gruppen wurden die einzelnen Merkmale der Gruppen, die Spannweiten der Merkmalsausprägungen innerhalb der Gruppen und die Überschneidung zwischen den genetischen Gruppen ermittelt. Hierzu wurden für jede genetische Gruppe zunächst Werte, die mehr als die zweifache Standardabweichung vom Mittelwert der Gruppe abweichen, als Ausreißer vermerkt und nicht in die weitere Analyse einbezogen. Von den verbliebenen Werten wurde die Spannweite der quantitativ erfassten Merkmale errechnet. Zur Analyse, inwieweit Überschneidungen vorliegen, wurde die Anzahl von vermessenen Zellen ermittelt, deren Merkmalsausprägungen auch in der Spannweite der jeweiligen Vergleichsgruppe liegen.

Als geeignete Differenzialmerkmale werden Merkmale akzeptiert, die zur Vergleichsgruppe keine Überschneidungen zeigen.

Qualitativ erfassbare Merkmale werden als geeignete Differenzialmerkmale akzeptiert, wenn ihre Ausprägungen innerhalb der Gruppen konstant sind und zwischen den Gruppen differieren.

5. Ergebnisse

5.1 Vergleich unterschiedlicher Nährmedien

In der Startphase der Arbeit wurde zur Kultivierung der Diatomeenstämme zunächst WC-Medium in der Modifikation von Goos (1999) verwendet. Die Anwachs- und Vermehrungsraten der Isolate auf diesem Medium blieben hinter den Erwartungen zurück, worauf die in Punkt 4.2.4 beschriebenen Versuche mit weiteren Medien durchgeführt wurden.

Dabei erbrachte das Medium CHU-10 die besten Kultivierungsergebnisse (Tab. 11). Auf fünf von zehn angeimpften Platten wuchsen die Algen gut. In zwei Fällen wurde ein schlechtes Wachstum beobachtet, unter anderem von einem der Stämme aus dem Lustsee, die bei der Verwendung anderer Medien überhaupt nicht anwuchsen. Beim modifizierten WC-Medium (Goos 1999) wuchsen die Algen auf drei der zehn Platten gut an, auf drei weiteren Platten wuchsen die Algen nur schlecht. Von den Platten mit DIAT-Medium wurde nur eine besiedelt.

Tabelle 11: Übersicht der Wachstumsbonitierung der im Vorversuch getesteten Nährböden,

o: kein Wachstum, (+): schlechtes Wachstum, +: gutes Wachstum

Stamm	CHU-10	WC	DIAT
Unbenannter Stamm(1) aus dem Lustsee	o	o	o
	o	o	o
Unbenannter Stamm(2) aus dem Lustsee	o	o	o
	(+)	o	o
OGO2 (aus dem Gröbensee)	+	(+)	o
	+	(+)	o

Ergebnisse

<i>Stamm</i>	<i>CHU-10</i>	<i>WC</i>	<i>DIAT</i>
OR01	+	+	0
(aus dem Forchensee)	(+)	+	0
OR02	+	+	0
(aus dem Forchensee)	+	(+)	(+)
Mit sterilem Wasser „angeimpft“	0	0	0

Ein Vergleich der Anwachsrate von frisch isolierten Einzelzellen über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit (siehe Tabelle 12) zeigt, dass mit 19 % die Anwachsrate auf CHU-A, einem CHU-10 Medium (flüssig) mit einem Zusatz von 63 mg Chloramphenicol pro Liter Nährmedium am höchsten waren. Die zweitbeste Erfolgsquote bei der Isolation der Kieselalgen konnte mit Medium CHU-E, einem Gemisch aus einer Hälfte CHU-10 und einer Hälfte sterilisiertem Wasser vom Standort, von dem das Algenmaterial stammt, erreicht werden. Das als Ersatz für das schwer sterilisierbare CHU-E-Medium konzipierte HWD-Medium und das CR-1-Medium, dessen Rezeptur erfolgreich von der weltweit größten Diatomeenkultur unter der Leitung von David Czarnecki verwendet wird, erwiesen sich dagegen als völlig untauglich.

In der Gesamtzahl lieferte das CHU-E-Medium eine schlechtere Anwachsrate als das CHU-A-Medium. Aufgrund der (aus den Tabellen nicht hervorgehenden) Tatsache, dass das CHU-E-Medium auch bei „schwierigen“ Gewässern noch erfolgreiche Isolationen ermöglichte, wurde das CHU-E-Medium für die Arbeit favorisiert. Als Beispiel sind die Proben des Eishaussees zu nennen: Bei 94 Isolationsversuchen auf CHU-A-Medium konnte kein Stamm isoliert werden, bei 205 Isolationsversuchen auf CHU-E-Medium waren es dagegen 15

Stämme. Bei weiteren neun Versuchen wuchsen Kieselalgen anderer Gattungen (v.a. *Fragilaria*), die lebend bei 200 bis 400facher Vergrößerung morphologisch nicht von *Nitzschia* unterscheidbar waren.

Bei der Übertragung bereits isolierter *Nitzschia*-Klone wurden die besten Anwachsrate auf festem CHU-10 Medium mit 0,5 % Agar erzielt (Tabelle 13). Für die Herstellung von mikroskopischen Präparaten und die Isolation von DNA aus den kultivierten Diatomeen müssen Agarreste mit einem gewissen Aufwand entfernt werden. Daher wurde bei Algen, die auf festem Nährboden angezogen wurden, für das Umbetten vor allem das flüssige CHU-A-Medium verwendet. Insbesondere für Stämme aus Gewässern, die bei der Isolation große Schwierigkeiten bereiteten, wurde das Medium CHU-E verwendet. In CHU-A-Medium zeigten die Stämme mit 53 % noch akzeptable Anwachsrate. Auf dem CHU-E-Medium sind nur 34 % der Isolate angewachsen. Die hohe Erfolgsquote auf dem CR-1-Medium lässt sich dadurch erklären, dass hierauf vor allem Stämme umgebettet wurden, die von der Algensammlung in Dubuque bezogen wurden und somit schon etwas an die chemischen Verhältnisse eines ähnlichen Mediums gewöhnt waren.

Tabelle 12: Anwachsrate nach Isolationversuchen auf unterschiedlichen Nährböden

Nährmedium	Erläuterungen Nährmedium	Anzahl Kulturen	Anzahl erfolgreicher Kulturen	% erfolgreicher Kulturen
CHU10	CHU-10 mit 0,5 % Agar	467	49	10%
CHU-A (fest)	CHU-10 mit Chloramphenicol und 0,5 % Agar	88	5	6%
CHU-A	CHU-10 mit Chloramphenicol	314	60	19%

Ergebnisse

Nährmedium	Erläuterungen Nährmedium	Anzahl Kulturen	Anzahl erfolgreicher Kulturen	% erfolgreicher Kulturen
CHU-E	Hälfte CHU-10, Hälfte sterilisiertes Standortwasser	678	110	16%
WC	WC-Medium mit 0,5 % Agar	128	18	14%
HWD	Hartwassermedium	145	0	0%
CR-1		101	0	0%

Tabelle 13: Anwachsdaten bei Erhaltungskulturen auf verschiedenen Nährböden

Nährmedium	Erläuterungen Nährmedium	Anzahl Kulturen	Anzahl erfolgreicher Kulturen	% erfolgreicher Kulturen
CHU10	CHU-10 mit 0,5 % Agar	103	72	70%
CHU-A	CHU-10 mit Chlor- amphenicol	738	389	53%
CHU-E	Hälfte CHU-10, Hälfte sterilisiertes	222	75	34%

Ergebnisse

<i>Nährmedium</i>	<i>Erläuterungen Nährmedium</i>	<i>Anzahl Kulturen</i>	<i>Anzahl er- folgreicher Kulturen</i>	<i>% erfolg- reicher Kulturen</i>
	Standortwasser			
WC	WC-Medium mit 0,5 % Agar	18	6	33%
HWD	Hartwassermedium	435	38	9%
CR-1		56	34	61%

5.2 Genetik

Verschiedene molekularbiologische Techniken liefern Aussagen über die Evolution und die phylogenetische Verwandtschaft von Stämmen oder Taxa. Während die meisten Fingerprint-Techniken ein charakteristisches Bandenmuster liefern, anhand dessen häufig bis auf die Ebene von Individuen unterschieden werden kann, liefert die hier verwendete Sequenzierung von bestimmten DNA-Abschnitten eine charakteristische Basenfolge. Anhand dieser kann, je nach Auswahl des Abschnittes, bis auf die Ebene von Ordnungen, Gattungen, Species, selten auch bis auf Individuen-Ebene unterschieden werden. Der Vorteil der für diese Arbeit ausgewählten Sequenzierung ist die Vergleichbarkeit der Daten und die Verfügbarkeit von veröffentlichten Datenbanken. Letztere machen einen Vergleich der eigenen Sequenzen mit denen anderer Studien möglich. Von dieser Möglichkeit wird bei der Analyse der SSU-Bereiche (s.u.) ausführlich Gebrauch gemacht. Der Vergleich mit anderen Sequenzdaten erlaubt außerdem eine Prüfung, wie wahrscheinlich es ist, dass das analysierte Material tatsächlich vom zu untersuchenden Organismus oder beispielsweise von Kontaminationen der Kultur stammt.

Zur Sequenzierung wurden drei Abschnitte der sogenannten ribosomalen DNA verwendet. Die ribosomale DNA enthält die Erbinformationen für den Bau von Ribosomen. Sie gliedert sich in verschiedene Bereiche: In die nicht transkribierten Spacer (nontranscribed spacer, NTS) und die rDNA-repeats. Diese bestehen jeweils aus einem externen transkribierten Spacer (ETS), der Erbinformation für die 18s-Untereinheit der Ribosomen (small subunit, SSU), dem ersten transkribierten internen Spacer (internal transcribed spacer 1, ITS 1) der Erbinformation für die 5.8s-Untereinheit der Ribosomen, dem zweiten transkribierten internen Spacer (internal transcribed spacer 1, ITS 2) und der Erbinformation für die 28s-Untereinheit der Ribosomen (large subunit, LSU).

Der Nachteil der Sequenzierung ist die relativ hohe Anfälligkeit gegenüber verschiedenen „Versionen“ der sequenzierten Bereiche. Bereits ein Dimorphismus des sequenzierten Bereichs kann dazu führen, dass die Sequenz unlesbar wird. Kontaminationen mit fremder DNA, in denen die zu sequenzierenden Bereiche auch enthalten sind, können ebenfalls dazu führen, dass die Sequenzen nicht

auswertbar sind. In derartigen Fällen wäre eine Klonierung der DNA-Abschnitte nötig, um DNA-Sequenzen lesen zu können. Da hierbei jedoch transgene Bakterien erzeugt werden, ist diese Methode gesetzlich stark reglementiert und stand vor Ort nicht zur Verfügung.

Tatsächlich stellte diese Anfälligkeit der Sequenzierung für diese Arbeit ein großes Problem dar. Von 74 Stämmen, aus deren Kulturmaterial ausreichend DNA isoliert werden konnte, gelang es nur bei 27 Stämmen mindestens eine der drei sequenzierten Abschnitte in guter Qualität zu sequenzieren. Bei 12 weiteren lesbaren Sequenzen wurde ein Vergleich mit Datenbanken festgestellt, dass die Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht von dem zu untersuchenden Stamm, sondern von anderen Eukaryonten stammen.

5.2.1.1 Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1)

Der erste der drei sequenzierten DNA-Abschnitte, die ITS 1-Region, konnte bei 18 *Nitzschia*-Stämmen erfolgreich sequenziert werden. Eine Auflistung dieser Stämme findet sich in Tabelle 14.

Von den übrigen Stämmen war entweder die extrahierte DNA-Menge nicht ausreichend oder Sequenzüberlagerungen machten das Sequenzieren mit der verwendeten Methodik unmöglich.

Zum Zeitpunkt der Auswertung standen in den Datenbanken keine ITS1-Daten anderer, für ein Alignment ausreichend nah verwandter *Nitzschia*-Stämme zur Verfügung.

Ergebnisse

Tabelle 14: Auflistung der Stämme von denen die ITS 1-Region erfolgreich sequenziert wurde

Stamm	Herkunft	Isolationstag
• KG02	Sammlung für Algenkulturen, Göttingen	1942, genaues Datum unbekannt
• LG09	Lauterbach, Nähe Golfplatz Eschenlohe	12. September 2003
• LG11	Lauterbach, Nähe Golfplatz Eschenlohe	12. September 2003
• OA02	Ameisensee	21. September 2002
• OA03	Ameisensee	21. September 2002
• OA05	Ameisensee	01. September 2003
• OA11	Ameisensee	01. September 2003
• OH02	Herrensee	01. Oktober 2002
• OH03	Herrensee	01. Oktober 2002
• OH05	Herrensee	21. September 2002
• OL01	Lustsee	05. September 2003
• OS02	Sengsee	10. Juli 2003
• OW01	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
• OW03	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
• OW05	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
• OW09	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
• OW11	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
• SG01	Starnberger See, Nähe Garatshausen	20. August 2003

Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse unter Verwendung des Parsimony-Kriteriums ist in Abbildung 15 dargestellt, das der Analyse unter Verwendung von Distance-Kriterien in Abbildung 16. Als Außengruppe wurde für die Darstellung jeweils Stamm OS02 verwendet, da dieses der einzige Stamm ist, der deutlich nicht in den Sippenkomplex um *Nitzschia palea* gehört. Beide Dendrogramme zeigen im Wesentlichen die gleichen Zuordnungen. Die Stämme LG11 und LG09 werden relativ früh von den übrigen Stämmen abgetrennt, die aufgrund der Morphologie dem *palea-gracilis*-Komplex zugeordnet wurden. Die restlichen Stämme dieses Komplexes werden in zwei Gruppen separiert. Innerhalb des blassviolett hinterlegten Verwandtschaftskreises findet sich die enge Zusammengruppierung der Stämme OH05 und OA02 als konstantes, gut gesichertes Merkmal wieder. Im Falle des Parsimony-Dendrogramms (Abbildung 15) wird der obere Verwandtschaftskreis nicht weiter aufgelöst, die Reproduzierbarkeit bzw. die Bootstrapwerte für eine weitere Auflösung lagen somit unter 50%. In der weiter auflösenden Distance-Analyse wird Stamm OLO1 vom Rest des oberen Verwandtschaftskreises abgetrennt, der mit Bootstrapwerten von 75 % zusammengruppiert. Innerhalb dieser Gruppe findet sich neben der bereits beschriebenen Zusammengruppierung aus den Stämmen OH05 und OA02 ein mit einem Bootstrapwert von 68% nur schwach gesichertes Cluster aus den Klonen OH02, OW11, OA03 und – etwas enger zusammengruppierend – OW09 und OW03 (Bootstrap 60%).

Innerhalb der in den Dendrogrammen unteren, hellblau hinterlegten Gruppe wird Stamm SGO1 in beiden Analysen von den übrigen Stämmen dieser Gruppe abgetrennt. Die weitere Untergliederung dieser Gruppe zeigt, wie schon die vorhergehende Gruppe, im auf Parsimony basierenden Dendrogramm eine zu schwache statistische Absicherung. Die auf Distance-Kriterien basierende Analyse schlüsselt die Gruppe etwas weiter auf, wobei die Stämme OA11 und OW05 als am engsten verwandt dargestellt werden. Als einziger Stamm wird KGO2 (in den Dendrogrammen grau hinterlegt) abhängig von den gewählten Kriterien zur Errechnung der phylogenetischen Beziehungen unterschiedlich eingestuft. So stellt die Parsimony-Analyse KGO2 zur blassviolett hinterlegten Gruppe, während dieser Stamm von der Distance-Analyse als eigene Gruppe klassifiziert wird.

Ergebnisse

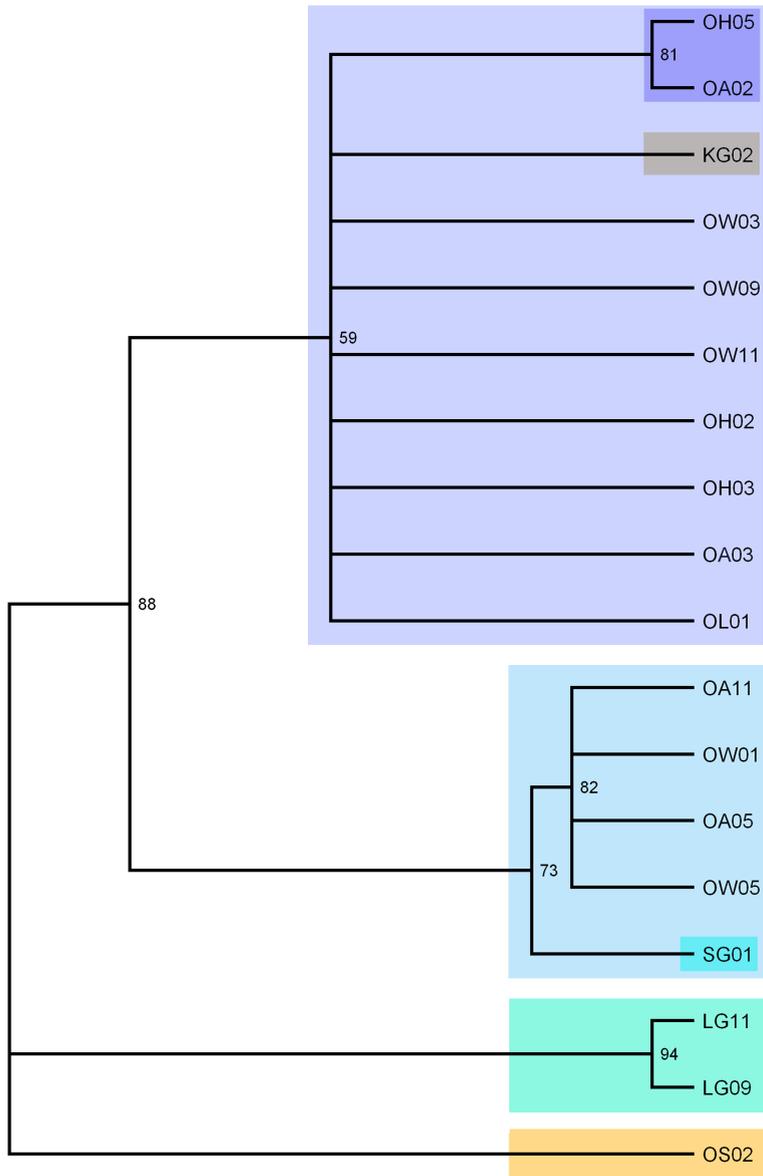


Abbildung 15: Dendrogramm mit Bootstrapwerten, basierend auf Sequenzanalyse der ITS 1-Region nach Parsimony-Kriterien (Abkürzungen siehe Seite 70)

Ergebnisse

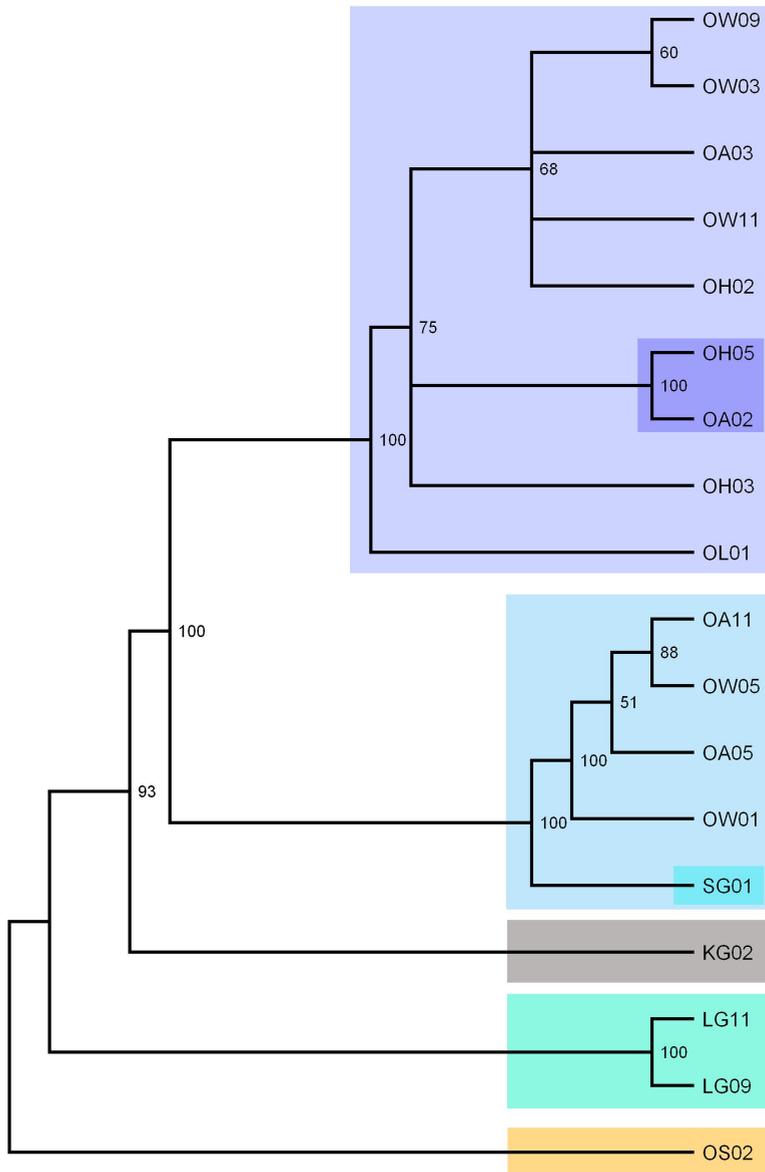


Abbildung 16: Dendrogramm mit Bootstrapwerten, basierend auf Sequenzanalyse der ITS 1-Region nach Distance-Kriterien (Abkürzungen siehe Seite 75)

5.2.1.2 Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2)

Aus den oben erwähnten Gründen konnten auch hier nicht alle vorhandenen Stämme zur DNA-Sequenzierung erfolgreich verwendet werden. Von der ITS2-Region wurden 18 Sequenzen analysiert, die von den in Tabelle 15 aufgelisteten *Nitzschia*-Stämmen stammen.

In den zur Verfügung stehenden Datenbanken waren zum Zeitpunkt der Analyse keine ITS2-Sequenzen von Taxa verfügbar, die für ein klassisches Alignment ausreichend nahe verwandt waren.

Die Dendrogramme der Parsimony- (Abbildung 17) und Distance-Analysen (Abbildung 18) zeigen ein sehr ähnliches Bild. In beiden findet sich eine durch hohe Bootstrapwerte von stets 100% gestützte Gruppe, in der die Stämme OAO8, OQO9, SGO1 und SUO1 vereint werden (türkisblau hinterlegt). Der Rest der Stämme – den als Außengruppe definierten Stamm OSO2 ausgenommen – findet sich in einer, wie die Bootstrapwerte anzeigen, nicht sehr gut gesicherten Gruppe, die sich wiederum in zwei sehr gut gesicherte Untergruppen aufspaltet. Im Dendrogramm der Parsimony-Analyse werden diese beiden Untergruppen nicht weiter aufgelöst. In den Ergebnissen der Distance-Analyse wird in der oben dargestellten, blassviolett hinterlegten Gruppe jeder Stamm einzeln aufgelöst wobei die Stämme SUO2 und OAO3 als am nächsten verwandt dargestellt werden. In der darunter dargestellten, hellblau hinterlegten Gruppe werden die Stämme OWO1 und OAO11 mit Bootstrapwerten von 100% für die Restgruppe jeweils einzeln gestellt, die Stämme ORO2, OAO5, SUO3 und OW5 in eine Gruppe vereint.

Ergebnisse

Tabelle 15: Auflistung der Stämme, von denen die ITS 2-Region erfolgreich sequenziert wurde

Stamm	Herkunft	Datum der Isolation
LG09	Lauterbach, Nähe Golfplatz Eschenlohe	12. September 2003
OA03	Ameisensee	21. September 2002
OA05	Ameisensee	01. September 2003
OA08	Ameisensee	01. September 2003
OA11	Ameisensee	01. September 2003
OE03	Eishaussee	04. November 2003
OH04	Herrensee	21. September 2002
OH05	Herrensee	21. September 2002
OL01	Lustsee	05. September 2003
OQ09	Waschsee	16. Februar 2004
OR02	Forchensee	13. November 2002
OS02	Sengsee	10. Juli 2003
OW01	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
OW05	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
SG01	Starnberger See, Nähe Garatshausen	20. August 2003
SU01	Starnberger See, Nähe Unterzeismering	05. Juni 2003
SU02	Starnberger See, Nähe Unterzeismering	05. Juni 2003
SU03	Starnberger See, Nähe Unterzeismering	05. Juni 2003

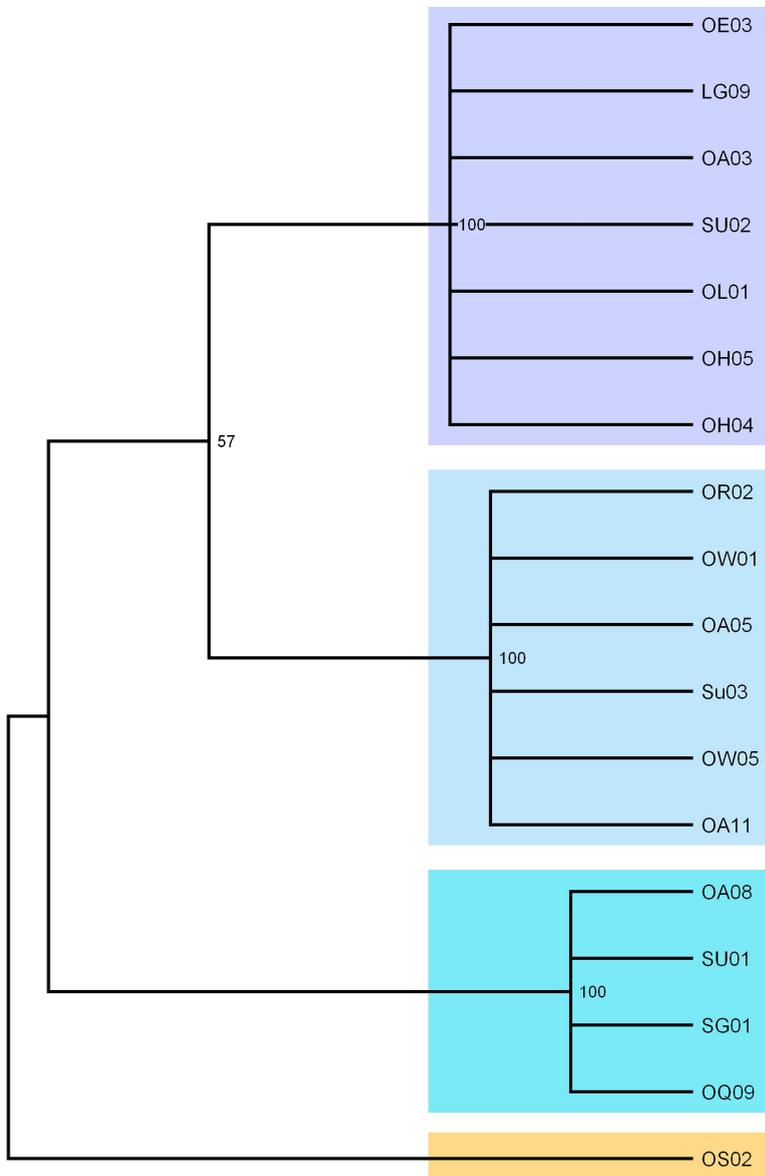


Abbildung 17: Dendrogramm mit Bootstrapwerten, basierend auf Sequenzanalyse der ITS 2-Region nach Parsimony-Kriterien (Abkürzungen siehe Seite 75)

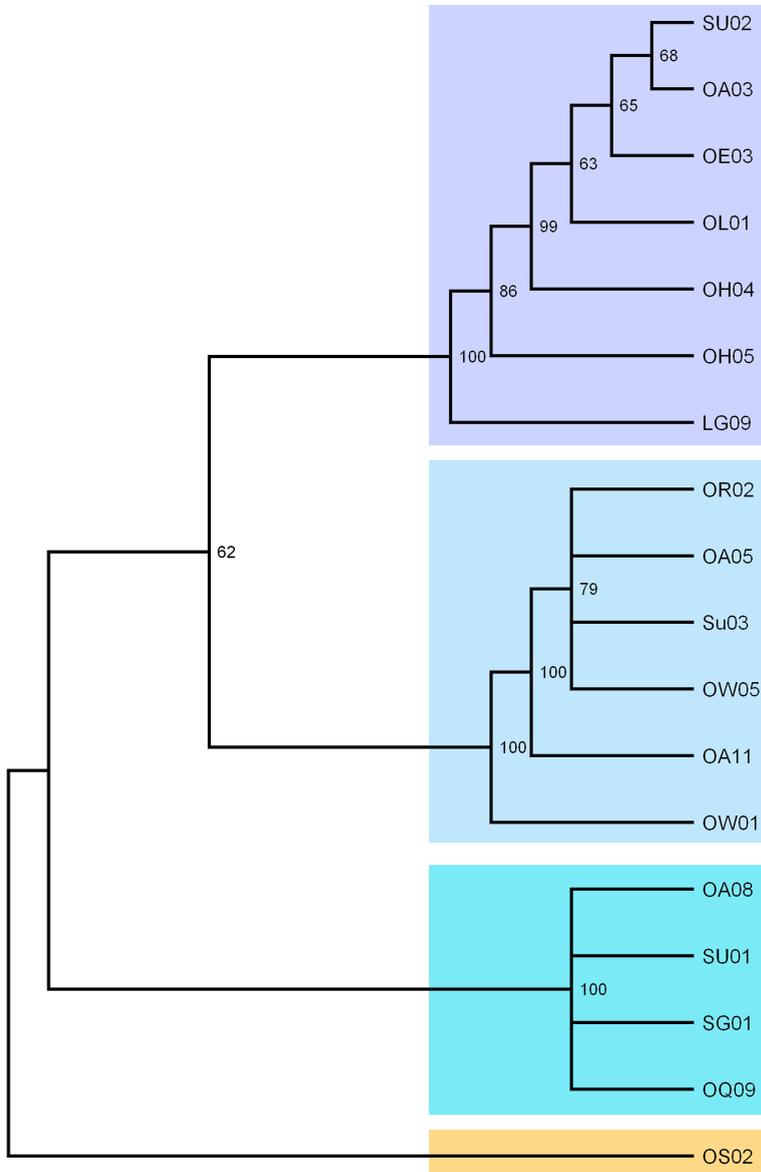


Abbildung 18: Dendrogramm mit Bootstrapwerten, basierend auf Sequenzanalyse der ITS 2-Region nach Distance-Kriterien (Abkürzungen siehe Seite 75)

5.2.1.3 *Small Subunit (SSU)*

Bei der dritten der untersuchten Sequenzen handelt es sich um die Erbinformationen für die 18s-Untereinheit der Ribosomen. Die Stämme der Gattung *Nitzschia*, deren SSU-Bereiche sich erfolgreich sequenzieren ließen, sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Stämme, deren SSU-Bereich erfolgreich sequenziert wurde

Stamm	Herkunft	Isolationstag
• KGO2	Sammlung für Algenkulturen, Göttingen	1942, genaues Datum unbekannt
• OA02	Ameisensee	21. September 2002
• OA09	Ameisensee	01. September 2003
• OA11	Ameisensee	01. September 2003
• OLO1	Lustsee	05. September 2003
• OS02	Sengsee	10. Juli 2003
• OW05	Westlicher Breitenauer See	03. September 2003
• SGO1	Starnberger See bei Garatshausen	20. August 2003
• SU01	Starnberger See, Nähe Unterzeismering	05. Juni 2003
• SU02	Starnberger See, Nähe Unterzeismering	05. Juni 2003
• SU02	Starnberger See, Nähe Unterzeismering	05. Juni 2003

Ergebnisse

Des weiteren konnten SSU-Sequenzen anderer, für das Alignment der Sequenzen ausreichend nahe verwandter Taxa in den unter NCBI vereinten Datenbanken gefunden und in die Analyse mit einbezogen werden. Die verwendeten Sequenzen sind mit ihren gi-Nummern, die die Sequenzen in den Datenbanken eindeutig identifizieren, in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17

Kürzel	Taxon	gi-Nummer	Referenz
NPAL2	<i>Nitzschia palea</i>	58416149	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL3	<i>Nitzschia palea</i>	58416150	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL6	<i>Nitzschia palea</i>	58416151	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL7	<i>Nitzschia palea</i>	58416152	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL8	<i>Nitzschia palea</i>	58416153	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL9	<i>Nitzschia palea</i>	58416154	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL11	<i>Nitzschia palea</i>	58416155	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL12	<i>Nitzschia palea</i>	58416156	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NPAL13	<i>Nitzschia palea</i>	58416157	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NZSP	<i>Nitzschia palea</i>	58416158	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
Namph	<i>Nitzschia amphibia</i>	56398975	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (2)
NINC1	<i>Nitzschia inconspicua</i>	58416169	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NFON1	<i>Nitzschia fonticola</i>	58416170	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NDIS1	<i>Nitzschia dissipata</i>	58416166	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NLIN1	<i>Nitzschia linearis</i>	58416159	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NLIN2	<i>Nitzschia linearis</i>	58416160	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NLIN3	<i>Nitzschia linearis</i>	58416161	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)

Ergebnisse

Kürzel	Taxon	gi-Nummer	Referenz
NCOM1	<i>Nitzschia communis</i>	58416162	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
Ncom	<i>Nitzschia communis</i>	56398976	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (2)
NIPU1	<i>Nitzschia pusilla</i>	58416163	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
NIPU2	<i>Nitzschia pusilla</i>	58416164	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
Nfrus	<i>Nitzschia frustulum</i>	41393016	MEDLIN & KACZMARSKA 2002
NFIL1	<i>Nitzschia filiformis</i>	58416147	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
Napi	<i>Nitzschia apiculata</i>	26024181	BHATTACHARYA, MEDLIN ET AL. 1992
Nvit	<i>Nitzschia vitrea</i>	56398978	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (2)
Nsig	<i>Nitzschia sigma</i>	56398977	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (2)
NPAE1	<i>Nitzschia paleacea</i>	58416144	RIMET, BESZTERI ET AL. 2004 (1)
Nlong	<i>Nitzschia longissima</i>	58293961	LI, YANG ET AL. 2005
Nlecoi	<i>Nitzschia lecointei</i>	51104829	PASSMORE 2004
CylM-G050	<i>Cylindrotheca closterium</i>	66096301	LI, WU ET AL. 2005
Cyl	<i>Cylindrotheca closterium</i>	58293932	LI, YANG ET AL. 2004

Das Dendrogramm der phylogenetischen Analyse (Parsimony - Abbildung 19) stellt die als Außengruppe gewählten Stämme von *Cylindrotheca closterium* als deutlich von den eigentlichen *Nitzschia*-Stämmen, die laut Analyse eine geschlossene Gruppe mit 93 % Bootstrapsupport darstellen, getrennt dar. Innerhalb der *Nitzschia*-Stämme werden die unterschiedlichen, als konspezifisch angesehen Stämme von *Nitzschia pusilla*, *Nitzschia communis* und *Nitzschia linearis* jeweils als monophyletisch zusammengruppiert. Die Bootstrapwerte liegen bei allen erwähnten Fällen bei 99 %. *Nitzschia dissipata*, *N. fonticola*, *N. inconspicua*, *N. amphibia* sowie der Stamm OS02, der als *N. amphibia* be-

stimmt wurde, bilden eine gemeinsame Gruppe (in den Dendrogrammen orange hinterlegt), wobei OS02 und *N. amphibia* am engsten zusammengruppieren, mit *N. inconspicua* als nächster Verwandter. Etwas weiter entfernt von *N. amphibia* und *N. inconspicua* wird zunächst *N. fonticola* gestellt, dann *N. dissipata*. Alle eigenen Klone – OS02 ausgenommen – und die als *Nitzschia palea* bestimmten Klone aus der Literatur gruppieren sich mit einem Bootstrapwert von 97 % in ein kaum weiter aufgelöstes Monophylum (blau hinterlegt) zusammen. Innerhalb dieses Monophylums werden lediglich die Stämme OA09 und OA11 sowie die Stämme SG01, SU01 und NPAL6 als jeweils untereinander etwas ähnlicher zusammengefasst. Die Bootstrapwerte sind jedoch hier mit 65 % und 52% sehr niedrig, so dass die Gruppe mit SG01, SU01 und NPAL6 gerade noch aufgelöst wird.

Die übrigen *Nitzschia*-Taxa sind innerhalb der Gattung *Nitzschia* nicht weiter aufgelöst. Allerdings liegen hier für jedes Taxon nur die Sequenzdaten eines einzelnen Stammes vor. Die Analyse nach genetischer Distanz (Abbildung 20) zeigt anderes als bei den ITS-Sequenzen gewisse Unterschiede zur Parsimony-Analyse. So wird NPAE1 – von RIMENT, BESZTERI ET AL. als *Nitzschia paleacea* klassifiziert – in die gleiche Untergruppe gestellt, wie die als *Nitzschia pusilla* bestimmten Stämme. Der Bootstrapwert für diese Gruppierung ist allerdings mit 55% sehr niedrig.

Ein weiterer Unterschied findet sich bei der Gruppe um *Nitzschia amphibia*, *N. inconspicua*, *N. fonticola*, *N. dissipata* und Stamm OS02 (orange hinterlegt). Hier werden die Stämme Namph (*Nitzschia amphibia*) und NINC1 (*Nitzschia inconspicua*) als am nächsten verwandt angesehen, dann erst als nächstverwandter Stamm OS02. Insgesamt liegen jedoch die Bootstrapwerte für diese Gruppe niedriger als bei der Analyse nach Parsimony-Kriterien. Für die Gruppe, in der die *Nitzschia palea*-Stämme und die eigenen Stämme vereinigt werden, gibt es ebenfalls einige Unterschiede. So wird Stamm SU01 vom ganzen Rest dieser Gruppe abgegrenzt, die mit einem Bootstrapwert von 67% zusammengruppiert. Innerhalb der Restgruppe werden, wie schon bei der Parsimony-Analyse die Stämme OA09 und OA11 in eine eigene Untergruppe vereinigt. Der Bootstrapwert für diese Untergruppe beträgt 77%. Ferner werden die Stämme NPAL12, NPAL9, SU02, NPAL3, NPAL2, NPAL13, NPAL11, NZSP, NPAL8, NPAL7 und NPAL6 in einer weiteren Untergruppe zusammengestellt,

Ergebnisse

in der NPAL12, NPAL9 und SUO2, NPAL3 und NPAL2, NPAL13 und NPAL11, NPAL8 und NZSP jeweils eigene Untergruppen bilden, deren Bootstrapwerte aber höchstens 71% erreichen.

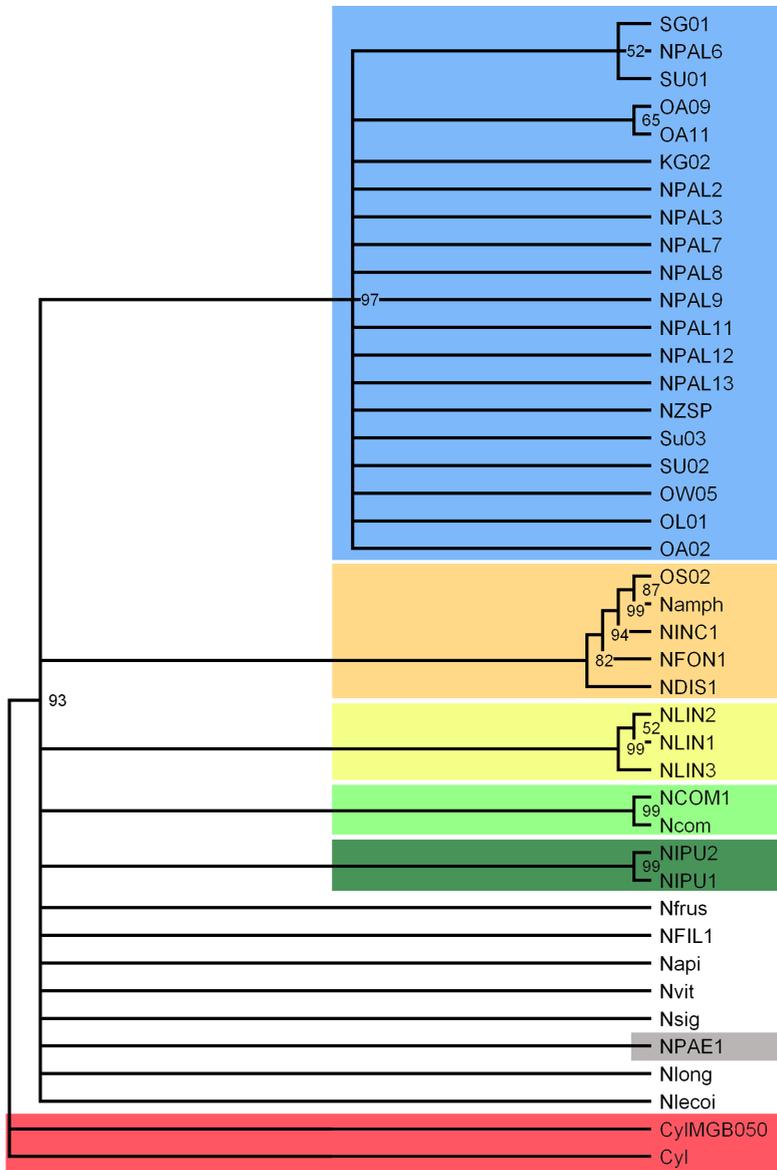


Abbildung 19: Dendrogramm mit Bootstrapwerten, basierend auf Sequenzanalyse der SSU-Region nach Parsimony-Kriterien (Abkürzungen siehe Seiten 78 ff)

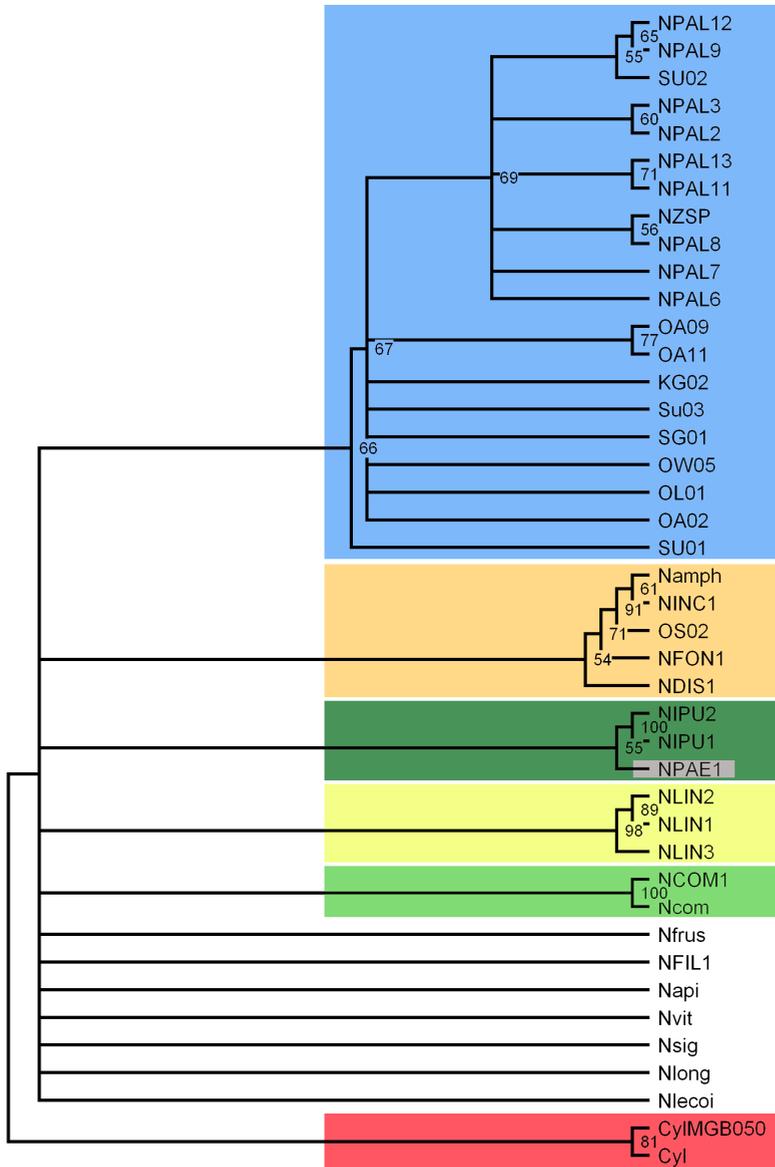


Abbildung 20: Dendrogramm mit Bootstrapwerten, basierend auf Sequenzanalyse der SSU-Region nach Distance-Kriterien (Abkürzungen siehe Seiten 78 ff)

5.2.1.4 Supertree Genetik

Nach der Kombination der Daten der separat berechneten phylogenetischen Beziehung zu einem „Supertree“ ergeben sich als Gesamtübersicht aller Sequenzdaten die beiden Baumdiagramme, die in Abbildung 21 und Abbildung 22 dargestellt sind. Abbildung 21 zeigt dabei den „strict consensus“ aller gefundenen Bäume, also alle Gruppen, die allen gefundenen Bäumen gemein sind. Es ist festzustellen, dass die *Nitzschia palea*-Stämme aus der NCBI-Datenbank und die eigenen Stämme, die aufgrund ihrer Schalenmorphologie dem Sippenkomplex um *Nitzschia palea* zugeordnet werden, in ein gemeinsames Cluster gestellt werden, dass im strict consensus nicht weiter aufgelöst ist.

Im „Adams consensus“ (Abbildung 22), der alle Gruppen darstellt, zu denen es keinen Widerspruch innerhalb aller gefundenen Bäume gibt, wird die Gruppe um *Nitzschia palea* weiter aufgelöst. Es werden allerdings viele als *N. palea* bestimmte Stämme aus der Literatur, von denen zum Zeitpunkt der Analyse noch keine ITS-Sequenzen vorlagen, nicht weiter zugeordnet. Neben diesen nicht aufgelösten Stämmen gibt es jedoch innerhalb dieses „*Palea*-Zweiges“ drei Untergruppen. In der ersten Untergruppe (türkisblau hinterlegt) werden die Stämme OAO8, SUO1, SGO1, OQO9 PAL6 sowie PAL11 zusammengefasst, eine weitere Auflösung dieser Untergruppe erfolgt nicht. In der zweiten Untergruppe (hellblau hinterlegt) werden die Stämme OWO5 SUO3, OAO5, OWO1, ORO2, OAO9 und OAO11 zusammengestellt, letztere zwei als etwas näher zueinander verwandt, als der nicht weiter aufgelöste Rest dieser Untergruppe. In der dritten Untergruppe (blassviolett hinterlegt) befinden sich nicht weiter aufgeschlüsselt die Stämme OHO4, SUO2 und OEO3 sowie eine aus den Stämmen LGO9 und LG11 gebildete nähere Verwandtschaft (helltürkis hinterlegt) und eine Gruppe aus den Stämmen OLO1, OAO3, OHO3, OHO2, OWO11, OWO9, OWO3, KGO2, OAO2 und OHO5, wobei OHO5 und OAO2 als zueinander ähnlicher dargestellt werden (violett hinterlegt).

Die übrigen, nicht als *Nitzschia palea* klassifizierten Stämme, deren Sequenzdaten aus der Literatur stammen, werden im Supertree genauso zugeordnet wie im Dendrogramm, das auf SSU-Daten basiert.

Ergebnisse

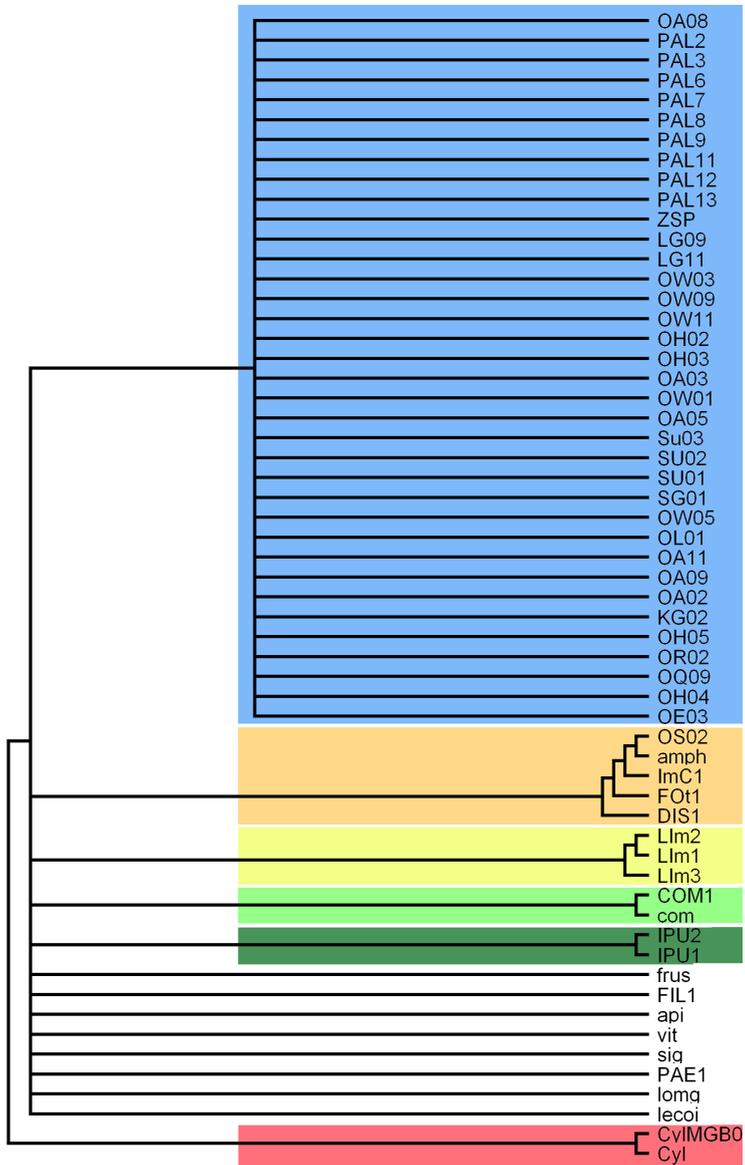


Abbildung 21: Strict-Konsensus aus den most parsimonious Supertrees

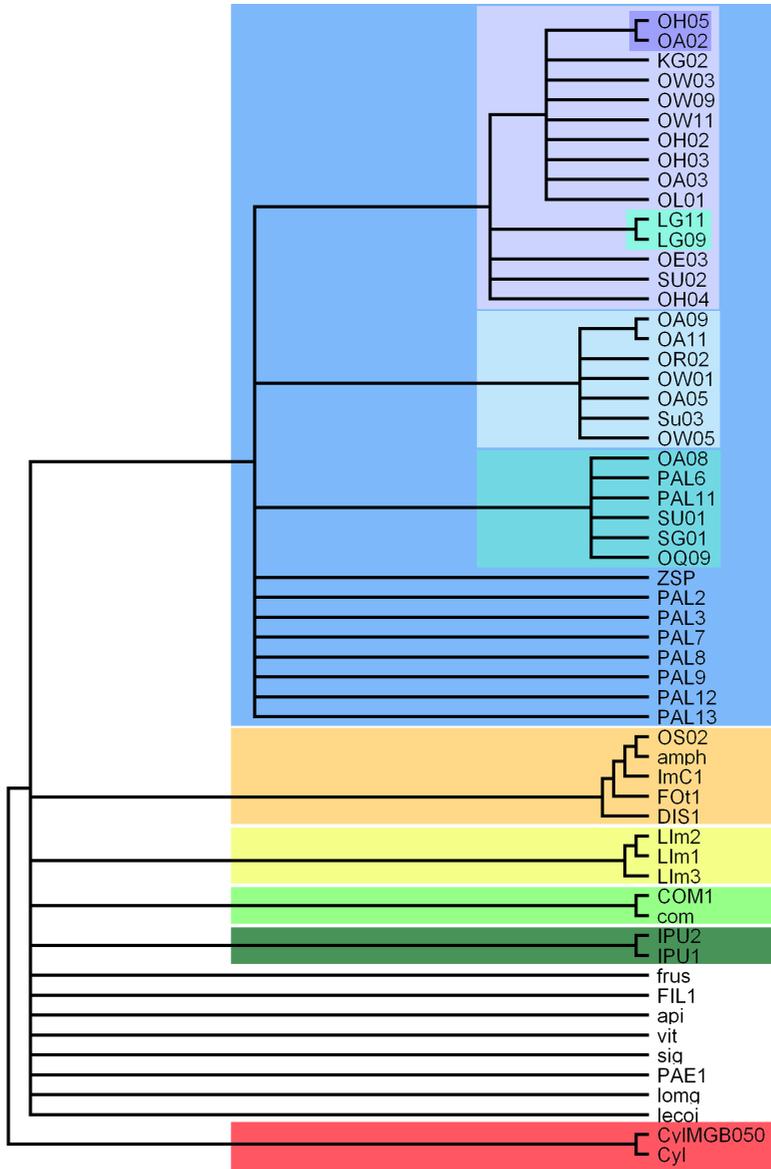


Abbildung 22: Adams-Konsensus aus den most parsimonious Supertrees

5.3 Morphologie

5.3.1 Eignung der Messmethoden

5.3.1.1 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit einer Messung, die mit einer bestimmten Methode ausgeführt wurde, stellt ein wesentliches Kriterium für Verlässlichkeit die Messmethode dar. Erst wenn eine Messung gut reproduzierbar ist, kann ein Vergleich mit anderen Messwerten erfolgen. Diese Vergleichsmöglichkeit stellt eine wichtige Basis für die Verwendung von morphometrischen Daten zur Bestimmung von Taxa dar. Um ein Maß für die Reproduzierbarkeit der hier durchgeführten morphometrischen Messungen zu erhalten, wurden Parallelmessungen von unterschiedlichen Bearbeitern durchgeführt.

Die erste Messgrößen, die auf diesem Weg untersucht wurden, sind die 1- und 10 μm Balken. Diese liefern Anhaltspunkte, wie groß der Fehler der Messmethode an sich ist, d.h. der planometrischen Messung an digitalen Fotografien mittels des Programms Metreo aus dem Kappa-Datenpaket. Bei der Festlegung des 1 μm -Balkens liegt die mediane Standardabweichung bei 0,86 %, beim 10 μm -Balken liegt die mediane Standardabweichung bei 0,17 %. Dies bestätigt, dass die prozentualen Messfehler bei kleinen Messgrößen generell höher ausfallen.

Die Vermessungen der Zelllänge weisen eine mediane Standardabweichung von 0,45 % auf, die Messungen der Zellbreite eine mediane Standardabweichung von 1,64 %. Beide Merkmale spielen unter den metrisch erfassbaren Merkmalen in der Literatur die größte Rolle. Die geringen Fehler bei der Bestimmung dieser beiden Zelldimensionen zeigen, dass die Messungen mit der gewählten Methodik sehr gut reproduzierbar sind. Erwartungsgemäß hat das aus beiden Größen abgeleitete Verhältnis von Länge zu Breite eine ebenfalls geringe Standardabweichung und somit eine hohe Reproduzierbarkeit.

Ergebnisse

Tabelle 18: Standardabweichungen bei der Vermessung quantitativer Merkmale durch unterschiedliche Bearbeiter

Merkmal	Anzahl Messungen	Bilder vermessenbar	Median d. Standardabweichungen	Minimale Standardabweichung	Maximale Standardabweichung
10 µm Balken	108	15	0,17%	0,06%	0,40%
1 µm Balken	96	15	0,86%	0,11%	1,93%
Länge	119	15	0,45%	0,25%	2,03%
Breite(max)	118	15	1,64%	0,72%	14,99%
L/B	114	15	1,37%	0,59%	14,00%
Köpfchenbreite	106	15	7,96%	2,68%	34,15%
Istmusbreite	104	15	9,79%	3,24%	38,31%
K/I	103	15	8,98%	0,95%	37,76%
Länge Fibulae	109	13	8,00%	5,51%	22,91%
Breite Fibulae	109	13	14,98%	9,84%	42,84%
Abstand Fibulae	108	13	16,98%	4,66%	24,52%
Fläche	115	15	3,51%	2,08%	18,61%
Umfang	115	15	0,61%	0,42%	1,90%
Rundheit	114	15	2,77%	1,30%	14,61%
Spitzenwinkel	110	15	21,99%	5,23%	36,80%
Fibulaedichte	109	13	0,62	0	4,68
Streifendichte	99	14	1,39	0,6	14,5
Areolendichte	78	14	0,49	0	2,02

Die Vermessungen der Köpfchenbreite, der Isthmusbreite und der daraus abgeleiteten „Kopfigkeit“ hingegen weisen wesentlich höhere mediane Standardabweichungen von 7,96 %, 9,79 % bzw. 8,98 % auf und sind somit deutlich schlechter reproduzierbar als die Bestimmung von Zelllänge oder Zellbreite. Das Problem bei der Bestimmung der Köpfchen- und Isthmusbreite besteht darin, dass die Punkte zwischen denen gemessen wird, in vielen Fällen nicht eindeutig sind. Innerhalb der Messungen eines Bearbeiters sind die Schwankungen kleiner. Der Quotienten aus Köpfchenbreite und Isthmusbreite ist somit nur bedingt dafür geeignet, die kopfige Erweiterung des Zellpoles zu quantifizieren.

Die Standardabweichungen bei den Vermessungen der Fibulae sind relativ hoch. Diese Tatsache ist in der natürlichen Unregelmäßigkeit der Fibulae begründet. So ist der Raphenkanal, den die Fibulae überspannen, zu den Zellen hin ein wenig schmaler, wodurch distale Fibulae etwas kürzer sind als proximale Fibulae. Die häufige Verwachsung zweier Fibulae zu einer sehr breiten Fibula sowie die für einige Taxa typischen Unregelmäßigkeiten bei der Stellung und der Breite der Fibulae tragen ebenfalls zur relativ hohen Streuung der Werte bei. Im Einzelnen liegt die mediane Standardabweichung bei der Länge der Fibulae bei 8,00 %, der Breite der Fibulae bei 14,98 % und des Abstandes der Fibulae bei 16,98 %. Trotz ihrer naturgemäß hohen Streuung können die Vermessungen von Fibulae von großem taxonomischen Interesse sein. Beispielsweise ist ein wichtiger Aspekt in der Charakterisierung von *Nitzschia sublinearis* in KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1988) die „deutlich unregelmäßige Stellung“ der Fibulae. Vermessungen der Fibulae, wie sie hier durchgeführt wurden, liefern eine eindeutige Aussage über die Regelmäßigkeit der Fibulae und stellen somit eine deutliche Objektivierung bei der Bewertung der Fibulaestellung dar.

Relativ geringe Standardabweichungen wurden bei der Vermessung von Zellumfang und Projektionsfläche in der Valvaransicht festgestellt. Die mediane Standardabweichung aller Umfänge beträgt nur 0,61 % und ist somit geringer, als die der Zelllänge. Die mediane Standardabweichungen der Flächen ist mit 3,51 % ebenfalls relativ gering. Auch die aus Zellumfang und -fläche abgeleitete

„Rundheit“ besitzt folglich eine hohe Reproduzierbarkeit und stellt somit eine ausschussreiche Kenngröße einer Zelle dar, die bisher nicht Eingang in die gängigen Bestimmungsliteratur gefunden hat.

Die mediane Standardabweichung der Messungen des Winkels, in dem die Zellwände an den Zellpolen aufeinander zulaufen, liegt in Prozent ausgedrückt bei 21,99 % und ist somit die höchste mediane Standardabweichung aller hier untersuchten Fälle. Betrachtet man die Standardabweichung nicht als prozentuale Angabe, sondern als Angabe in Winkelgraden und differenziert für die einzelnen Bilder der Messung, ist festzustellen, dass vor allem bei Frusteln mit relativ stumpfen Ende die Standardabweichungen im Bereich von 10° liegen können. Bei den eher spitz zulaufenden Zellen liegen die Werte zwischen 2 und 6° . Da die Winkel bei diesen eher spitzen Zellen um die 20° schwanken, fallen die prozentualen Angaben der Standardabweichung hier besonders hoch aus. Winkelunterschiede von $2 - 6^\circ$ sind mit bloßem Auge jedoch nur im direkten Vergleich festzustellen. Daher liefern die Messungen der Spitzenöffnungswinkel zumindest präzisere Angaben als die verbalen Umschreibungen in der gängigen Bestimmungsliteratur.

Die Bestimmungen der Dichte der Fibulae, der Streifen und der Areolen erwiesen sich bei den Testmessungen als gut reproduzierbar. Die Fibulaedichte zeigte eine Standardabweichung von $0,6/10 \mu\text{m}$, die Streifendichte von $1,39/10 \mu\text{m}$ und die Areolendichte von $0,49/\mu\text{m}$. Diese Werte sind im Vergleich zu den Bandbreiten innerhalb der Taxa, wie sie beispielsweise von KRAMMER & LANGEBERTALOT (1988) angegeben werden, sehr gering. Zur Ermittlung der Fibulae- und Streifendichten wird die Zahl der Fibulae bzw. die Zahl der Streifen unter einem zufällig positionierten, in Längsrichtung der Zelle orientierten Balken mit $10 \mu\text{m}$ Länge gezählt. Da bereits ein geringfügiges Verschieben dieses Balkens bewirken kann, dass zwei Fibulae bzw. Streifen gerade noch oder eben gerade nicht mehr mitgezählt werden, ist der Fehler bei diesen Zählungen erstaunlich gering.

5.3.1.2 Konstanz der Merkmale

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Eignung morphologischer Eigenschaften für die taxonomische Anwendung ist die Konstanz der Eigenschaft in einem Taxon bzw. die Kenntnis der Variabilität der Eigenschaft im Zusammenhang mit den Umweltbedingungen und dem Alter der Zelllinie.

Freilanduntersuchungen

Zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Merkmalsausprägungen und Umweltbedingung wurden Freilanduntersuchungen in Zusammenarbeit mit Silvia Czanderle (CZANDERLE 2003) zum Einfluss unterschiedlicher Umweltparameter durchgeführt. Diese zeigen in einigen Fällen Korrelationen von Länge, Breite oder Fibulaedichte mit dem Phosphatgehalt und der Trophie der Seen. An dieser Stelle seien nur die Ergebnisse der Taxa aufgeführt, die dem Komplex um *Nitzschia palea* angehören oder diesem nahe stehen. Von den zwölf untersuchten Taxa der Gattung *Nitzschia* sind dies *N. fonticola*, *N. gracilis*, *N. lacuum*, *N. palea* var. *debilis* und *N. sublinearis*³ (Tabelle Fehler: Referenz nicht gefunden). Die Zellen von *N. fonticola* sind in Gewässern hoher SRP-Konzentration kürzer und breiter. Die Gesamtphosphorkonzentration korreliert ebenfalls positiv mit der Breite der Zellen. Exemplare von *N. gracilis* sind kürzer, wenn sie aus Gewässern mit hohen Gesamtphosphorgehalten stammen. Außerdem nimmt die Streifendichte mit zunehmender Trophie des Ursprungsgewässers ab. Anzumerken ist bei *N. gracilis*, dass nur 11 Schalenhälften für die Untersuchung verwendet werden konnten und die Korrelationen nur auf einem Niveau von $< 0,05$ signifikant sind. Daher sind hier die Ergebnisse statistisch kaum gesichert.

Wie bei *N. gracilis* standen auch bei *N. lacuum* nur 11 Zellen zur Auswertung zur Verfügung. Das Signifikanzniveau ist bei den gefundenen positiven Korrelationen zwischen SRP, Gesamtphosphat und der Zellbreite jedoch $< 0,01$. Die vermessenen Schalen von *N. palea* var. *debilis* zeigten schwach positive Korre-

3 *Nitzschia sublinearis* wird entgegen den übrigen hier behandelten Taxa nicht den Lanceolatae sondern der Lineares zugeordnet (Süßwasserflora). Aufgrund der insbesondere bei kleineren Exemplaren oft nicht eindeutigen Abgrenzung gegenüber *N. gracilis* werden die Ergebnisse von *N. sublinearis* hier mit einbezogen.

lationen der Zelllänge mit der Trophie des Ursprungsgewässers und eine hochsignifikante, aber schwache, negative Korrelation der Zellbreite mit der SRP-Konzentration. Außerdem ist die Fibulaedichte schwach mit der SRP-Konzentration korreliert.

Ähnlich wie bei *N. gracilis* und *N. lacuum* standen bei *N. sublinearis* nur eine kleine Zahl (14) Schalenhälften zur Verfügung, weswegen die Korrelationen statistisch nicht optimal gesichert sind. Die SRP-Konzentrationen der Ursprungsgewässer korrelieren bei diesem Taxon negativ mit der Zelllänge, positiv mit der Zellbreite und der Fibulaedichte. Die beiden zuletzt erwähnten Größen korrelieren auch positiv mit dem Gesamtphosphatgehalt, die Zelllänge auch mit der Trophie des Herkunftsgewässers.

Ergebnisse

Tabelle 19: Korrelationen von Schalenmerkmalen mit Umweltparametern der Ursprungsgewässer; Werte mit * sind auf einem Niveau $< 0,05$ signifikant, Werte mit ** auf einem Niveau $< 0,01$ signifikant. Verwendete Abkürzungen: TP = Gesamtphosphat; SRP = gelöstes reaktives Phosphat; T_s = Trophie des Ursprungsgewässers; p = Pearson-Korrelationskoeffizient, s = Spearman rho-Korrelationskoeffizient

Taxon	Untersuchte Schalenhälften	Korrelationen der Zelllänge mit:	Korrelationen der Zellbreite mit:	Korrelationen der Fibulaedichte mit:
<i>N. fonticola</i>	33	SRP $p = -0,345^*$	SRP $p = 0,429^*$ $s = 0,380^*$	
			TP $p = 0,377^*$ $s = 0,399^*$	
<i>N. gracilis</i>	11	TP $p = -0,603^*$		T_s $p = -0,703^*$ $s = -0,641^*$
<i>N. lacuum</i>	11		SRP $P = 0,747^{**}$	
			TP $p = 0,746^{**}$	
<i>N. palea var. debilis</i>	235	T_s $p = 0,160^*$ $s = 0,132^*$	SRP $s = -0,200^{**}$	SRP $p = 0,182^{**}$ $s = 0,154^*$
<i>N. sublinearis</i>	14	SRP $p = -0,798^{**}$	SRP $P = 0,688^{**}$	SRP $p = 0,712^{**}$ $s = 0,632^{**}$
		T_s $p = 0,593^*$	TP $p = 0,755^{**}$ $s = 0,630^{**}$	TP $p = 0,879^{**}$ $s = 0,728^{**}$

Laborversuche

Die Untersuchungen an Freilandproben bieten nicht die Möglichkeit, Auswirkungen des Alters einer Zelllinie auf die Morphologie zu untersuchen. Außerdem ist es nicht möglich festzustellen, inwieweit es sich bei dem Material, das als konspezifisch klassifiziert wurde, tatsächlich um Material des gleichen natürlichen Taxons und nicht um das morphologisch sehr ähnliche Material unterschiedlicher natürlicher Taxa handelt. Aus diesen Gründen wurden Laborversuche mit monoklonalen Stämmen durchgeführt. Bei diesen Laboruntersuchungen wuchsen drei der vier verwendeten Stämme nicht an, so dass zur Auswertung nur der Stamm aus dem Starnberger See (SG03) zur Verfügung stand. Dieser wurde aufgrund seiner morphologischen Eigenschaften als *Nitzschia palea* var. *debilis* bestimmt.

Im Versuch mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen gibt es im Konzentrationsbereich bis 89 µg PO₄-P pro l hochsignifikante, aber schwache, negative Korrelationen der Länge mit der Phosphatkonzentration (Tabelle 20). Im Konzentrationsbereich über 89 µg/l ist eine positive Korrelation der Länge mit dem Phosphatgehalt des Mediums festzustellen. Die Breite der Zellen zeigt über den gesamten Phosphatgradienten des Versuches hinweg eine signifikante positive Korrelation mit der Phosphatkonzentration. Dieses Ergebnis steht in einem deutlichen Widerspruch zu den Ergebnissen des Freilandes, wo eine Tendenz zu schmälere Zellen bei höherem Phosphatangebot zu beobachten ist.

Tabelle 20: Signifikante Korrelationen von Zelldimensionen mit dem Phosphatangebot; Werte mit * sind auf dem Niveau < 0,05 signifikant, Werte mit ** sind auf dem Niveau < 0,01 signifikant;

Korrelationskoeffizient	Länge (bis 89 µg/l PO ₄ -P)	Länge (ab 89 µg/l PO ₄ -P)	Breite	Länge/ Breite
Pearson	- 0,209 **	0,155 *	0,231 **	- 0,194 **
Spearman-rho	- 0,143 **	0,209 **	0,168 **	- 0,153 **

Im Versuch mit unterschiedlichen Silikatkonzentrationen wurden keinerlei signifikante Zusammenhänge zwischen dem Gehalt an gelöstem Silikat im Nährmedium und der Schalenmorphologie gefunden.

Beim kombinierten Phosphat- und Nitratversuch (Tabelle 21) gibt es lediglich im Konzentrationsbereich von $8,9 \mu\text{g PO}_4\text{-P/l}$ eine signifikante Korrelation mit dem Nitratgehalt und der Fibulaedichte. Negative Kruskal-Wallis-, Mann-Whitney- und Mediantests zeigen jedoch, dass auch hier die Tendenz zur Abnahme der Fibulaedichte bei höheren Nitratkonzentration statistisch kaum gesichert ist.

Allerdings gibt es zwischen den vier gewählten Nitratkonzentrationen Unterschiede in den Korrelationen von morphologischen Parameter mit den Phosphatgehalten. So ist eine hochsignifikante negative Korrelation der Länge mit der Phosphatkonzentration nur im Bereich von $0,5 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ und $1 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ feststellbar. Auch die Dichte der Fibulae zeigt nur im Bereich zwischen $0,5 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ und $2 \text{ mg NO}_3\text{-N/l}$ hochsignifikante negative Korrelation mit der Phosphatkonzentration.

Bei Nitratkonzentrationen von 4 mg/l schließlich gibt es keine Korrelationen morphologischer Kenngrößen mit dem Phosphatangebot im Medium mehr.

Ergebnisse

*Tabelle 21: signifikante Korrelation quantitativer Merkmale mit dem Phosphatgehalt bei unterschiedlichem Stickstoffangebot; Werte mit * sind auf dem Niveau < 0,05 signifikant; Werte mit ** sind auf dem Niveau von < 0,01 signifikant;*

Konzentration von NO₃-N	Korrelationskoeffizient	Länge	Fibulae pro 10 µm
0,5 mg/l	Pearson	- 0,102 *	-
	Spearman-rho	-	- 0,130 **
1 mg/l	Pearson	- 0,144 **	
	Spearman-rho	- 0,147 **	- 0,124 *
2 mg/l	Pearson	-	-
	Spearman-rho	-	- 0,154 **
4 mg/l	Pearson	-	-
	Spearman-rho	-	-

5.3.2 Beschreibung der Stämme

5.3.2.1 Allgemeine Merkmale

Abgesehen von Merkmalen, die bei Schalenpräparaten besser beobachtet werden können, wurden bei der Untersuchung von lebenden bzw. fixierten Material wurden keine zur Differenzierung zwischen den Stämmen geeigneten Charakteristika beobachtet. Es wurden jedoch einige Eigenschaften festgestellt, die allen untersuchten Stämmen gemein sind.

So zeigen alle untersuchten Stämme eine gewisse Beweglichkeit. Da bei der Untersuchung der Stämme mehrfach beobachtet wurde, dass die Mobilität durch mechanische Reize angeregt werden kann und diese generell von äußeren Faktoren, wie Lichteinfall oder Nährmedium beeinflusst wird, wurde auf eine Quantifizierung verzichtet.

Bei den untersuchten Klonen ist die Raphe, das Bewegungsorgan der pennaten Kieselalgen, in Form einer Kanalraphe ausgebildet, wie bei den Bacillariaceae im Allgemeinen. Alle Stämme weisen eine nitzschioide Anordnung der beiden Raphen auf Epi- und Hypotheka auf. Es wurden keine Zellen mit hantzschioider Anordnung der beiden Raphen gefunden. Entlang des Raphenkanals wurden bei keinem der untersuchten Stämme ein Conopeum beobachtet.

Färbeversuche des Zellkerns mit Nigrosin verliefen zwar negativ, aber bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen nach einer Färbung mit Rhodamin B konnte beobachtet werden, dass der an sich nicht gefärbte, von der gefärbten Kernmembran umgebene, runde Zellkern sich bei allen untersuchten Stämmen im Zentrum der Zellen befindet. Um den Zellkern herum gruppieren sich die Membranstapel des endoplasmatischen Retikulums. Zu den Zellpolen hin befindet sich pro Zellpol ein Chloroplast (Abbildung 23), der mit einer mehrfachen Membran umgeben ist. Die Chloroplasten sind plattenförmig, jedoch entlang der Zellwand röhrenförmig gerollt. Die Ränder der Chloroplasten sind unregelmäßig gelappt. Meist befindet sich distal der Chloroplasten je ein großes, stark lichtbrechendes Liposom, wobei die Größe innerhalb der Klone stark va-

riert. Sie kann zwischen kugelig mit etwa 2 μm Durchmesser bis fast das halbe Zelllumen ausfüllend schwanken. Daneben finden sich vor allem in der Nähe des Zellpols eine variable Zahl deutlich kleinerer Liposomen (Abbildung 25).

Nach Färbungen mit Janusgrün B konnten nur bei wenigen Zellen Mitochondrien beobachtet werden. Diese waren rund und hatten eine Durchmesser von 2 – 3 μm (Abbildung 24). Da alle Beobachtungen von Mitochondrien bei Zellen mit degradierten Chloroplasten gemacht wurden, wird in Zellen mit intakten Chloroplasten vermutlich die grünblaue Färbung der Mitochondrien durch Janusgrün B durch das Chlorophyll der wandständigen Chloroplasten „maskiert“. Größere Vakuolen wurden bei keinem der intakten Stämme gefunden. Auf die Untersuchung weiterer Zellorganelle wurde aufgrund des relativ hohen zeitlichen und technischen Aufwandes verzichtet.



Abbildung 23: Lebende Zellen verschiedener Nitzschia-Stämme; linkes und mittleres Bild in Valvaransicht; rechtes Bild in Gürtelbandansicht

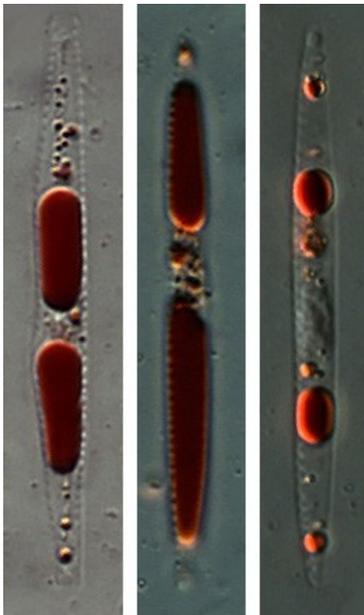


Abbildung 24: Liposomen (rot gefärbt) in Nitzschia-Zellen; Färbung mit Sudan IV



Abbildung 25: Mitochondrium (grünlich-blau gefärbt) in Nitzschia-Zelle; Färbung mit Janusgrün B

5.3.2.2 Einzelbeschreibungen der Stämme

Erläuterungen zu den Einzelbeschreibungen

Die Messgrößen werden teilweise in der Form „30 (28 – 32) μm “ angegeben. Hierbei gibt der erste Wert den Mittelwert an, die Werte in Klammern die Extrema. In den Übersichtstabellen zu jedem Stamm wird diese Darstellungsweise beibehalten. Wegen der geringen Reproduzierbarkeit der Messungen zur kopfigen Erweiterung der Pole wird auf eine Darstellung der Mittelwerte verzichtet, da diese kaum einen Beitrag zum Vergleich der Stämme untereinander liefern kann.

Eigenschaften, die aufgrund unzureichender Präparate nicht untersucht werden konnten, sind in den Übersichtstabellen mit „n.b.“ gekennzeichnet.

Bei Stämmen, von denen nur lichtmikroskopische Untersuchungen vorliegen, ist das Vorhandensein von zentralen Raphenenden nicht oder nur in seltenen Ausnahmen direkt zu beobachten. Die regelmäßig auftretende äquidistante Stellung der Fibulae bzw. die regelmäßig weitere Stellung der Fibulae im Zentralbereich der Frustel ist jedoch ein lichtmikroskopisch erkennbares, sekundäres Merkmal, das auf das Fehlen bzw. Vorhandensein zentraler Raphenenden hinweist (BONIK & LANGE-BERTALOT 1978). Daher wird bei den entsprechenden Stämmen das Merkmal „zentrale Raphenenden“ in den Übersichtstabellen aufgeführt, obwohl aufgrund der indirekten Bestimmung eine gewisse Unsicherheit besteht.

Stamm KG02

Tafel 1 (1 – 3)

Tabelle 22

Die Zellen des Stammes sind ungewöhnlich klein und sehr rund, es treten viele teratoforme Frusteln auf. Die Länge der Zellen liegt nur zwischen 13,6 und 16,6 μm , die Breite zwischen 2,7 und 4,1 μm . Diese Tatsache ist ohne Zweifel eine Folge des hohen Alters des Stammes. Er wurde schon 1942 von H. v. Witsch aus einer Erdprobe, die in Göttingen gesammelt wurde, isoliert und befindet sich seitdem in Kultur in der Sammlung von Algenkulturen in Göttingen (SAG). Die Nummer des Stammes in der SAG lautet „1052-3a“. Entsprechend der Benennung der übrigen Stämme wurde dieser Stamm unter der eigenen Bezeichnung KG02 geführt.

Die Form kann als breit-rundlich mit stumpf gerundeten und kaum kopfigen oder schnabelförmig vorgezogenen Enden beschrieben werden. Die Zellspitzen haben eine Öffnungswinkel, der im Mittel bei 40° liegt.

Die Raphe ist bei den weniger teratoformen Frusteln deutlich am Rand der Schalenfläche gelegen. Zentralknoten konnten keine festgestellt werden. Unter der Raphe liegen 12 – 19 Fibulae pro 10 μm , die zwischen 0,30 und 0,51 μm lang und 0,13 – 0,45 μm breit sind. Aussagen über die Regelmäßigkeit der Fibulae sollen hier wegen der zahlreichen Verformungen, die die Zellen dieses Stammes aufweisen, nicht gemacht werden.

Die Streifung der Zellen ist mit 40 (38-43)/10 μm zu dicht, um am Lichtmikroskop noch gut erkennbar zu sein. Sie ist aber im Vergleich zu den übrigen untersuchten Stämmen durchschnittlich. Auf den Streifen liegen 5-6 Punkte pro μm .

Stamm KG02 wurde in Göttingen als *Nitzschia palea* bestimmt. Die altersbedingte, starke morphologische Veränderung des Stammes macht eine Überprüfung dieser Einteilung aufgrund von Schalenmerkmalen sehr schwer.

Ergebnisse

Tabelle 22: Übersicht über morphologische Charakteristika des Stammes KGo2

Schalenmerkmale	Zelllänge	14,6 (13,6 – 16,5)	µm
	Zellbreite	3,6 (2,7 – 4,1)	µm
	Länge / Breite	4,2 (3,7 – 5,4)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(73,2 – 107,4)	%
	Spitzenwinkel	40 (33 – 55)	°
	Projektionsfläche	40,5 (36,3 – 48,2)	µm ²
	Umfang	32,1 (29,3 – 37,8)	µm
	Rundheit	51,7 (48,7 – 55,8)	%
Fibulae	Fibulaedichte	16 (12 – 19)	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,42 (0,30 – 0,51)	µm
	Fibulaebreite	0,24 (0,13 – 0,45)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	4,7 (2,4 – 8,3)	%
	Fibulaeabstand	0,43 (0,20 – 0,68)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	11,6 (8,1 – 14,4)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	40 (38 – 43)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5 (5 – 6)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm LG09

Tafel 1 (4 – 6)

Tabelle 23

Mit einer Länge von 35,2 bis 37,0 μm , einer Breite von 3,2 – 3,8 μm gehören die Frusteln des Stammes LG09 innerhalb der untersuchten Stämme eher den langen schmalen Formen an. Der Umriss kann als schmal lanzettlich bis linear beschrieben werden. Das Verhältnis von Länge zu Breite beträgt 10,5 (9,6 – 11,5), die Rundheit schwankt zwischen 21,8 und 24,8 %. Die Enden sind zu meist nur angedeutet kopfig erweitert, mit einem Öffnungswinkel von etwa 18° relativ spitz zulaufend und am Pol gerundet.

Die Raphe verläuft ohne Zentralknoten marginal und wird durch 17 (15 – 20) Fibulae /10 μm stabilisiert. Die Fibulae sind jeweils um die 0,41 μm lang und 0,25 μm breit und etwas unregelmäßig angeordnet.

Am Lichtmikroskop ist die Streifung mit einer Dichte von 40/10 μm kaum mehr auflösbar, die Dichte der Areolen liegt bei bei 5/ μm .

LG09 wurde am 12. September 2003 aus Characeenaufwuchs isoliert. Die Proben stammten aus dem Lauterbach zwischen Eschenlohe und Garmisch-Partenkirchen, einem raschfließenden oligotrophen Quellfluss, der durch den hohen Kalkgehalt sehr elektrolytreich ist.

Stamm LG09 wurde als *Nitzschia palea* bestimmt. Alle morphologischen Merkmale liegen innerhalb der Spannweite, die KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1997) für *Nitzschia palea* angeben.

Ergebnisse

Tabelle 23: Übersicht über morphologische Eigenschaften des Stammes LG09

Schalenmerkmale	Zelllänge	36,1 (35,2 – 37,0)	µm
	Zellbreite	3,5 (3,2 – 3,8)	µm
	Länge / Breite	10,5 (9,6 – 11,5)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(90,3 – 109,9)	%
	Spitzenwinkel	17 (14 – 21)	°
	Projektionsfläche	102,3 (98,3 – 108,7)	µm ²
	Umfang	74,3 (72,7 – 75,9)	µm
	Rundheit	23,3 (21,8 – 24,8)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	17 (15 – 20)	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,41 (0,27 – 0,51)	µm
	Fibulaebreite	0,25 (0,14 – 0,37)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	3,2 (2,0 – 4,5)	%
	Fibulaeabstand	0,41 (0,19 – 0,59)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	10,0 (6,6 – 11,7)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	40 (38 – 40)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5 (5 – 6)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm LG11

Von diesem Stamm war nicht ausreichend Material vorhanden, um nach einer erfolglosen Präparation für die morphologischen Untersuchungen eine weitere Präparation durchzuführen. Die als Backup angelegten Erhaltungskulturen verpilzten, bevor der Stamm angewachsen war.

Daher gibt es von diesem Stamm leider keinerlei mikroskopische Aufnahmen.

Stamm LG11 wurde wie auch Stamm LG09 am 12. September 2003 aus einer Probe von Characeenaufwuchs aus dem Lauterbach isoliert.

Stamm OA02

Tafel 1 (7 – 10)

Tabelle 24

Mit einer Länge von 24,1 – 26,3 μm und einer Breite von 3,1 – 4,0 μm handelt es sich beim Stamm OA02 um einen Klon mit vergleichsweise kurzen, breitlantzettlichen Schalen. Die Schalenfläche hat eine Streifung mit 41 (39-43) Streifen pro 10 μm und 5 Areolen pro μm . Die Enden sind stumpf gerundet, meist schwach kopfig mit einem Öffnungswinkel von 26°. Die Raphe verläuft ohne Zentralknoten am Rand der Schalenfläche. OA02 weist eine Fibulaedichte von 20 (16-23)/10 μm auf. Die einzelnen Fibulae sind im Mittel 0,40 μm lang und 0,19 μm breit. Insgesamt sind die Fibulae leicht unregelmäßig gestellt.

Der Klon OA02 wurde am 21. September 2002 aus einer Sedimentprobe isoliert, die vom Ostufer des Ameisensees im Osterseegebiet stammt. Der betreffende Uferabschnitt wurde bei den Makrophytenkartierungen von 1994 und 2004 (SANDMANN 1995, BECK 2005) als gering nährstoffbelastet eingestuft.

Obwohl die Streifendichte etwas höher ist, als von KRAMMER & LANGE-BERTALOT angegeben, wurde OA02 als *Nitzschia palea* bestimmt.

Ergebnisse

Tabelle 24: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OAO2

Schalenmerkmale	Zelllänge	25,6 (24,1 – 26,3)	µm
	Zellbreite	3,5 (3,1 – 4,0)	µm
	Länge / Breite	7,3 (6,4 – 8,3)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	90,5 (68,1 – 118,1)	%
	Spitzenwinkel	26 (20 – 32)	°
	Projektionsfläche	74,4 (69,3 – 79,5)	µm ²
	Umfang	53,8 (51,1 – 55,6)	µm
	Rundheit	32,3 (29,9 – 34,5)	%
Fibulae	Fibulaedichte	20 (16 – 23)	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,40 (0,24 – 0,52)	µm
	Fibulaebreite	0,19 (0,13 – 0,34)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	2,7 (1,3 – 5,9)	%
	Fibulaeabstand	0,31 (0,10 – 0,64)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	7,7 (2,4 – 15,3)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	41 (39 – 43)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5 (4 – 6)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OA03

Tafel 2 (1 – 6)

Tabelle 25

Große Ähnlichkeit mit dem zuvor beschriebenen Stamm weist Stamm OA03 auf. Die Länge variiert etwas stärker. Im Mittel ist sie mit 23,9 μm kleiner als die von OA02 (Mittelwert: 25,6). Die Breite liegt zwischen 3,2 und 3,8 μm . Die Frusteln dieses Klonen haben eine marginal verlaufende Kanalraphe ohne zentrale Raphenenden, 19 (12-23) Fibulae /10 μm , 41 (40-43) Streifen /10 μm mit 5 Areolen / μm , stumpf gerundeten Enden mit einem Öffnungswinkel von 27° und nur angedeutetem Köpfchen. Die Fibulae sind etwas unregelmäßig angeordnet.

OA03 wurde ebenfalls am 21. September 2002 aus der gleichen Probe wie OA02 isoliert.

Ergebnisse

Tabelle 25: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OAO3

Schalenmerkmale	Zelllänge	23,9 (21,8 – 27,5)	µm
	Zellbreite	3,5 (3,2 – 3,8)	µm
	Länge / Breite	6,8 (6,1 – 7,9)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(71,5 – 89,7)	%
	Spitzenwinkel	27 (22 – 32)	°
	Projektionsfläche	67,3 (61,7 – 73,1)	µm ²
	Umfang	50,0 (45,7 – 56,7)	µm
	Rundheit	34,0 (28,6 – 37,6)	%
Fibulæ	Fibulædichte	19 (12 – 23)	ⁿ /10 µm
	Fibulælänge	n.b.	
	Fibulæbreite	n.b.	
	Standardabweichung Fibulæbreite	n.b.	
	Fibulæabstand	n.b.	
	Standardabweichung Fibulæabstand	n.b.	
Feinstrukturen	Streifendichte	41 (40 - 43)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5 (5 – 6)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OA05

Tafel 2 (8 – 10)

Tabelle 26

Das untersuchte Material dieses Stammes hat lanzettlich-lineare, 32,8 – 35,7 μm lange und 3,3 – 4,3 μm breite, am Ende sich mit einem Winkel von 15 – 26° keilförmig verschmälernde und kopfig gerundete Schalen. Die Areolenreihen sind mit einer Dichte von 41 (39-43)/10 μm angeordnet, die Areolen sitzen mit einer Dichte von 5/ μm auf den Areolenreihen. Die Raphe verläuft deutlich exzentrisch am Rand der Schalenfläche. Ein Zentralknoten, verzweigte Areolenreihen im Bereich des Raphenkanals oder Poroide zwischen Helictoglossa und Schalenrand wurden nicht beobachtet. Über dem Raphenkanal liegen pro 10 μm 15 (13-17) jeweils um die 0,4 μm lange und 0,3 μm breite Fibulae in unregelmäßiger Anordnung. Regelmäßig finden sich zu einer Fibula „verschmolzene“ Doppelfibulae.

Die Isolation des Stammes OA05 erfolgte am 01. September 2003 aus einer Sedimentprobe, die vom Westufer des Ameisensees im Osterseengebiet stammte. Die Nährstoffbelastung des Ameisensees an der Probestelle wurde bei den Makrophytenkartierungen von 1994 als gering und 2004 als sehr gering eingestuft (SANDMANN 1995, BECK 2005).

Aufgrund des regelmäßig gut ausgeprägten Köpfchens und der hohen Streifendichte wurde OA05 als *Nitzschia palea* var. *debilis* bestimmt.

Ergebnisse

Tabelle 26: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OA05

Schalenmerkmale	Zelllänge	34,0 (32,8 – 35,7)	µm
	Zellbreite	3,9 (3,3 – 4,3)	µm
	Länge / Breite	8,7 (7,9 – 10,4)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(89,7 – 119,1)	%
	Spitzenwinkel	21 (15 – 26)	°
	Projektionsfläche	101,7 (95,2 – 112,1)	9 µm ²
	Umfang	70,3 (67,9 – 71,9)	µm
	Rundheit	25,9 (23,6 – 27,7)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	15 (13 – 17)	n/10 µm
	Fibulaelänge	0,42 (0,27 – 0,51)	µm
	Fibulaebreite	0,31 (0,17 – 0,71)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	6,7 (3,0 – 15,1)	%
	Fibulaeabstand	0,41 (0,18 – 0,66)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	10,9 (7,5 – 16,5)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	41 (39 – 43)	n/10 µm
	Areolendichte	5 (5 – 6)	n/µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OA08

Tafel 2 (7)

Tabelle 27

Die Schalen des Stammes OA08 sind gekennzeichnet durch eine schmal lanzettlich bis lineare Form mit spitzen Enden, die beim untersuchten Material deutlich kopfig sind. Die vermessenen Frusteln sind 52,7 und 53,7 μm lang, 4,1 und 4,4 μm breit und haben somit ein Verhältnis von Länge zu Breite von ca. 12,5. Die Streifendichte beträgt 35/10 μm , die Dichte der Fibulae 17/10 μm .

Wie der zuvor beschriebene Stamm wurde der Stamm OA08 am 1. September 2003 aus einer Sedimentprobe vom Westufer des Ameisensees isoliert. Da leider nur sehr wenig brauchbares Material gewonnen werden konnte, beziehen sich die hier angegebenen Maße auf die zwei einzigen, teilweise vermessbaren Frusteln. Mehrere morphologische Parameter konnten nicht erfasst werden.

Taxonomisch kann das Material von Stamm OA08 aufgrund der morphologischen Merkmale zu *Nitzschia gracilis* HANTZSCH 1860 oder *Nitzschia palea* var. *tenuirostris* sensu LANGE-BERTALOT 1976 nec. GRUNOW in VAN HEURCK 1881 zugeordnet werden.

Ergebnisse

Tabelle 27: Übersicht über die morphologischen Parameter des Stammes OAO8

Schalenmerkmale	Zelllänge	53,2 (52,7 – 53,7)	µm
	Zellbreite	4,2 (4,1 – 4,4)	µm
	Länge / Breite	12,5 (12,2 – 12,9)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	n.b.	
	Spitzenwinkel	n.b.	
	Projektionsfläche	n.b.	
	Umfang	n.b.	
	Rundheit	n.b.	
Fibulae	Fibulaedichte	17	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	n.b.	
	Fibulaebreite	n.b.	
	Standardabweichung Fibulaebreite	n.b.	
	Fibulaeabstand	n.b.	
	Standardabweichung Fibulaeabstand	n.b.	
Feinstrukturen	Streifendichte	35	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	ja	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm OA11

Tafel 3 (1 – 3)

Tabelle 28

Stamm OA11 besitzt 44,7 (41,5-52,0) μm lange und 3,2 (2,6 – 4,2) μm breite Frusteln. Mit einem Längen/Breiten-Verhältnis von 12,2 – 16,4 sind die Schalen relativ schmal, die Form ist linear bis etwas lanzettlich mit spitz zulaufenden, kopfigen Enden (Öffnungswinkel 9 – 12°). Die Raphe verläuft stark exzentrisch. Die zentrale Fibulae stehen äquidistant, daher ist anzunehmen, dass keine zentralen Raphenenden ausgeprägt sind. Unter dem Raphenkanal liegen 16 (-17) Fibulae /10 μm .

Weitere Merkmale konnten nicht erfasst werden, da von diesem Klon nur lichtmikroskopische Präparate existieren.

OA11 wurde am 1. September 2003 aus einer Sedimentprobe isoliert, die am Westufer des Ameisensees im Osterseengebiet entnommen wurde. Der entsprechende Uferbereich wurde durch die Makrophytenkartierungen von 1994 und 2004 (SANDMANN 1995, BECK 2005) als gering bzw. als sehr gering nährstoffbelastet klassifiziert.

Der Stamm wurde als *Nitzschia gracilis* HANTZSCH 1860 bzw. *N. palea* var. *tenuirostris* LANGE-BERTALOT 1976 bestimmt.

Ergebnisse

Tabelle 28: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OA11

Schalenmerkmale	Zelllänge	44,7 (41,5 – 52,0)	µm
	Zellbreite	3,2 (2,6 – 4,2)	µm
	Länge / Breite	14,2 (12,2 – 16,4)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(113,2 – 144,7)	%
	Spitzenwinkel	11 (9 – 12)	°
	Projektionsfläche	125,0 (80,6 – 180,5)	µm ²
	Umfang	94,5 (86,7 – 107,5)	µm
	Rundheit	17,2 (13,5 – 19,6)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	16 (16 – 17)	n / 10 µm
	Fibulaelänge	0,49 (0,47 – 0,55)	µm
	Fibulaebreite	0,18	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	n.b.	
	Fibulaeabstand	0,29	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	n.b.	
Feinstrukturen	Streifendichte	n.b.	
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm OE03

Tafel 3 (5, 6)

Tabelle 29

Die einzige zur morphologischen Analyse brauchbare Frustel, die nach mehreren Präparationsversuchen gefunden werden konnte, hat eine Länge von 31,1 μm , eine Breite von 3,1 μm und ist mit einem Verhältnis Länge/Breite von 10,1 und einer Rundheit von 23,5 % eine der schmälere Formen dieser Untersuchung. Die Form der Frustel ist lanzettlich-linear, mit deutlich kopfigen, sich im Winkel von 18° verschmälernden Enden. Die Schale besitzt 12 Fibulae / 10 μm , die Streifung ist am Lichtmikroskop nicht auflösbar. Die Fibulae stehen leicht unregelmäßig, die mittleren Fibulae scheinen im Rahmen der Unregelmäßigkeit der übrigen Fibulae äquidistant, was gegen das Vorhandensein eines Zentralknotens spricht.

Das Isolat stammt vom Südostufer des Eishaussees (Osterseengebiet), das als mäßig nährstoffbelastet eingestuft ist (SANDMANN 1995, BECK 2005). Es wurde am 4. November 2003 aus einem 1,2 cm dicken Biofilm auf einem abgestorbenen Schilfstängel gewonnen.

Aufgrund der kontrastarmen und sehr feinen, daher lichtmikroskopisch nicht auflösbaren Streifung und dem deutlich Köpfchen am Zellende kann der Stamm als *Nitzschia palea* var. *debilis* klassifiziert werden.

Ergebnisse

Tabelle 29: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes *OEO3*

Schalenmerkmale	Zelllänge	31,1	µm
	Zellbreite	3,1	µm
	Länge / Breite	10,1	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(107,2 – 125,7)	%
	Spitzenwinkel	18 (17 – 18)	°
	Projektionsfläche	77,5	µm ²
	Umfang	64,4	µm
	Rundheit	23,5	%
Fibulae	Fibulaedichte	12	n / 10 µm
	Fibulaelänge	n.b.	
	Fibulaebreite	n.b.	
	Standardabweichung Fibulaebreite	n.b.	
	Fibulaeabstand	n.b.	
	Standardabweichung Fibulaeabstand	n.b.	
Feinstrukturen	Streifendichte	n.b.	
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm OH02

Tafel 3 (4)

Tabelle 30

Die Frusteln des Stammes OH02 sind durch eine Länge von 33,8 (33,1 – 34,7) μm , eine Breite von 4,4 (3,5 – 4,9) μm , einer lanzettlich-linearen Form mit sich keilförmig im Winkel von 20° verschmälernden, deutlich kopfigen Enden und einer am Rand der Schalenfläche gelegenen Kanalraphe charakterisiert. Die Fibulae sind mit einer Dichte von 19/10 μm angeordnet, die mittleren Fibulae erscheinen äquidistant gestellt. Die Streifung ist am Lichtmikroskop nicht aufzulösen. Wegen der sehr geringen Menge Material, dass vom Stamm OH02 gewonnen werden konnte, ließ sich kein Präparat für das REM herstellen. Messungen zur Streifendichte, Aroelendichte und den Fibulaedimensionen konnten daher nicht durchgeführt werden.

Anhand der vorhandenen Daten und Bilder wurde OH02 unter Vorbehalt als *Nitzschia palea* bestimmt.

Der Stamm wurde am 1. Oktober 2002 aus dem Ausstrich einer Aufwuchssuspension isoliert. Das Rohmaterial für den Ausstrich stammt von einem Objektträger, der als Kunstsubstrat in ein Exclosure eingebracht wurde. Das Exclosure verblieb vier Wochen im Herrenalsee, dessen Nährstoffbelastung als sehr gering beurteilt wird (SANDMANN 1995, BECK 2005). Die Aufwuchssuspension wurde am 21. September 2002 ausplattiert.

Ergebnisse

Tabelle 30: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OH02

Schalenmerkmale	Zelllänge	33,8 (33,1 – 34,7)	µm
	Zellbreite	4,4 (3,5 – 4,9)	µm
	Länge / Breite	7,7 (6,8 – 9,8)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(91,6 – 141,9)	%
	Spitzenwinkel	20 (11 – 27)	°
	Projektionsfläche	114,3 (93,3 – 128,4)	µm ²
	Umfang	70,0 (68,8 – 71,0)	µm
	Rundheit	23,3 (24,0 – 32,5)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	19	n / 10 µm
	Fibulaelänge	n.b.	
	Fibulaebreite	n.b.	
	Standardabweichung Fibulaebreite	n.b.	
	Fibulaeabstand	n.b.	
	Standardabweichung Fibulaeabstand	n.b.	
Feinstrukturen	Streifendichte	n.b.	
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm OH03

Tafel 3 (7 – 10); 4

Tabelle 31

Stamm OH03 besitzt lineare bis leicht lanzettliche Frusteln mit sich keilförmig verjüngenden, am Zellpol deutlich kopfigen Enden. Die Zellen sind 31,4 (29,4 – 42,0) μm lang und 3,5 (3,1 – 4,8) μm breit. Das keilförmige Ende verjüngt sich im Winkel vom 22°. Die Raphe verläuft am Rand der Schalenfläche ohne Zentralknoten, der Raphenkanal wird durch 18 (16 – 20)/10 μm Fibulae stabilisiert, wobei die einzelnen Fibulae um 0,41 μm lang und 0,26 μm breit sind. Die Anordnung der Fibulae ist nur leicht unregelmäßig. Auf der Schalenfläche sind 41 Transapikalrippen/10 μm gelegen. Zwischen den Transapikalrippen liegen Areolenreihen mit 5 Areolen/ μm . Im Bereich zwischen Helictoglossa und Schalenrand befinden sich keine Poroide.

Aufgrund der morphologischen Daten wurde der Klon in den Formenkreis um *Nitzschia palea* eingeordnet. Die relativ dichten Streifen und das ausgeprägte Köpfchen deuten auf die Varietät *debilis* hin.

Die Isolation von OH03 erfolgte am 1. Oktober 2002 aus einer Sedimentprobe des bereits bei Stamm OH02 beschriebenen Herrensees.

Ergebnisse

Tabelle 31: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes *OH03*

Schalenmerkmale	Zelllänge	31,4 (29,4 – 42,0)	µm
	Zellbreite	3,5 (3,1 – 4,8)	µm
	Länge / Breite	9,0 (8,2 – 9,9)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(103,5 – 126,6)	%
	Spitzenwinkel	22 (18 – 27)	°
	Projektionsfläche	85,6 (78,2 – 97,7)	µm ²
	Umfang	64,5 (62,2 – 67,0)	µm
	Rundheit	25,9 (23,5 – 27,6)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	18 (16 – 20)	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,41 (0,24 – 0,49)	µm
	Fibulaebreite	0,26 (0,21 – 0,40)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	3,6 (2,5 – (6,0)	%
	Fibulaeabstand	0,33 (0,12 – 0,60)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	11,4 (6,3 – 16,3)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	41 (40 – 42)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OH04

Tafel 5 (1- 4)

Tabelle 32

Länglich-lanzettliche bis spindelförmige, 43,9 (42,1 – 46,4) μm lange und 3,8 (3,4 – 4,2) μm breite Frusteln mit kopfig gerundeten Enden kennzeichnen Stamm OH04. Die Spitzen öffnen sich in einem Winkel von 14 (10 -17)°. Das Verhältnis von Länge zu Breite von 11,5 (10,1 – 12,7) und die vergleichsweise geringe Rundheit von 20,1 (18,0 – 21,6) belegen, dass es sich um eine der etwas länglicheren Formen handelt. Die Raphe liegt stark exzentrisch am Rand der Schalenfläche. Ein Zentralknoten fehlt. Die Areolenreihen im Bereich der Raphe sind nicht verzweigt. Der Stamm besitzt 14 (12 -14)/10 μm Fibulae und 40 (36 – 45)/10 μm Streifen.

Morphologisch wurde Stamm OH04 als *Nitzschia gracilis* bzw. *Nitzschia palea* var. *tenuirostris* bestimmt. Zu den bestehenden Differenzierungsproblemen zwischen diesen Taxa siehe KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1988).

Das Isolat, aus dem der Stamm OH04 herangezogen wurde, stammt aus einer Sedimentprobe, die am 21. September 2002 aus dem Herrensee (Beschreibung des Sees siehe „Stamm OH02“) entnommen wurde.

Ergebnisse

Tabelle 32: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OH04

Schalenriss	Zelllänge	43,9 (42,1 – 46,4)	µm
	Zellbreite	3,8 (3,4 – 4,2)	µm
	Länge / Breite	11,5 (10,1 – 12,7)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(94,7 – 118,6)	%
	Spitzenwinkel	14 (10 – 17)	°
	Projektionsfläche	133,0 (119,1 – 149,0)	µm ²
	Umfang	91,2 (87,5 – 95,0)	µm
	Rundheit	20,1 (18,0 – 21,6)	%
Fibulae	Fibulaedichte	13 (12 – 14)	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,63 (0,55 – 0,72)	µm
	Fibulaebreite	0,38 (0,31 – 0,44)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	6,0	%
	Fibulaeabstand	0,52 (0,19 – 0,77)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	18,4	%
Feinstrukturen	Streifendichte	40 (36 – 45)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OH05

Tafel 5 (5, 6)

Tabelle 19

Die mit einem Längen zu Breiten-Verhältnis von 8,5 relativ breit-gedrunenen, lanzettlich-linearen Schalen des Stammes OH05 sind 31,3 – 32,3 µm lang und 3,6 – 3,8 µm breit. Die Enden laufen mit 2 - 24° keilförmig zu und enden mit einem mäßig ausgeprägten Köpfchen. Die Raphe verläuft ohne Zentralknoten oder verzweigte Areolenreihen in ihrem Bereich stark exzentrisch. Der Raphenkiel ragt kaum aus der Schalenfläche heraus. Die Schalenfläche ist mit 40-41 Areolenreihen bzw. Streifen pro 10 µm gestreift, auf denen 5 Areolen pro µm liegen. Die Fibulae sind leicht unregelmäßig gestellt. Ihre Dichte beträgt 16 – 18/10 µm.

Aufgrund der Schalenmorphologie wurde der Stamm als *Nitzschia palea* bestimmt. Die gelegentlich kopfigen Enden und die für das Taxon sehr dichte Streifung deuten dabei eher auf die Varietät *debilis* hin, während die vergleichsweise kurze gedrungene Form eher der Nominatform entsprechen.

OH05 wurde am 21. September 2002 zunächst aus der gleichen Probe isoliert wie OH04. Aufgrund einer offensichtlichen Kontamination mit Grünalgen wurde das endgültig verwendete Material bei einer Aufreinigung am 10. Oktober 2002 isoliert.

Ergebnisse

Tabelle 33: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OH05

Schalenmerkmale	Zelllänge	31,8 (31,3 - 32,3)	µm
	Zellbreite	3,7 (3,6 - 3,8)	µm
	Länge / Breite	8,5 (8,3 - 8,9)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(88,3 - 114,7)	%
	Spitzenwinkel	22 (20 - 24)	°
	Projektionsfläche	94,2 (93,4 - 94,7)	µm ²
	Umfang	65,0 (65,0 - 65,1)	µm
	Rundheit	28,0 (27,7 - 28,2)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	17 (16 - 18)	n/10 µm
	Fibulaelänge	0,38 (0,21 - 0,51)	µm
	Fibulaebreite	0,24 (0,17 - 0,50)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	4,1 (8,2 - 1,8)	%
	Fibulaeabstand	0,37 (0,14 - 0,55)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	12,1 (11,0 - 12,9)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	41 (40 - 41)	n/10 µm
	Areolendichte	5 (4 - 5)	n/µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OL01

Tafel 6 (1 – 3)

Tabelle 18

Mit einem Verhältnis Länge/Breite von 12,9 – 15,5 gehört OL01 zu den sehr langgestreckten Formen innerhalb der untersuchten Stämme. Die Länge der schmal lanzettlichen, in der Mitte linearen Frusteln schwankt dabei zwischen 43,7 und 44,7 μm , die Breite zwischen 2,8 und 3,4 μm . Der Öffnungswinkel der sich keilförmig verschmälernden Enden liegt bei 13 (9-16)°. Die Spitzen sind stets kopfig erweitert. Die Raphe verläuft deutlich exzentrisch. Ein Conopeum oder ein Zentralknoten sind nicht vorhanden. Der Raphenkanal ist kaum als Kiel ausgebildet. Über dem Raphenkanal liegen 15 Fibulae pro 10 μm , wobei die einzelne Fibula 0,32 (0,26 - 0,37) μm lang und 0,31 (0,21 – 0,49) μm breit ist. Die Anordnung der Fibulae ist leicht unregelmäßig. Auf der Schalenfläche liegen 39 Streifen/10 μm . Die Areolen auf den Streifen sind mit einer Dichte von 5/ μm angeordnet.

Mit dieser Merkmalskombination entspricht Stamm OL01 den von LANGE-BERTALOT & KRAMMER (1988) für *Nitzschia gracilis* bzw. *Nitzschia palea* var. *tenuirostris* angegebenen Merkmalen. Zur Problematik *N. gracilis* – *N. palea* var. *tenuirostris* siehe KRAMMER & LANGE-BERTALOT 1996

Der Stamm OL01 wurde am 5. September 2003 aus einer Probe der Sedimentoberfläche aus dem Lustsee im Osterseengebiet isoliert. Der Gewässerabschnitt am nordöstlichen Ende des Sees, aus dem die Probe stammte, wurde bei den Makrophytenkartierungen von 1994 und 2004 als sehr gering mit Nährstoffen belastet eingestuft (SANDMANN 1995, BECK 2005).

Ergebnisse

Tabelle 34: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OLO1

Schalenmerkmale	Zelllänge	44,0 (43,7 – 44,7)	µm
	Zellbreite	3,2 (2,8 – 3,4)	µm
	Länge / Breite	13,8 (12,9 – 15,5)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(91,3 – 112,7)	%
	Spitzenwinkel	13 (10 – 17)	°
	Projektionsfläche	114,0 (99,7 – 126,4)	µm ²
	Umfang	90,0 (89,2 – 91,9)	µm
	Rundheit	17,7 (15,8 – 20,0)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	15 (14 – 16)	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,32 (0,25 – 0,37)	µm
	Fibulaebreite	0,31 (0,21 – 0,49)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	6,0 (2,9 – 7,3)	%
	Fibulaeabstand	0,38 (0,14 – 0,82)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	11,3 (6,9 – 20,5)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	39 (38 – 40)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5 (5 – 6)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OQ09

Tafel 6 (4 – 5)

Tabelle 35

Aufgrund von Problemen bei der Präparation konnte nur eine einzige Frustel dieses Stammes komplett vermessen werden. Diese ist 35,9 µm lang, 3,9 µm breit, schmal lanzettlich und hat leicht kopfig gerundete Enden. Die Streifung der Frustel sowie der vermessbaren Bruchstücke ist mit 25/10 µm im Verhältnis zu den übrigen vermessenen Klonen ziemlich grob. Die Areolen auf den Streifen sind mit einer Dichte von 4/µm angeordnet, die Fibulae mit 12/10 µm. Interessanterweise weist OQ09 abweichend von den übrigen rasterelektronenmikroskopisch untersuchten Stämmen im Bereich der Raphe eine gabelförmige Verzweigung der Areolenreihen auf. Die Raphe verläuft stark exzentrisch. Der Raphenkanal scheint nicht stark kielförmig oder röhrenförmig ausgebildet zu sein. Im vorliegenden Material war keine Raphe direkt sichtbar, so dass hier auch keine gesicherten Aussagen über das Vorhandensein zentraler Raphenenden gemacht werden können. Fehlende Unregelmäßigkeiten der Areolenreihen im zentralen Bereich des Raphenkanals legen aber den Schluss nahe, dass kein Zentralknoten vorhanden ist. Eine Bestimmung anhand morphologischer Merkmale bleibt dennoch problematisch. Eine Einordnung als *Nitzschia palea* scheidet lt. KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1997) jedoch aufgrund der verzweigten Areolenreihen sicher aus. Unter der Voraussetzung, dass zentrale Raphenenden tatsächlich fehlen, könnte der Stamm als *Nitzschia perminuta* klassifiziert werden. Im Falle vorhandener zentraler Raphenenden könnte OQ09 dem Formenkreis um *N. hantzschiana* und *N. acidoclinata* zugeordnet werden.

Genetisch wird Stamm OQ09 in die gleiche Gruppe gestellt, wie beispielsweise Stamm OAo8, Stamm SUo1 oder Stamm SGo1. Bei allen letztgenannten Stämmen handelt es jedoch um Formen, die als *N. palea* bzw. *N. palea* var. *tenuirostris* bestimmt wurden.

Auch aus ökologischer Sicht ist die Diagnose als *Nitzschia perminuta*, *N. hantzschiana* oder *N. acidoclinata* problematisch. KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1997) geben für die Verbreitung aller drei Taxa elektrolytarmer Gewässer, ver-

mutlich mit einer Präferenz für geringe oder sehr geringe Belastungen an. Stamm OQ09 wurde jedoch aus Aufwuchsmaterial von *Hippuris vulgaris* isoliert. Die *Hippuris*-Triebe wurden am 16. Februar 2004 aus den Limnokrenen im Westen des Waschsees entnommen. Der zu den Osterseen gehörende Waschsee und seine Quellen weisen bedingt durch den stark kalkhaltigen Grundwasserleiter sowie anthropogener Einflüsse der unmittelbar angrenzenden Ortschaft Iffeldorf hohe Elektrolytgehalte und sehr starke Nährstoffbelastungen auf (SANDMANN 1995, BECK 2005).

Ergebnisse

Tabelle 35: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OQ09

Schalenmerkmale	Zelllänge	35,9	µm
	Zellbreite	3,9 (3,6 – 4,3)	µm
	Länge / Breite	10,1	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(95,8 – 122,4)	%
	Spitzenwinkel	14 (11 – 18)	°
	Projektionsfläche	95,8	µm ²
	Umfang	73,5	µm
	Rundheit	23,3	%
Fibulæ	Fibulædichte	12	ⁿ /10 µm
	Fibulælänge	n.b.	
	Fibulæbreite	n.b.	
	Standardabweichung Fibulæbreite	n.b.	
	Fibulæabstand	n.b.	
	Standardabweichung Fibulæabstand	n.b.	
Feinstrukturen	Streifendichte	25	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	4	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	ja	

Stamm OR02

Tafel 6 (6 – 8)

Tabelle 36

Mit einer Länge von 36,8 – 38,4 µm und einem Verhältnis von Länge zu Breite von 8,6 – 10,9 gehören die Zellen des Stammes OR02 zu den nur leicht langgestreckten Formen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die Schalen sind dabei zwischen 3,5 und 4,4 µm breit, besitzen eine deutlich exzentrische Raphe ohne Zentralknoten, mit leicht röhrig-kielartig hervorgehobenem Raphenkanal und stumpf gerundete, leicht vorgezogene, jedoch kaum kopfig erweiterte Enden, die sich in einem Winkel von 19 (17 - 20)° verjüngen. Der Umriss ist als schmal linear bis leicht lanzettlich zu beschreiben. Auf der Schalenfläche liegen 37 - 39 Areolenreihen/10 µm, auf denen 4 - 5 Areolen pro µm angeordnet sind. Die Fibulaedichte betrug bei allen vermessenen Exemplaren konstant 16/10 µm. Die einzelne Fibula ist 0,43 (0,41 – 0,47) µm lang und 0,20 (0,16 – 0,27) µm breit. Die Fibulae sind nur leicht unregelmäßig angeordnet.

In äußerer Form, ihren Größenverhältnissen und ihren Streifen- und Fibulaedichten entsprechen die Zellen des Stammes OR02 weitgehend den für *Nitzschia palea* gemachten Angaben. Abweichend von diesen ist jedoch der über die Schalenoberfläche erhabene Raphenkanal. Desweiteren sind die Fibulae vergleichsweise schmal wirkend, ihre Dichte liegt an der oberen Grenze der für *N. palea* angegebenen Werte.

Der Stamm wurde am 13. November 2002 aus einem Ausstrich von Sedimentoberflächenmaterial isoliert, das am 23. Oktober 2002 dem Forchensee entnommen wurde. Der entsprechende Uferabschnitt am Nordwestufer des zu den Osterseen gehörenden Forchensees wurde bei der Makrophytenkartierung von 1994 als gering mit Nährstoffen belastet, bei der Makrophytenkartierung von 2004 als sehr gering belastet eingestuft (SANDMANN 1995, BECK 2005) Zum Forchensee ist ferner anzumerken, das dieser See, der zu den kleinsten der Osterseen gehört, stärker als die meisten übrigen Seen durch anliegende Moorgebiete beeinflusst wird. So ist das Wasser des Forchensees deutlich mit Huminstoffen gefärbt und die Sedimentoberfläche enthält viele torfige Bestandteile.

Ergebnisse

Tabelle 36: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes *OR02*

Schalenmerkmale	Zelllänge	37,8 (36,8 – 38,4)	µm
	Zellbreite	3,9 (3,5 – 4,4)	µm
	Länge / Breite	9,7 (8,6 – 10,9)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(95,1 – 106,8)	%
	Spitzenwinkel	19 (17 – 20)	°
	Projektionsfläche	119,7 (113,5 – 124,8)	µm ²
	Umfang	77,9 (76,2 – 78,9)	µm
	Rundheit	24,8 (22,9 – 26,4)	%
Fibulae	Fibulaedichte	16	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,43 (0,41 – 0,47)	µm
	Fibulaebreite	0,20 (0,16 – 0,27)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	3,3	%
	Fibulaeabstand	0,43 (0,31 – 0,59)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	9,3	%
Feinstrukturen	Streifendichte	38 (37 - 39)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5 (4 – 5)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OS02

Tafel 7 (1 – 4)

Tabelle 37

Die Zellen des Stammes OS02 sind 33,6 – 35,8 µm lang und 4,1 – 4,9 µm breit mit einem bezüglich der Längsachse und der Transapikalachse weitgehend symmetrischen Umriss. Das Verhältnis von Länge zu Breite variiert zwischen 7,3 und 8,7, die Rundheit der Zellen zwischen 28,8 und 34,6 %, womit der Umriss als eher breit gerundet beschrieben werden kann. Die stumpf gerundeten, nur leicht schnabelförmig vorgezogenen Spitzen öffnen sich in einem Winkel von ca. 21,2°. Die Kanalraphe ist deutlich an den Rand der Frusteln verschoben. Ein Zentralknoten konnte beim untersuchten Material nicht gefunden werden.

Die Streifen des Stammes sind mit 16 – 20 Streifen pro 10 µm sehr grob und auch lichtmikroskopisch gut erkennbar. Gleiches gilt für die Areolen, die eine Dichte von 3 pro µm längs der Streifen aufweisen. Pro 10 µm weisen die Frusteln dieses Stammes 7 - 10 Fibulae auf, die leicht unregelmäßig gestellt sind und etwas in die Schalenfläche hinein verlängert erscheinen. Die einzelne Fibula ist zwischen 0,52 und 1,07 µm lang und im Mittel 0,44 µm breit.

Stamm OS02 wurde am 10. Juli 2003 aus Aufwuchs auf Blättern von *Nuphar lutea* isoliert, die vom Südwestufer des Sengsees stammten. Dieser Abschnitt des Sengsees wird in den Makrophytenkartierungen von 1994 als stark mit Nährstoffen belastet und 2004 als mäßig – erheblich belastet eingestuft (SANDMANN 1995, BECK 2005).

Stamm OS02 wurde als *Nitzschia amphibia* GRUNOW 1862 klassifiziert. Alle erfassten Merkmale entsprechen den von LANGE-BERTALOT & KRAMMER (1997) für die Nominatform *f. amphibia* angegebenen Eigenschaften.

Vergleichende Untersuchungen der SSU-Daten von LOIBL (2005) zeigen, dass *N. amphibia* verwandtschaftlich *N. amphibioides* relativ nahe steht. Diese Gruppe relativ grob strukturierter *Nitzschia*-Taxa steht ausserdem in einem relativ engen Zusammenhang mit den schon als „*Nitzschioidea*“ bezeichneten Taxa der Gattung *Denticula*, wie z.B. *Denticula kuetzingii*.

Tatsächlich findet man im Freiland immer wieder Populationen mit Frusteln, bei denen lichtmikroskopisch eine Unterscheidung zwischen *N. amphibia* und *Denticula kuetzingii* problematisch ist.

Innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Stämme ist Stamm OS02 der einzige, der sich deutlich vom Formenkreis um *Nitzschia palea* abgrenzt.

Ergebnisse

Tabelle 37: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OS02

Schalenmerkmale	Zelllänge	35,2 (33,6 – 35,8)	µm
	Zellbreite	4,5 (4,1 – 4,9)	µm
	Länge / Breite	7,9 (7,3 – 8,7)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(57,0 – 102,8)	%
	Spitzenwinkel	21,2 (14,4 – 34,9)	°
	Projektionsfläche	129,6 (114,7 – 139,9)	µm ²
	Umfang	72,8 (69,8 – 75,9)	µm
	Rundheit	30,4 (28,8 – 34,6)	%
Fibulae	Fibulaedichte	9 (7 – 10)	ⁿ / ₁₀ µm
	Fibulaelänge	0,75 (0,52 – 1,07)	µm
	Fibulaebreite	0,44 (0,18 – 0,95)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	10,2 (0 – 2,1)	%
	Fibulaeabstand	0,63 (0,13 – 1,07)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	15,7 (5,5 – 2,4)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	18 (16 – 20)	ⁿ / ₁₀ µm
	Areolendichte	3 (2 – 3)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	ja	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm OW01

Tafel 7 (5, 6)

Tabelle 38

Charakterisiert durch eine langgestreckte, lineare bis leicht lanzettliche Form und kopfig erweiterte Enden der sich keilförmig im Winkel von $12^\circ - 17^\circ$ verschmälernden Spitzen, gehören die Frusteln des Stammes OW01 mit $48,3 (37,5 - 50,2) \mu\text{m}$ Länge zu den längsten Formen, die innerhalb dieser Studie untersucht wurden. Die Breite liegt bei $3,9 (3,4 - 4,5) \mu\text{m}$, das Verhältnis von Länge zu Breite bei $12,5 (11,2 - 13,9)$ und die Rundheit bei $18,7 (17,0 - 20,6) \%$. Die Dichte der leicht unregelmäßig angeordneten Fibulae beträgt bei allen vermessenen Schalen $15/10 \mu\text{m}$, die Dichte der Streifen $39 (36-42)/10 \mu\text{m}$. Auf den Streifen liegen 5 - 6 Areolen pro μm . Die Raphe ist durchlaufend, ohne Zentralknoten und stark exzentrisch am Rand der Schalenfläche angeordnet. Verzweigte Areolenreihen im Bereich des Raphenkanals oder eine deutlich kiel- oder röhrenförmige Ausbildung des Raphenkanals sind nicht vorhanden.

Aufgrund der langgestreckten Form mit dem kopfig erweiterten Ende, der Streifen und Fibulaedichte wurde der Stamm als *Nitzschia palea* var. *tenuirostris* bzw. *Nitzschia gracilis* bestimmt.

Stamm OW01 stammt aus einer Probe von der Sedimentoberfläche vom Nordufer des Westlichen Breitenauer Sees. Der entsprechende Seeabschnitt wurde von SANDMANN (1995) als mäßig nährstoffbelastet eingestuft, von BECK (2005) als gering nährstoffbelastet. Die Isolation des Stammes erfolgte am 3. September 2003.

Ergebnisse

Tabelle 38: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OW01

Schalenmerkmale	Zelllänge	48,3 (37,5 – 50,2)	µm
	Zellbreite	3,9 (3,4 – 4,5)	µm
	Länge / Breite	12,5 (11,2 – 13,9)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(87,4 – 139,7)	%
	Spitzenwinkel	14 (12 – 17)	°
	Projektionsfläche	152,7 (136,0 – 174,1)	µm ²
	Umfang	101,4 (100,2 – 103,0)	µm
	Rundheit	18,7 (17,0 – 20,6)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	15 (15 – 16)	n/10 µm
	Fibulaelänge	0,37 (0,30 – 0,48)	µm
	Fibulaebreite	0,28 (0,15 – 0,43)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	5,9 (4,2 – 7,5)	%
	Fibulaeabstand	0,44 (0,15 – 0,73)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	12,6 (9,1 – 15,0)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	39 (36 – 42)	n/10 µm
	Areolendichte	6 (5 – 6)	n/µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OW05

Tafel 7 (7– 10)

Tabelle 39

Die Frusteln des Stammes OW05 sind 38,8 (32,7 – 42,8) μm lang und 4,1 (3,4 – 4,9) μm breit, von schmal lanzettlicher, in der Mitte linearer Form mit leicht kopfig gerundeten Enden. Die Fibulae des Klones sind mit einer Dichte von 12 – 17/10 μm unter der deutlich exzentrischen, durchgängigen Raphe angeordnet. Auf der Schalenfläche befinden sich 39 - 42 Areolenreihen/10 μm auf denen 5 Areolen pro μm liegen.

OW05 wurde aufgrund der morphologischen Eigenschaften *Nitzschia palea* zugeordnet, wobei die Streifendichte an der oberen Grenze des von Krammer & Lange-Bertalot angegebenen Rahmens ist und bei einigen der vermessenen Frusteln auch darüber liegt.

Aus der gleichen Probe stammend wie OW01, wurde Stamm OW05 am 3. September 2003 isoliert.

Ergebnisse

Tabelle 39: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OWo5

Schalenmerkmale	Zelllänge	38,8 (32,7 – 42,8)	µm
	Zellbreite	4,1 (3,4 – 4,9)	µm
	Länge / Breite	9,4 (8,0 – 10,3)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(87,7 – 115,4)	%
	Spitzenwinkel	19 (13 – 24)	°
	Projektionsfläche	115,3 (96,3 – 138,4)	µm ²
	Umfang	77,1 (67,7 – 87,5)	µm
	Rundheit	24,5 (21,1 – 28,2)	%
Fibulae	Fibulaedichte	14 (12 – 17)	ⁿ / _{10 µm}
	Fibulaelänge	0,39 (0,31 – 0,51)	µm
	Fibulaebreite	0,25 (0,16 – 0,41)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	56,5 (3,4 – 6,9)	%
	Fibulaeabstand	0,39 (0,13 – 0,57)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	10,2 (7,9 – 14,3)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	40 (39 – 42)	ⁿ / _{10 µm}
	Areolendichte	5	ⁿ / _{1 µm}
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	ja	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OW09

Tafel 8 (6, 7)

Tabelle 40

Die mit 44,1 (43,9 – 44,2) μm Länge und 3,7 (3,6 – 3,8) μm Breite zu den relativ schmalen und langen Formen gehörenden Frusteln des Stammes OW09 sind linear bis schwach lanzettlich geformt und besitzen sich keilförmig, im Winkel von 17 (14 – 20) ° verschmälernde, am Ende kopfig gerundete Enden. Die Raphe verläuft auf den untersuchten Schalen stark exzentrisch. Zentrale Raphenenden, verzweigte Areolenreihen oder deutlich röhren- oder kielförmige Ausprägungen des Raphenkanals konnten nicht beobachtet werden. Die leicht unregelmäßig angeordneten Fibulae sind in einer Dichte von 15/10 μm angeordnet, die Streifen in einer Dichte von 41/10 μm mit 4 – 5 Areolen/ μm .

Die langgestreckte Form der Zellen dieses Stammes, zusammen mit dem kopfigen Ende und der relativ hohen Streifendichte legt eine taxonomische Einordnung bei *Nitzschia gracilis* bzw. *Nitzschia palea* var. *tenuirostris* nahe.

Wie schon OW01 und OW05 wurde auch der Stamm OW09 am 3. September 2003 aus der gleichen Probe von der Sedimentoberfläche des Westlichen Breitenauer Sees isoliert.

Ergebnisse

Tabelle 40: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OWo9

Schalenmerkmale	Zelllänge	44,1 (43,9 – 44,2)	µm
	Zellbreite	3,7 (3,6 – 3,8)	µm
	Länge / Breite	12,0 (11,6 – 12,3)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(74,6 – 114,2)	%
	Spitzenwinkel	17 (14 – 20)	°
	Projektionsfläche	129,1 (128,5 – 129,7)	µm ²
	Umfang	90,1 (90,0 – 90,5)	µm
	Rundheit	20,0 (19,9 – 20,0)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	15	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,33 (0,13 – 0,47)	µm
	Fibulaebreite	0,27 (0,13 – 0,47)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	4,1 (3,0 – 5,0)	%
	Fibulaeabstand	0,44 (0,18 – 0,57)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	10,9 (8,8 – 12,9)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	41	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	5 (4 – 5)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm OW11

Tafel 8 (9)

Tabelle 41

Da es beim Stamm OW11 erhebliche Probleme mit der Präparation der ohnehin schon sehr geringen Mengen gegeben hat, standen für die morphologischen Untersuchungen keine rasterelektromikroskopischen Bilder und nur ein lichtmikroskopisches Bild zur Verfügung. Infolgedessen konnten nicht alle Merkmale erfasst werden.

Die einzige vermessene Schale diese Klones ist 33,3 µm lang und 2,8 µm breit. Die Form ist schmal linear mit keilförmigen, am Ende kopfig erweiterten Zellpolen. Die Raphe liegt deutlich exzentrisch, die äquidistanten mittleren Fibulae sprechen gegen einen Zentralknoten. Gesicherte Aussagen hierzu sind jedoch aus o. g. Gründen nicht möglich. Auf der Schalenfläche sind 14 Fibulae/10 µm sichtbar. Die Streifen sind lichtmikroskopisch nicht auflösbar. Der stellenweise streifige Eindruck des lichtmikroskopischen Bildes legt jedoch nahe, dass die Streifen vergleichsweise grob sind.

Aufgrund der fehlenden Daten ist eine Bestimmung des Stammes OW11 mit morphologischen Merkmalen problematisch. Am ehesten entsprechen die Merkmale denen von *Nitzschia palea*. Die Breite ist im Vergleich zu den übrigen untersuchten Stämmen sehr gering, liegt aber noch in dem für *N. palea* angegebenen Bereich (Krammer & Lange-Bertalot)

Das Material aus dem der Stamm OW11 am 3. September 2003 isoliert wurde, stammt vom nördlichen Ufer des Westlichen Breitenauer Sees, das aktuell als gering mit Nährstoffen belastet eingestuft wird (BECK 2005).

Ergebnisse

Tabelle 41: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes OW11

Schalenmerkmale	Zelllänge	33,3	µm
	Zellbreite	2,8	µm
	Länge / Breite	11,8	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(109,7 – 114,7)	%
	Spitzenwinkel	20	°
	Projektionsfläche	84,4	µm ²
	Umfang	68,8	µm
	Rundheit	22,4	%
Fibuläre	Fibulaedichte	14	n / 10 µm
	Fibulaelänge	0,58 (0,47 – 73,8)	µm
	Fibulaebreite	0,32 (0,29 – 0,38)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	4,6	%
	Fibulaeabstand	0,34 (0,18 – 0,37)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	n.b.	
Feinstrukturen	Streifendichte	n.b.	
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm SG01

Tafel 8 (1 – 5)

Tabelle 42

Stamm SG01 besitzt schmal lineare Frusteln von 47,6 (46,1 – 48,6) μm Länge und 3,2 (2,9 – 3,5) μm Breite. Die Enden verschmälern sich keilförmig im Winkel von 13 (9 – 18) $^\circ$, sind etwas ausgezogen und kopfig gerundet. Die Erweiterung des Köpfchens am Ende ist nur schwach.

Auf der Schalenfläche liegen 40 (37 - 44) Areolenreihen/10 μm , auf denen 5 – 6 Areolen/ μm angeordnet sind.

Die durchlaufende Raphe verläuft stark exzentrisch. Unter dem Raphenkanal liegen 13 (12 – 15) Fibulae pro 10 μm , die um 0,42 μm lang und 0,35 μm breit sind und somit eher kurz und breit wirken. Die Anordnung der Fibulae ist etwas unregelmäßig. Es treten häufig „Doppelfibulae“ auf.

Die Merkmalskombination entspricht vollständig *Nitzschia gracilis*, soweit von KRAMMER & LANGE-BERTALOT (1997) angegeben.

Die Isolation des Stammes erfolgte am 20. August 2003 aus Aufwuchs von *Najas marina*. Das Material wurde am Tag zuvor aus dem Starnberger See bei Garatshausen aus ca. 2 m Tiefe entnommen. Die Nährstoffbelastung der Probenahmestelle wurde von MELZER & ZIMMERMANN (2001) als mäßig – erheblich eingestuft.

Ergebnisse

Tabelle 42: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes SGO1

Schalenmris	Zelllänge	47,6 (46,1 – 48,6)	µm
	Zellbreite	3,2 (2,9 – 3,5)	µm
	Länge / Breite	14,6 (13,6 – 16,3)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(78,2 – 119,3)	%
	Spitzenwinkel	13 (9 - 18)	°
	Projektionsfläche	127,6 (117,1 – 136,0)	µm ²
	Umfang	97,3 (94,9 – 99,5)	µm
	Rundheit	16,9 (15,9 – 18,1)	%
Fibulae	Fibulaedichte	13 (12 - 15)	ⁿ /10 µm
	Fibulaelänge	0,42 (0,31 – 0,65)	µm
	Fibulaebreite	0,35 (0,23 – 0,59)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	6,2 (3,1 – 7,8)	%
	Fibulaeabstand	0,42 (0,14 – 0,79)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	13,7 (6,9 – 20,1)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	40 (37 - 44)	ⁿ /10 µm
	Areolendichte	6 (5 – 6)	ⁿ /µm
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	nein	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	nein	

Stamm SU01

Tafel 9 (1 – 5)

Tabelle 43

Die Frusteln des Stammes SU01 sind bei einer Breite von 4,7 (4,1-5,2) μm 31,7 (30,1 – 33,0) μm lang und von breit lanzettlicher bis leicht linearer Form mit keilförmig, sich im Winkel von 25 (17 – 32) ° verjüngenden, gerundeten Enden. Gelegentlich ist die Rundung am Zellpol als leichtes Köpfchen ausgebildet. Der Stamm hat 13 (10 – 16) Fibulae/10 μm , die deutlich unregelmäßig gestellt sind. Die Raphe verläuft stark exzentrisch. Ein Zentralknoten oder verzweigte Areolenreihen konnten nicht gefunden werden. Es liegen allerdings für diesen Stamm keine rasterelektromikroskopischen Bilder vor, so dass eine gesicherte Aussage zu diesen beiden Merkmalen nicht getroffen werden kann.

Die Streifen konnten am Lichtmikroskop nicht aufgelöst werden. Aus o.g. Gründen kann somit zur Streifen- und Areolendichte ebenfalls keine Aussage getroffen werden.

Die morphologisch basierte Klassifizierung stellt Stamm SU01 zu *Nitzschia palea*.

SU01 wurde am 05. Juni 2003 aus Aufwuchs von *Potamogeton perfoliatus* isoliert. Das Pflanzenmaterial von *Potamogeton perfoliatus* wurde aus ca. 3 m Tiefe aus dem Starnberger See bei Unterzeismering entnommen. Der entsprechende Gewässerabschnitt wurde bei einer Makrophytenkartierung im Jahr 2000 als erheblich mit Nährstoffen belastet eingestuft (MELZER & ZIMMERMANN 2001).

Ergebnisse

Tabelle 43: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes *SU01*

Schalenmerkmale	Zelllänge	31,7 (30,1 – 33,0)	µm
	Zellbreite	4,7 (4,1 – 5,2)	µm
	Länge / Breite	6,8 (6,0 – 8,0)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(78,4 – 123,7)	%
	Spitzenwinkel	25 (17 - 32)	°
	Projektionsfläche	114,9 (101,5 – 125,6)	µm ²
	Umfang	67,1 (63,8 – 69,4)	µm
	Rundheit	32,0 (28,8 – 35,3)	%
Fibulae	Fibulaedichte	13 (10 - 16)	n/10 µm
	Fibulaelänge	0,63 (0,28 – 0,82)	µm
	Fibulaebreite	0,35 (0,18 – 0,52)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	6,0 (4,1 – 8,9)	%
	Fibulaeabstand	0,41 (0,11 – 0,90)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	13,0 (9,5 – 22,0)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	n.b.	
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm SU02

Tafel 9 (11 – 12)

Tabelle 44

Die Schalen des Stammes SU02 sind 39,8 (37,6 – 40,9) μm lang und 2,8 (2,5 – 3,1) μm breit. Das Verhältnis von Länge zur Breite liegt somit bei 14,4, womit die Zellen dieses Stammes im Vergleich zu Zellen anderer Stämme zu auffallend langgestreckten Formen gehören. Der Umriss der Frusteln ist linear mit keilförmig, im Winkel von 12 (8 – 16) ° sich verschmälernden, am äußersten Ende gerundeten Zellpolen. Eine kopfige Erweiterung der Enden ist nicht vorhanden. Die Raphe verläuft stark exzentrisch. Die Fibulae weisen eine Dichte von 16 (13-19)/10 μm auf. Wie schon beim Stamm SU01 liegen von den Frusteln des Stammes SU02 keine Bilder vom REM vor. Daher konnten einige Merkmale, wie die Dichte der Streifen oder das Vorhandensein eines Zentralknotens nicht ermittelt werden.

Der Stamm wurde vorläufig als *Nitzschia gracilis* bestimmt. Etwas untypisch sind jedoch die nicht kopfig erweiterten Enden des Klones.

SU02 wurde am 05. Juni 2003 aus Aufwuchs von *Ranunculus circinatus* aus dem gleichen Gewässerabschnitt wie Stamm SU01 isoliert.

Ergebnisse

Tabelle 44: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes *SUo2*

Schalenmerkmale	Zelllänge	39,8 (37,6 – 40,9)	µm
	Zellbreite	2,8 (2,5 – 3,1)	µm
	Länge / Breite	14,4 (12,6 – 16,0)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	96,1 (68,2 – 129,0)	%
	Spitzenwinkel	12 (8 - 16)	°
	Projektionsfläche	90,6 (81,0 – 111,4)	µm ²
	Umfang	80,8 (77,2 – 83,9)	µm
	Rundheit	17,4 (15,4 – 19,9)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	16 (13 - 19)	n/10 µm
	Fibulaelänge	0,49 (0,28 – 0,67)	µm
	Fibulaebreite	0,32 (0,18 – 0,50)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	5,1 (3,6 – 7,0)	%
	Fibulaeabstand	0,37 (0,17 – 0,81)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	11,0 (0 – 19,6)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	n.b.	
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

Stamm SU03

Tafel 9 (6 – 10)

Tabelle 45

Stamm SU03 besitzt lanzettliche Frusteln mit 30,1 (24,5 – 31,3) μm Länge und 3,9 (3,4 – 4,3) μm Breite. Die Zellpole laufen in einem Winkel von 23 (15 – 27) ° keilförmig zu und sind am Ende kopfig gerundet. Die stark exzentrisch verlaufende Raphe wird durch 15 (13- 18) Fibulae/10 μm stabilisiert. Die Fibulae sind leicht unregelmäßig angeordnet und wirken im Lichtmikroskop kurz und breit. Die Streifung des Klonen ist lichtmikroskopisch nicht auflösbar. Zentral finden sich gelegentlich einzelne, deutlicher hervortretende Transapikalrippen. Von diesem Stamm liegen keine REM-Bilder vor, so dass eine Ermittlung der Streifen- und Areolendichte nicht möglich war. Auch können keine gesicherten Aussagen über zentrale Raphenenden und die Ausprägung des Raphenkiels gemacht werden. Die äquidistante Stellung der zentralen Fibulae legt jedoch den Schluss nahe, dass kein Zentralknoten ausgebildet ist.

Die erfassbaren morphologischen Merkmale des Stammes entsprechen den Merkmalen von *Nitzschia palea*.

Stamm SU03 wurde am 05. Juni 2003 aus *Potamogeton perfoliatus*-Aufwuchs aus der gleichen Probe wie Stamm SU01 isoliert.

Ergebnisse

Tabelle 45: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Stammes SU03

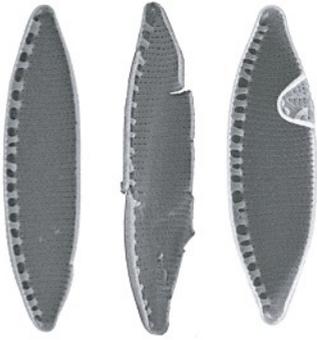
Schalenmerkmale	Zelllänge	30,1 (24,5 – 31,3)	µm
	Zellbreite	3,9 (3,4 – 4,3)	µm
	Länge / Breite	7,7 (6,5 – 9,1)	
	Kopfige Erweiterung des Pols	(96,8 – 143,2)	%
	Spitzenwinkel	23 (15 - 27)	°
	Projektionsfläche	87,2 (66,9 – 94,0)	µm ²
	Umfang	61,6 (50,9 – 63,1)	µm
	Rundheit	28,9 (27,2 – 32,3)	%
Fibuläre	Fibulaedichte	15 (13 - 18)	n/10 µm
	Fibulaelänge	0,70 (0,39 – 1,01)	µm
	Fibulaebreite	0,34 (0,21 – 0,65)	µm
	Standardabweichung Fibulaebreite	5,6 (2,4 – 16,9)	%
	Fibulaeabstand	0,32 (0,23 – 0,44)	µm
	Standardabweichung Fibulaeabstand	9,9 (4,8 – 18,2)	%
Feinstrukturen	Streifendichte	n.b.	
	Areolendichte	n.b.	
	Poroide zw. Helictoglossa und Schalenrand	n.b.	
	Zentrale Raphenenden	nein	
	Verzweigte Areolenreihen	n.b.	

5.3.3 Bildtafeln

Tafel 1

alle Abbildungen REM, x 3000

- | | |
|----------|--|
| 1 – 3 | Stamm KGO2, Innenansichten der Frusteln |
| 4 | Stamm LGO9, Innenansicht einer abgebrochenen Spitze |
| 5, 6 | Stamm LGO9, komplette Schale, Außenansicht mit Einblick in untere Frustel |
| 7, 9, 10 | Stamm OAO2, Innenansicht der Frusteln |
| 8 | Stamm OAO2, Außenansicht der Frustel mit erkennbarem durchlaufenden Raphenkiel |



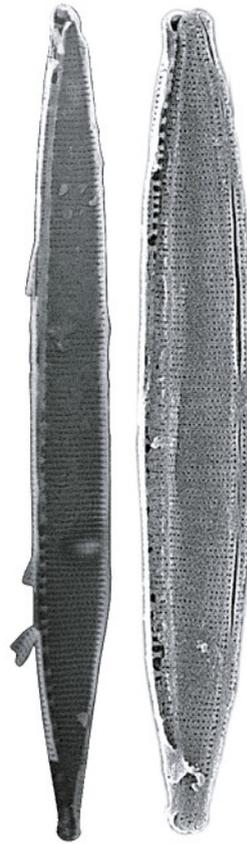
1

2

3



4



5

6



7

8

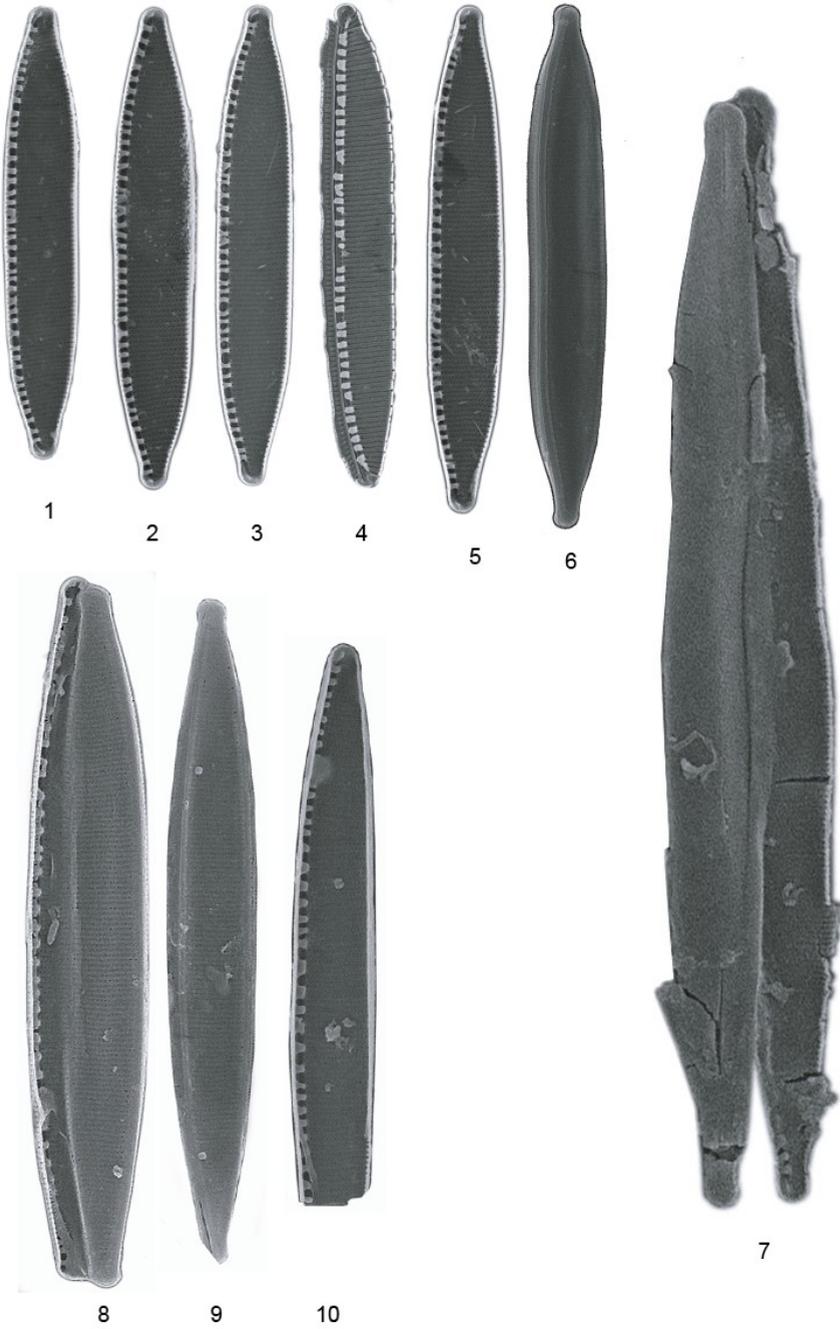
9

10

Tafel 2

Alle Abbildungen REM, x 3000

- | | |
|-------|--|
| 1 – 5 | Stamm OA03, Frusteln in Innenansicht |
| 4 | Stamm OA03, stark korrodierte Frustel in Innenansicht, Raphe gut erkennbar |
| 6 | Stamm OA03, Außenansicht mit erkennbarem Raphenkiel und durchlaufender Raphe |
| 7 | Stamm OA08, zwei Frusteln, davon rechte in Innenansicht, aber verschmutzt |
| 8 | Stamm OA05, zwei aufeinanderliegende Frusteln, untere Theka in Innenansicht, obere in Außenansicht |
| 9 | Stamm OA05, Außenansicht |
| 10 | Stamm OA05, Innenansicht einer Frustel, unterer Zellpol abgebrochen |



Tafel 3

Sofern nicht anders angegeben, Vergrößerung x 3000

- | | |
|-------|--|
| 1 – 3 | Stamm OA11, lichtmikroskopische Aufnahmen, x 1500 |
| 4 | Stamm OHo2, lichtmikroskopische Aufnahme, x 1500 |
| 5 | Stamm OEO3, lichtmikroskopische Aufnahme, x 1500 |
| 6 | Stamm OEO3, REM-Aufnahme, Außenansicht einer gebrochenen Frustel; |
| 7, 8 | Stamm OHo3, REM-Aufnahme, Innenansicht |
| 9 | Stamm OHo3, REM-Aufnahme, zwei zusammenhängende Frusteln, obere Frustel in Außenansicht, untere in Innenansicht, Fibulae zum Teil von Gürtelband überdeckt |
| 10 | Stamm OHo3, REM-Aufnahme, Frustel in Außenansicht |

Ergebnisse



1



2



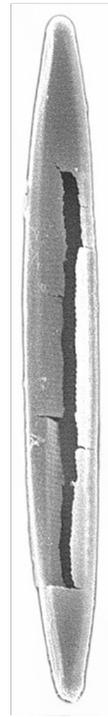
3



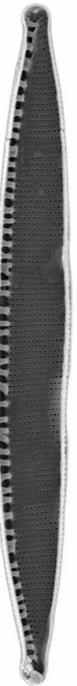
4



5



6



7



8



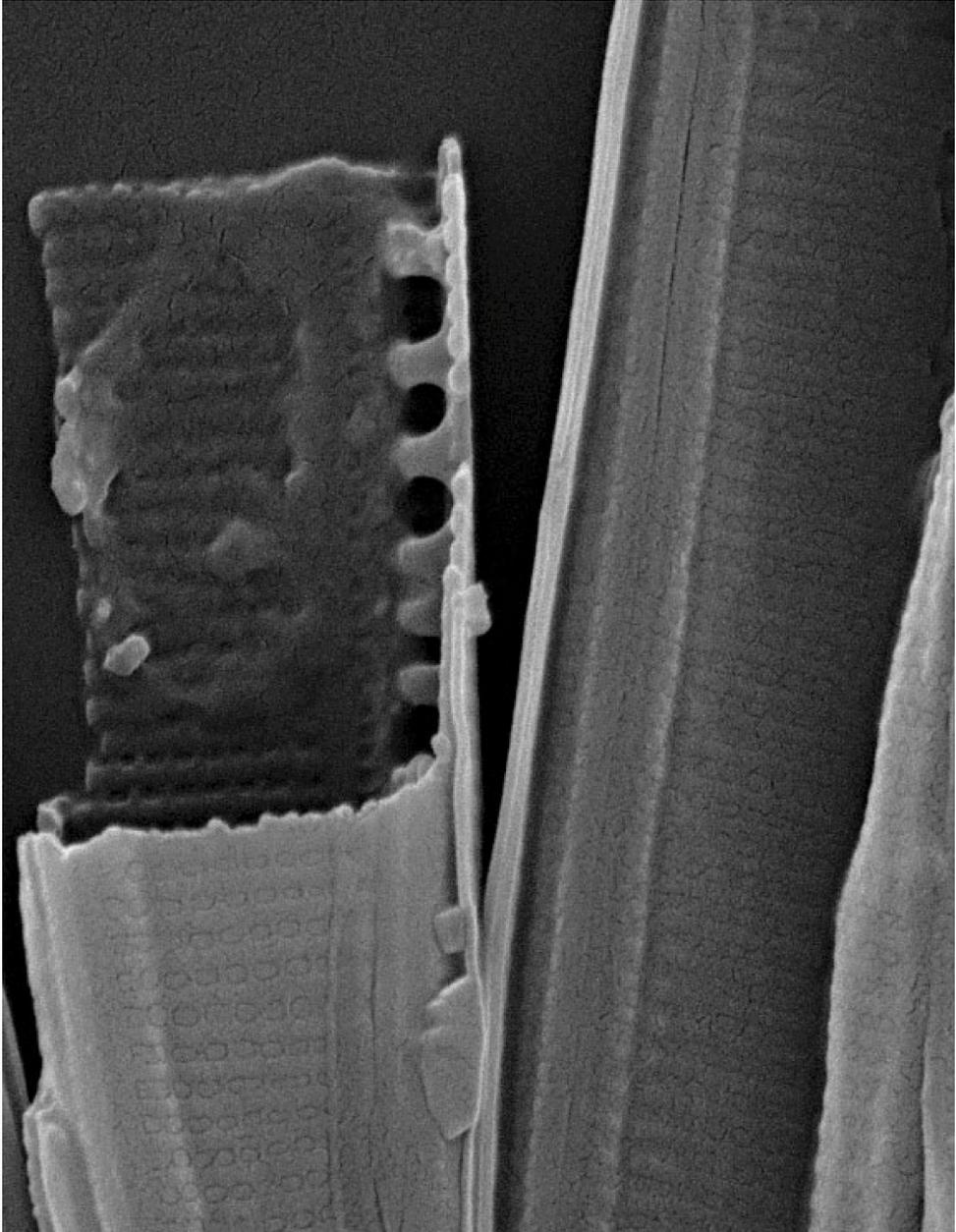
9



10

Tafel 4

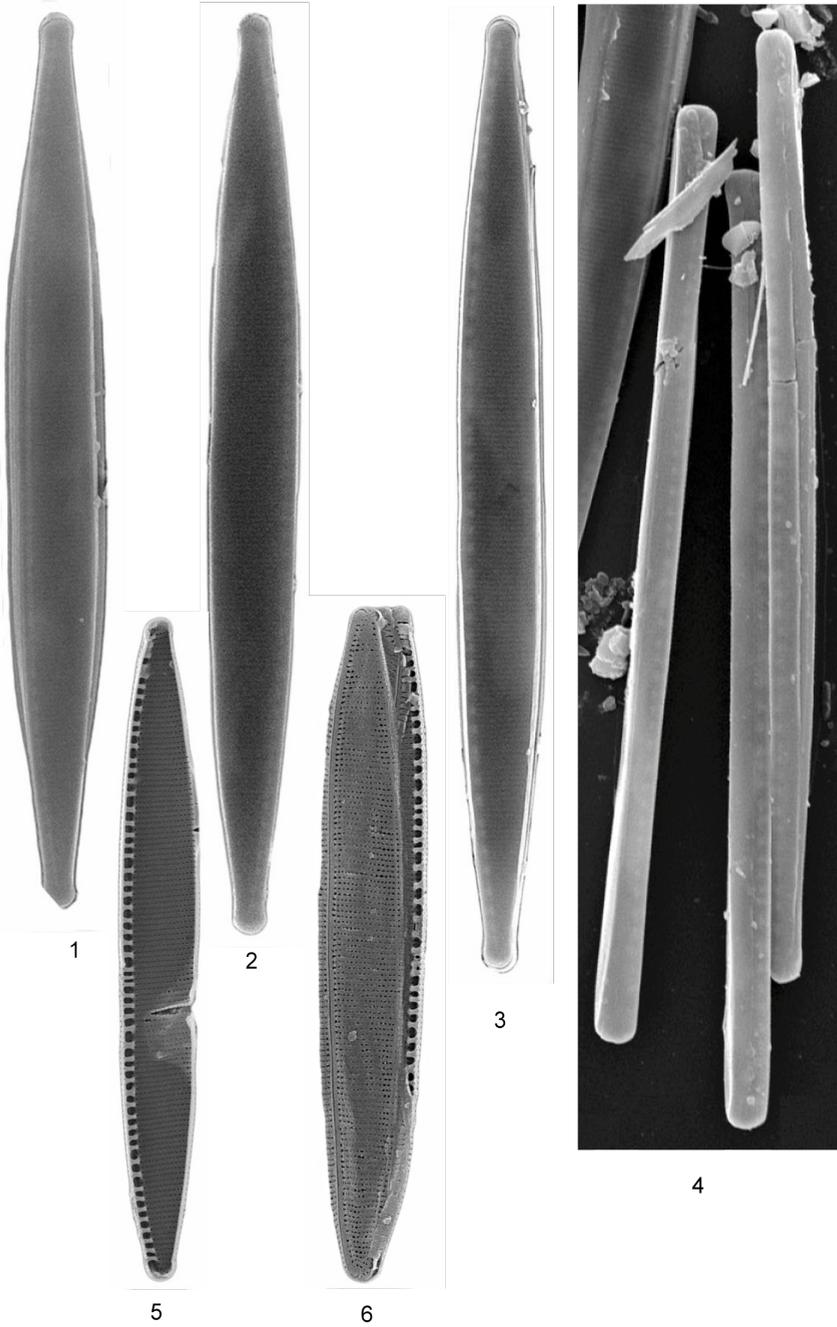
Stamm OH03, REM-Aufnahme, x 20000, Ausschnitt einer Hypotheka mit Raphenkiel, Bruchstücke einer Zelle: Hypotheka mit Raphenkiel und Epitheka mit Fibulae



Tafel 5

alle Bilder REM, x 3000

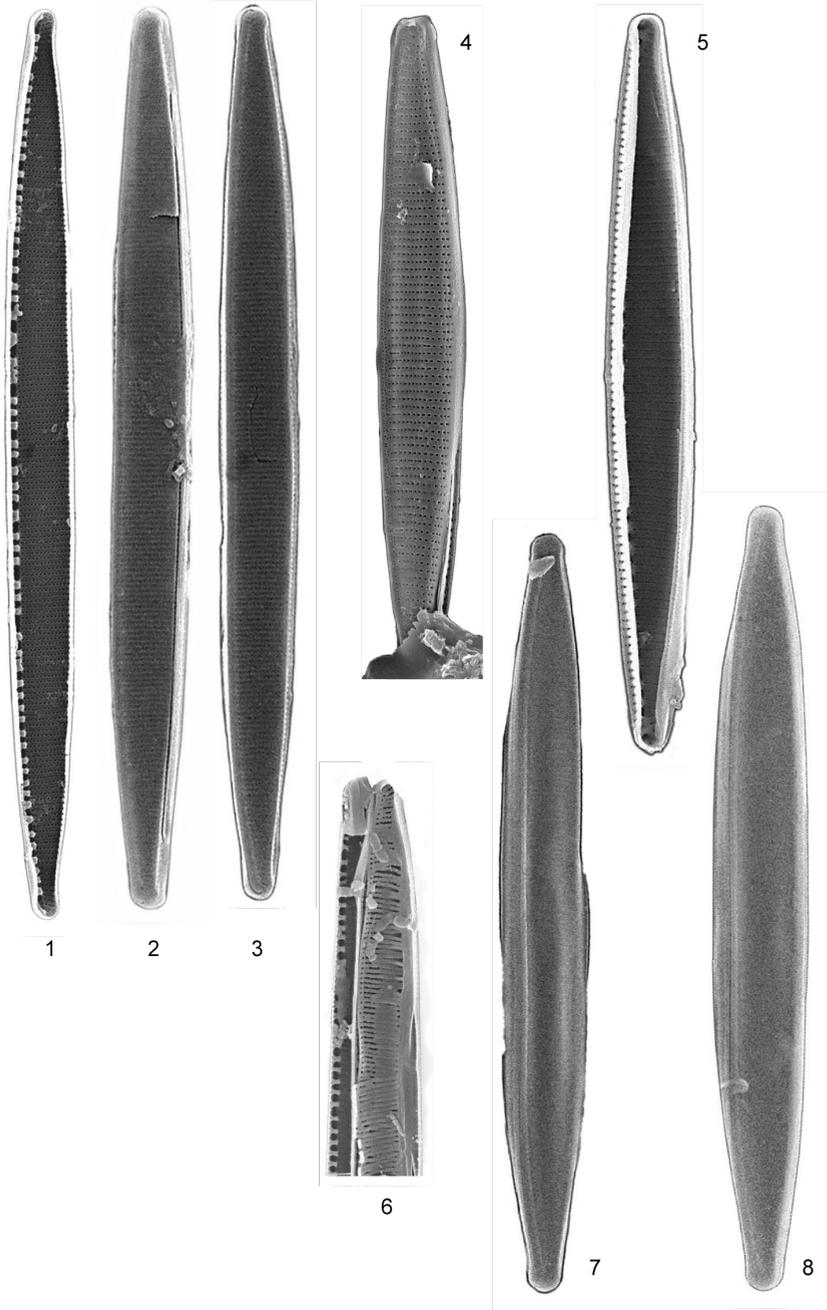
- | | |
|-------|--|
| 1 – 3 | Stamm OH04, Außenansicht in Valvaransicht |
| 4 | Stamm OH04, mehrere Zellen in Gürtelbandansicht |
| 5 | Stamm OH05, REM-Aufnahme, Innenansicht einer Frustel |
| 6 | Stamm OH05, REM-Aufnahme |



Tafel 6

Alle Abbildungen REM, x 3000

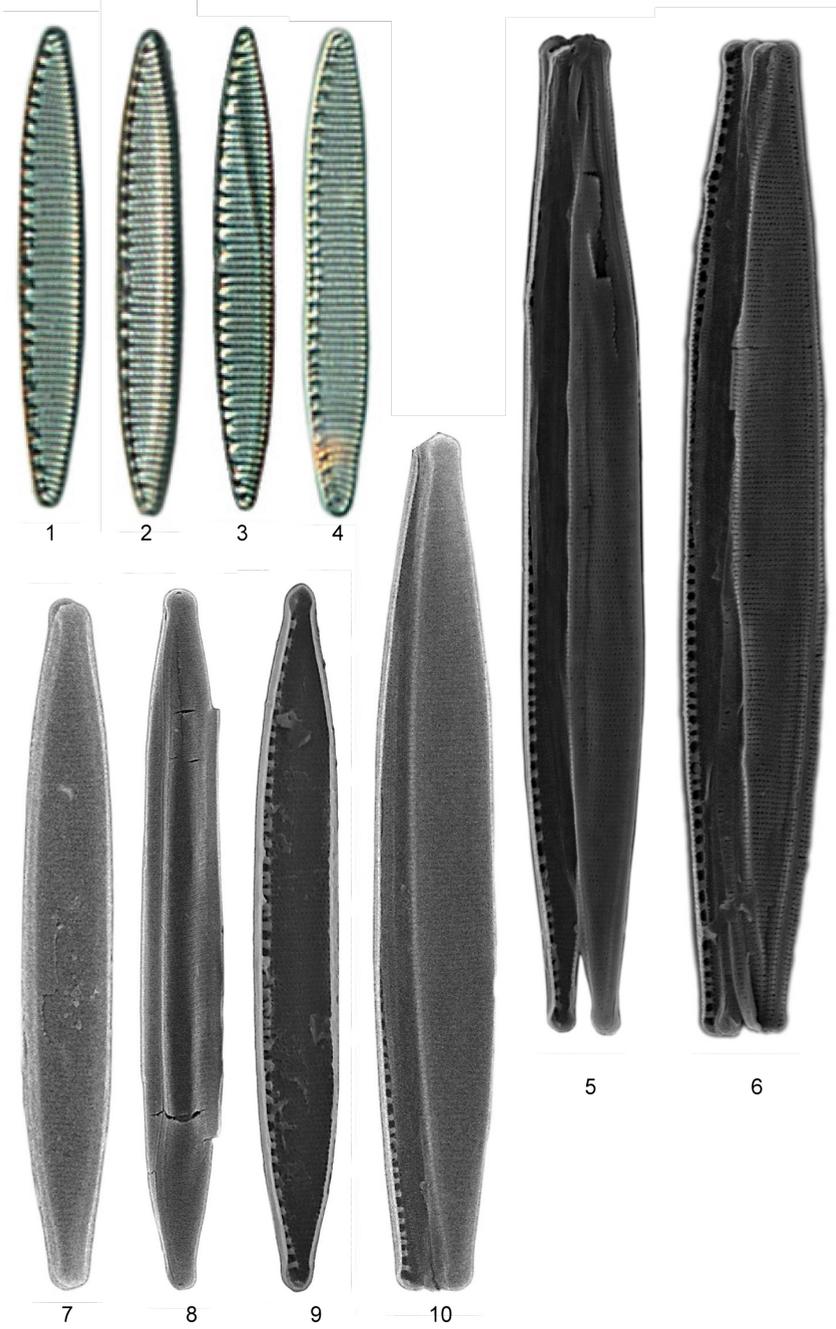
- | | |
|------|---|
| 1 | Stamm OLO1, Innenansicht einer Frustel |
| 2, 3 | Stamm OLO1, Frusteln in Außenansicht |
| 4 | Stamm OQO9, Frustel in Außenansicht, Verzweigungen der Areolenreihen im Bereich des Raphenkanals erkennbar |
| 5 | Stamm OQO9, Frustel in Innenansicht, Raphenkanal mit Fibulae größtenteils verdeckt |
| 6 | Stamm ORO2, abgebrochenen Enden zweier Frusteln, untere Frustel in Innenansicht obere stark korrodiert, in Außenansicht |
| 7, 8 | Stamm ORO2, Frusteln in Außenansicht |



Tafel 7

Alle Abbildungen x 3000

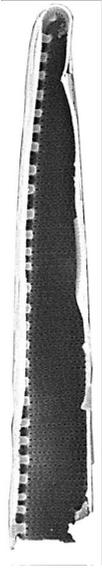
- | | |
|-------|---|
| 1 – 4 | Stamm OS02, lichtmikroskopische Bilder |
| 5, 6 | Stamm OW01, jeweils beide, nicht vollständig getrennte Thecae einer Zelle, Gürtelbänder erkennbar, die Fibulae teilweise verdeckend |
| 7, 8 | Stamm OW05, Frusteln in Außenansicht |
| 9 | Stamm OW05, Innenansicht |
| 10 | Stamm OW05, noch zusammenhängende Frusteln einer relativ großen Zelle |



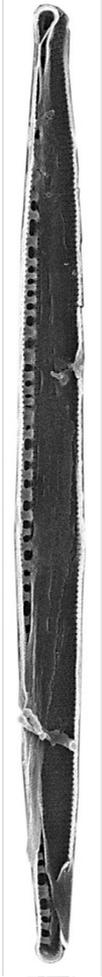
Tafel 8

Soweit nicht anders angegeben: REM-Aufnahmen, x 3000

- | | |
|-----|--|
| 1-3 | Stamm SGO1, Innenansichten, Fibulae zum Teil durch Reste von Zwischenbändern verdeckt |
| 4 | Stamm SGO1, Außenansicht |
| 5 | Stamm SGO1 komplette Zelle in Pleuralansicht |
| 6-8 | Stamm OW09, Innenansichten, Fibulae teilweise durch Reste von Zwischenbändern verdeckt |
| 9 | Stamm OW11, lichtmikroskopische Aufnahme, x 3000 |



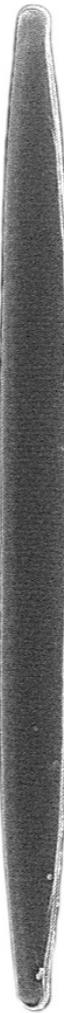
1



2



3



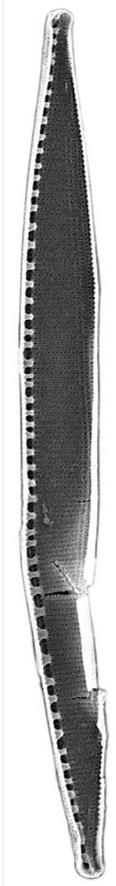
4



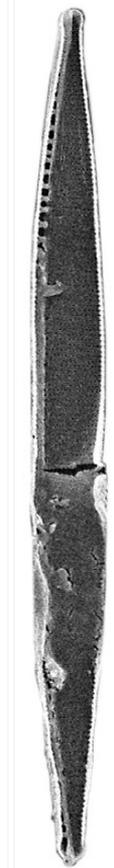
5



6



7



8

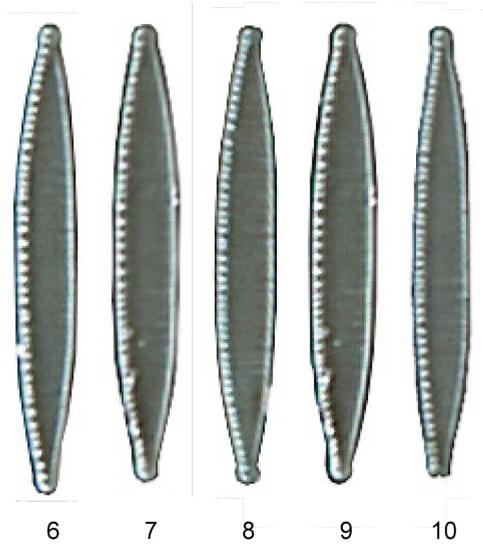
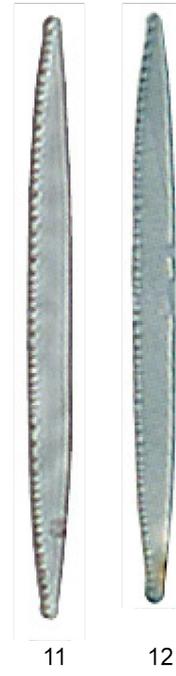
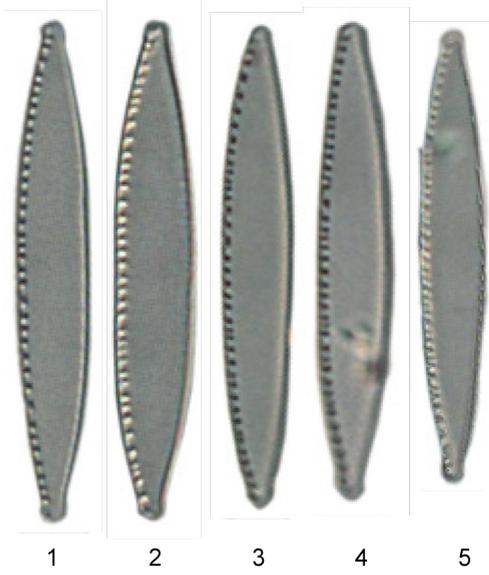


9

Tafel 9

1 – 5	Stamm SU01, lichtmikroskopische Aufnahmen, x 3000
6 – 10	Stamm SU03, lichtmikroskopische Aufnahmen, x 3000
11 – 12	Stamm SU02, lichtmikroskopische Aufnahmen, x 3000

Ergebnisse



5.4 Vergleich der morphologischen Eigenschaften zwischen phylogenetisch begründeten Gruppen.

Im Absatz 5.2 wurden die Ergebnisse der phylogenetischen, auf DNA-Sequenzen basierenden Analyse beschrieben. Hierbei können verschiedene Gruppen von Stämmen gebildet werden. Um festzustellen, inwieweit diese Gruppen auch morphologisch nachvollziehbar sind, werden im folgenden die morphologischen Parameter der phylogenetischen Gruppen miteinander verglichen. In Abbildung 26 sind die Gruppen, wie sie im folgenden verwendet werden, dargestellt.

Gruppe 0

Von den eigenen Stämmen ist in Gruppe 0 ausschließlich OSO₂ enthalten. Dieser Stamm wurde aufgrund seines Erscheinungsbildes als *Nitzschia amphibia* identifiziert. Er stellt somit den einzigen vollständig untersuchten Stamm dieser Arbeit dar, der nicht dem Sippenkomplex um *Nitzschia palea* angehört. Die Messwerte und die Anzahl der Schalenhälften von OSO₂, bei denen die entsprechenden Merkmale Überschneidungen mit den Merkmalen anderer phylogenetischer Gruppen zeigen, finden sich in Tabelle 46.

Die im Gegensatz zu den übrigen phylogenetisch begründeten Gruppen relativ geringe Varianz der morphologischen Kenngrößen ist in der relativ geringen Zahl der Messungen und der Monoklonalität des Stammes begründet. Länge, Breite und das Verhältnis aus Länge zu Breite zeigen, dass es sich im Vergleich um etwas unterdurchschnittlich große Zellen von eher gedrungener Form handelt. Zellumriss und Zelldimensionen überlappen aber mit Messwerten der anderen Gruppen. Keine Überschneidungen zu anderen Gruppen finden sich bei der Dichte der Fibulae, der Streifen und der Areolen. Stamm OSO₂ ist aufgrund der relativ groben Schalenstrukturen gegenüber den übrigen untersuchten Stämmen eindeutig abgrenzbar. Diese drei Merkmale sind also als Differenzialmerkmale gegenüber den übrigen Gruppen geeignet.

Ergebnisse

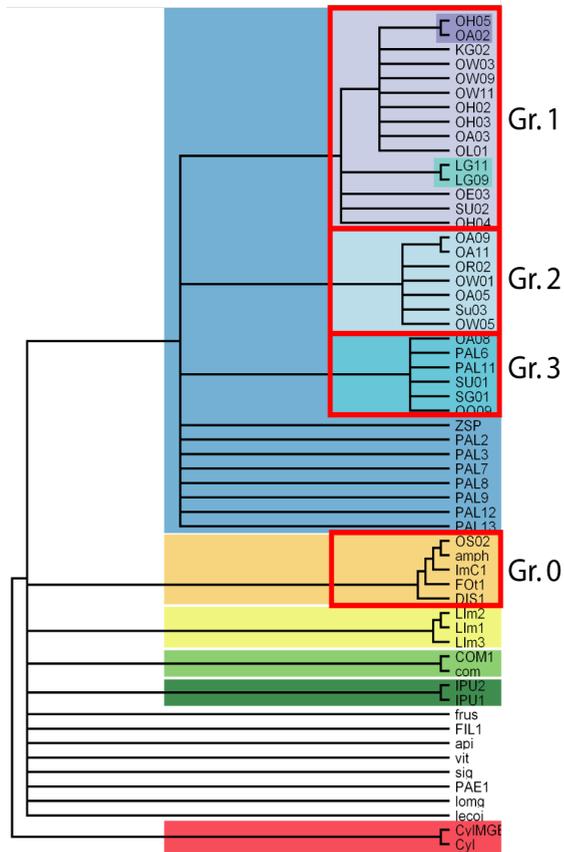


Abbildung 26: Adams-Konsensus aus den most parsimonious Supertrees, rot eingerahmt: Phylogenetisch begründete Gruppen mit eigenen Stämmen

Ergebnisse

Tabelle 46: Minima, Maxima und Überschneidungen der morphologischen Parameter von Gruppe 0 gegenüber den übrigen Gruppen von Stämmen

Parameter	Minimum	Maximum	Zahl der Messungen	Überschneidungen zu		
				Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3
Zelllänge	33,7 µm	35,8 µm	16	16	16	16
Zellbreite	4,1 µm	4,9 µm	17	8	8	17
Länge/Breite	7,3	8,7	16	16	16	16
Verdickung Köpfchen	57,0 %	102,8 %	22	14	5	6
Fibulae /10 µm	7	10	14	0	0	0
Streifen /10 µm	16	20	14	0	0	0
Areolen /1 µm	2	3	5	0	0	0
Projektionsfläche	114,7 µm ²	139,9 µm ²	16	16	16	12
Umfang	69,8 µm	75,9 µm	15	15	15	15
Rundheit	28,8 %	34,6 %	16	11	4	13

Gruppe 1

In Gruppe 1 werden die Stämme KGO2, LGO9, LG11, OAO2, OAO3, OEO3, OHO2, OHO3, OHO4, OHO5, OLO1, OWO3, OWO9, OW11 und SUO2 zusammengefasst.

Diese Gruppe beinhaltet mit nur 13,6 µm Länge die kürzesten Frusteln aller hier untersuchten Gruppen. Obwohl die Zellen dieser Gruppe tendenziell zu den kürzeren gehören und die ermittelte maximale Zelllänge von 46,4 µm deutlich unter den maximalen Zelllängen der Gruppen 2 und 3 liegt, gibt es große Überschneidungen hinsichtlich der Zelllänge (Tabelle 47). Ähnlich verhält es

Ergebnisse

sich mit Projektionsfläche und Umfang: Die Extremwerte von Fläche und Umfang liegen unter denen der Gruppen 2 und 3, die Überschneidungen mit diesen Gruppen ist aber sehr groß. Somit sind neben den o.g. Unterscheidungsmöglichkeiten gegenüber Stamm OS02 bzw. Gruppe 0 keine Merkmale erfasst worden, die eine Unterscheidung der Gruppe 1 gegenüber den anderen untersuchten Gruppen erlauben.

Tabelle 47: Minima, Maxima und Überschneidungen der morphologischen Parameter von Gruppe 1 gegenüber den übrigen Gruppen von Stämmen

Parameter	Minimum	Maximum	Zahl der Messungen	Überschneidungen zu		
				Gr. 0	Gr. 2	Gr. 3
Zelllänge	13,6 µm	46,4 µm	131	80	113	89
Zellbreite	2,5 µm	4,9 µm	128	8	122	109
Länge/Breite	10,1	16,0	122	24	96	114
Verdickung Köpfchen	68,1 %	141,9%	152	75	130	150
Fibulae /10 µm	12	19	92	0	67	43
Streifen /10 µm	36	45	90	0	90	90
Areolen /1 µm	4	6	47	0	47	47
Projektionsfläche	77,5 µm ²	149,0 µm ²	94	19	80	26
Umfang	64,4 µm	95,0 µm	94	6	58	55
Rundheit	15,4 %	23,5 %	89	4	76	79

Gruppe 2

Die in Abbildung 26 als Gr. 2 gekennzeichnete Gruppe beinhaltet die eigenen Stämme OA05, OA09, OA11, OR02, OW01, OW05 und SU03.

Ergebnisse

Ein Vergleich der Extrema der morphologischen Parameter (Tabelle 48) zeigt, dass in Gruppe 2 tendenziell eher langgestreckte, große Frusteln mit eher dichter Streifung enthalten sind. Wie auch schon bei Gruppe 1 festzustellen war, finden sich aber gegenüber den Ergebnissen der übrigen Gruppen nur gegenüber Gruppe 0 Merkmale ohne Überschneidungen. Wie bei Gruppe 0 bereits dargelegt wurde, handelt es sich um die Dichten von Fibulae, Streifen und Areolen, die eine Differenzierung ermöglichen.

Tabelle 48: Minima, Maxima und Überschneidungen der morphologischen Parameter von Gruppe 2 gegenüber den übrigen Gruppen von Stämmen

Parameter	Minimum	Maximum	Zahl der Messungen	Überschneidungen zu		
				Gr. 0	Gr. 1	Gr. 3
Zelllänge	24,5 µm	52,0 µm	101	48	81	75
Zellbreite	2,6 µm	4,9 µm	83	22	81	82
Länge/Breite	6,5	16,4	83	19	22	81
Verdickung Köpfchen	87,4 %	144,65 %	120	47	119	116
Fibulae /10 µm	12	17	50	0	44	39
Streifen /10 µm	39	43	45	0	35	42
Areolen /1 µm	4	6	16	0	16	16
Projektionsfläche	66,6 µm ²	180,5 µm ²	60	16	57	26
Umfang	50,9 µm	107,5 µm	58	9	57	36
Rundheit	17,0 %	32,3 %	61	1	61	61

Gruppe 3

Als Gruppe 3 werden die Stämme OAO8, OQ09, SGO1 und SU01 zusammengruppiert.

Die Spannweiten der morphologischen Parameter sind in Tabelle 49 zusammengestellt. Bei den Extremwerten kann man feststellen, dass die Zellen dieser Gruppe etwas länger und etwas gröber gestreift erscheinen. Wie man aus den Beschreibungen zu den oben behandelten Gruppen schließen kann, gibt es aber auch hier außer der Dichte von Fibulae, Streifen und Areolen gegenüber OSO2 keine überschneidungsfreien und somit als Differenzialmerkmal geeignete Merkmale.

Tabelle 49: Minima, Maxima und Überschneidungen der morphologischen Parameter von Gruppe 3 gegenüber den übrigen Gruppen von Stämmen

Parameter	Minimum	Maximum	Zahl der Messungen	Überschneidungen zu		
				Gr. 0	Gr. 1	Gr. 2
Zelllänge	30,1 µm	53,7 µm	33	21	22	33
Zellbreite	2,9 µm	5,2 µm	38	17	20	17
Länge/Breite	6,0	16,3	33	4	22	19
Verdickung Köpfchen	78,2 %	123,7 %	39	24	39	37
Fibulae /10 µm	10	17	30	0	30	30
Streifen /10 µm	25	44	10	0	7	9
Areolen /1 µm	4	6	10	0	10	10
Projektionsfläche	95,8 µm ²	136,0 µm ²	25	16	25	25
Umfang	63,8 µm	99,5 µm	26	1	17	17
Rundheit	15,9 %	35,3 %	24	11	22	12

6. Diskussion

6.1 Artkonzepte in der Systematik

Ziel dieser Arbeit ist es, durch phylogenetische DNA-Analysen natürliche Gruppen innerhalb des Formenkreises um *Nitzschia palea* aufzuspüren und mittels vergleichender morphologischer Analysen Merkmale zu finden, anhand derer sich die natürlichen Gruppen innerhalb des Sippenkomplexes differenzieren lassen.

Mit der gewählten Methodik soll also ein Beitrag zur (natürlichen) Systematik der Gattung *Nitzschia* geleistet werden.

Die heutige biologische Systematik geht in wesentlichen Grundzügen auf das von Linné etablierte, hierarchische System zurück. Bis zur allgemeinen Durchsetzung der Evolutionstheorie von Charles Darwin erfüllte die Systematik alleine den Zweck, die Lebewesen in ein übersichtliches, geordnetes System einzuordnen. Durch die Evolutionstheorie wandelte sich dieses System zu einer Darstellung der Evolution der Lebewesen. Die Systematik hatte nun den Anspruch, sich möglichst nahe an den natürlichen Abstammungslinien zu orientieren und somit die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse wiederzugeben. In die Benennung von Lebewesen fließen von diesem hierarchischen System nur die Ebene der Gattung (Genus) und die Ebene der Art (Spezies) ein. Zusammen ergeben sie den binomiellen Artnamen, also z.B. „*Nitzschia palea*“. Die Art oder Spezies stellt dabei das Basiselement der Systematik dar. Während die übrigen hierarchischen Ebenen der Systematik abstrakte Einheiten darstellen, ist die Spezies der einzige Teil der Systematik, der in Form von Populationen lebender Organismen tatsächlich in der Biosphäre in Erscheinung tritt.

Aufgrund der Probleme, die sich bei Abgrenzungen von Arten ergeben, ist es wichtig, den Begriff der „Art“ genau zu definieren. Hierzu verfolgen diverse Autoren unterschiedliche Ansätze. MAYDEN (1997) unterschied 22 Konzepte, die sich zum Teil nur in Nuancen unterscheiden. Die im folgenden kurz skizzierten Artkonzepte stellen die wesentlichen, derzeit diskutierten Richtungen dar.

Das biologische Artkonzept nach Mayr

ERNST MAYR (1996) definiert die biologische Art als Gruppe von Populationen, die miteinander im regelmäßigen genetischen Austausch stehen, aber von anderen Gruppen von Populationen reproduktiv isoliert sind. Gelegentlicher genetischer Austausch zwischen Individuen aus Populationen, die sich in der Regel nicht genetisch austauschen, also sporadisch auftretende Hybriden, schließt MAYR hierbei ausdrücklich als Fehler des Individuums aus und berücksichtigt diese nicht bei der Umgrenzung einer Art.

Das Henningsche Spezies-Konzept

In weiten Teilen ähneln sich die Artkonzepte von HENNIG (1950) und MAYR (1996). Bei Hennig ist die Art als potentielle Reproduktionsgemeinschaft definiert (MEIER & WILLMAN 2000). Die Abgrenzung von Arten gegeneinander erfolgt über sexuelle Isolation, wobei zwischen einer räumlichen Isolation und einer echten sexuellen Isolation unterschieden wird. Dabei ist eine räumliche Isolation alleine nicht zur Abgrenzung von Spezies geeignet, da dabei die *potentielle* Reproduktionsgemeinschaft erhalten bleibt, sich also potentiell Individuen unterschiedlicher räumlich getrennter Populationen nach Aufhebung der Trennung wieder miteinander sexuell fortpflanzen können. Darüber hinaus gibt HENNIG im Gegensatz zu MAYR der Art auch eine zeitliche Dimension. Eine Art hat zeitlich einen Beginn, definiert als die Aufspaltung einer Mutterart in zwei Tochterarten und ein zeitliches Ende, also das Aussterben oder die Aufspaltung in Tochterarten.

Sowohl das Konzept von MAYR als auch das Henningsche Artkonzept definieren die Art zunächst unabhängig von Merkmalen ausschließlich über sexuelle Kompatibilität bzw. Isolation.

Das phylogenetische Artkonzept (sensu MISHLER & THERIOT)

Einen anderen Ansatz verfolgen die Autoren MISHLER & THERIOT (2000). Ausgehend von phylogenetischen Analysen wird die Art von ihnen als das am wenigsten umfassende Taxon in einer Klassifikation definiert, in der die Organismen aufgrund von Anzeichen für Monophylie gruppiert werden. Entgegen den bei-

den vorher erwähnten Konzepten liegen hier tatsächliche Merkmale als Ausgangspunkt phylogenetischer Untersuchungen der Klassifikation in Spezies zugrunde.

Das phylogenetische Artkonzept (sensu WHEELER & PLATNICK)

Unter gleichem Namen wie MISHLER & THERIOT (2000) entwickelten WHEELER & PLATNICK (2000) ein anderes Artkonzept. Hier wird die biologische Art definiert als „die kleinste Aggregation von Populationen (sexuell) oder Abstammungslinien (asexuell), die durch eine einzigartige Kombination von Merkmalszuständen in vergleichbaren Individuen erkannt werden können“. Eine phylogenetische Untersuchung per se nicht voraussetzend, unterscheidet sich das Konzept von WHEELER auf den ersten Blick deutlich vom Ansatz von MISHLER & THERIOT. Da eine gut abgesicherte Monophylie nach einer phylogenetischen Analyse auch stets einer einzigartigen Merkmalskombination entspricht, unterscheiden sich beide Ansätze letztlich nicht so wesentlich wie dies auf den ersten Blick scheinen mag. Entgegen den Konzepten von MAYR und HENNIG setzen aber beide phylogenetischen Artkonzepte keinerlei Kenntnis von sexueller Kompatibilität voraus. Einerseits erweitert dies das Spektrum, auf das die Konzepte anwendbar sind, andererseits bergen beide ausschließlich auf Merkmalskombinationen gestützte Konzepte insbesondere bei polymorphen Populationen mit diskontinuierlicher Morphokline das Risiko, Artefakte bei der Klassifikation zu erzeugen.

Das evolutionäre Artkonzept

Das Artkonzept von WHILEY & MAYDEN (2000) sieht die Art als „eine einzelne Abstammungslinie von voneinander abstammenden Populationen (ancestral descendant populations) aus Organismen, die ihre eigene Identität gegenüber anderen derartigen Abstammungslinien behalten und ihre eigenen evolutiven Tendenzen und ihre eigene historische Geschichte besitzen.“ In diesem sehr umfassenden Konzept vereint der Autor sowohl phylogenetische, merkmalsgebundenen Ansätze als auch zeitliche Aspekte.

Als Kritikpunkte am Konzept von WHILEY & MAYDEN nennen die Verfechter anderer Artkonzepte, dass „eigene evolutive Tendenzen“ und „eigene (historische) Geschichte“ eines Taxons im Regelfall kaum greifbare Größen darstellen, also letztlich willkürlich sind. Auch die genaue Festlegung dessen, was eine eigene Identität ausmacht, stellt sich nach der Definition von WHILEY & MAYDEN als schwierig heraus.

Das „Artkonzept“ von REGAN

Die Aussage von REGAN (1926) ist zwar nicht Teil aktueller Diskussionen und hinsichtlich des Anspruchs, dass biologische Systematik nicht willkürlich, künstlich sein soll, sondern natürliche Relationen zwischen Taxa wiedergeben soll, eigentlich völlig indiskutabel. Dennoch sei seine wohl etwas augenzwinkernde „Definition“: „A species is what a competent taxonomist says it is.“ hier aufgeführt, da es keine Seltenheit ist, dass Beschreibungen von Arten etwas den Eindruck erzeugen, als läge der Beschreibung das „Artkonzept“ von REGAN zugrunde.

6.2 *Verwendbarkeit von Merkmalen für merkmalsbasierte Artkonzepte*

Grundlage der hier vorgestellten Artkonzepte von WHEELER & PLATNICK sowie von WHILEY stellen Merkmale bzw. Merkmalskombinationen dar. Indirekt gilt das auch für das Artkonzept von MISHLER & THERIOT, da phylogenetische Analysen letztlich auch auf Merkmalskombinationen beruhen. Allen systematischen Konzepten, die auf Merkmalen basieren, ist gemein, dass die Qualität der Resultate wesentlich von der Eignung der zur Analyse herangezogenen Charakteristika abhängt. Eine der ältesten bekannten Klassifikation von Lebewesen durch Plato erscheint aus heutiger Sicht fremdartig, da die Kriterien zur Klassifikation, also die dem System zugrunde liegenden Merkmale für eine Beschreibung natürlicher Abstammungsverhältnisse (was Anspruch aktueller Systematik ist bzw. sein sollte) nicht geeignet sind. Als Beispiel hierfür sei die vorgenommene Unterscheidung in landlebende und wasserlebende Tiere genannt.

In der Konsequenz müssen wegen ihrer grundsätzlichen Wichtigkeit vor der Verwendung von Merkmalen zur Klassifikation einige Fragen geklärt sein:

Ist das Auftreten eines Merkmals bei zwei Taxa Folge einer Homologie oder einer Analogie?

Um eine natürliche Systematik zu erstellen, die die realen Verwandtschaftsverhältnisse und die evolutive Geschichte eines Taxons wiedergibt, ist es wichtig zu unterscheiden, ob ein Merkmal bei zu vergleichenden Taxa infolge einer gemeinsamen Abstammung (Homologie) auftritt oder infolge einer unabhängig voneinander erfolgten Anpassung der Taxa an Umweltbedingungen (Konvergenz od. Analogie).

Zur Bewertung, ob eine Homologie vorliegt, definierte REMANE 1952 seine Homologiekriterien. REMANE zufolge sind Merkmale homolog, wenn sie „...trotz unterschiedlicher Ausprägung in Gestalt und Anzahl in einem vergleichbaren Gefügesystem stets die gleiche Lagebeziehung aufweisen...“ oder „...durch Zwischenformen (evolutiv) kontinuierlich verbunden...“ sind. Zwischenformen können laut REMANE neben rezenten Zwischenformen auch Rudimente und Atavismen, embryonale Zwischenformen und fossile Zwischenformen sein. HENNIG (1950) präzisiert bzw. ersetzt den Begriff „Homologie“ durch folgende Begriffe:

- Apomorphie
= Ein Merkmal, das vergleichsweise abgeleitet ist.
- Autoapomorphie
= Ein Merkmal, das in einer Stammart neu erworben ist.
- Synapomorphie
= Ein Merkmal, das in Stammart und deren Tochterarten neu erworben ist.
- Plesiomorphie

= Ein Merkmal, das vergleichsweise früh erworben ist.

- Symplesiomorphie

= Ein Merkmal, das bei Arten auftritt, die nicht Tochterarten sind, aber eine frühere gemeinsame Stammart haben.

Angewendet auf die Merkmale von *Nitzschia*-Frusteln kann man aufgrund ihrer „Lagebeziehung im Gefügesystem“ die meisten Schalenstrukturen wie Areolen, Raphe, Zentralknoten oder Fibulae als homologe Merkmale einstufen, bzw. bezogen auf die Gattung *Nitzschia* als Plesiomorphien. Die Voraussetzungen für eine Anwendung dieser Merkmale für Fragestellungen der Systematik erscheint somit unproblematisch. Eine Anwendung der Homologiekriterien von REMANE auf die Zelldimensionen und Zellform/-umriss ist dagegen kaum möglich. Die Gefahr, hier aufgrund von Anpassungen an Umweltsituationen, also von Konvergenzen „Äpfel mit Birnen“ zu vergleichen und dann, um bei dem Bild zu bleiben, die Äpfel und Birnen mit großem Durchmesser in eine Klasse und Äpfel und Birnen mit kleinem Durchmesser in eine andere Klasse einzuordnen, wäre relativ hoch. In Verbindung mit zusätzlichen Informationen, die die zu vergleichenden Taxa als Tochterarten einer gemeinsamer Stammform ausweisen, können trotz dieser Gefahr Zelldimensionen und Zellform verwendet werden, um zwischen diesen nahe verwandten Taxa zu differenzieren.

Besonders wertvoll sind im Hinblick auf die Verwendbarkeit für die Systematik die Informationen, die wir durch die Analyse und den Vergleich von Gensequenzen erhalten. Ein korrektes Alignment der Sequenzen vorausgesetzt, ist das Vorliegen von Homologien als sicher anzunehmen (LUNTER, ROCCO ET AL 2008).

Bereiche geringer Konservierung stellen meist Bereiche dar, in denen Mutationen selten zur Funktionsunfähigkeit wichtiger Zellbestandteile führen. Ein Evolutionsdruck, der Analogien in diesen variablen oder sehr variablen DNA-Bereichen hervorrufen könnte, ist somit sehr unwahrscheinlich. Des Weiteren ist die Wahrscheinlichkeit extrem gering, dass ein bestimmter DNA-Bereich nach mehreren Mutationen im Laufe der evolutiven Geschichte mehrerer Taxa bei

zwei systematisch entfernt stehenden Taxa so mutiert, dass die mutierten Sequenzen untereinander ähnlicher sind, als die von nahe verwandten Taxa (persönliche Mitteilung G. HASZPRUNAR).

Ist das Vorhandensein bzw. das Fehlen eines Merkmals typisch für das Taxon, oder handelt es sich um eine individuelle Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen?

Merkmale, die für die Phylogenie und die Systematik verwendet werden sollen, sollten innerhalb eines Taxons mit einer gewissen Konstanz zumindest bei einer bestimmten Entwicklungsstufe der Organismen vorkommen. Ihre Ausprägungen sollten nicht fakultativ als Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen wie Lichtstärke, Nährstoffversorgung oder Fraßdruck sein.

Ein Einfluss von Umweltparametern auf die individuell vorhandene Erbinformationen ist nach heutigem Kenntnisstand nicht vorhanden.

Umgekehrt aber können verschiedene genetische Informationen in unterschiedlichen Stämmen dazu führen, dass die Stämme aufgrund sich unterscheidender Habitatqualität lokal selektiert werden. Diese „Mikroevolution“, die aus ökologischer Sicht als Einnischung bezeichnet wird, führt gegebenenfalls dazu, dass bestimmte Genotypen an förderlichen Standorten abundanter sind als Genotypen, die auf dem konkreten Standort bezogen, eine schlechtere genetische Ausstattung haben.

Für die Verwendbarkeit von DNA-Sequenzen für phylogenetische Studien bleibt diese lokale Selektion ohne negativen Einfluss. Vielmehr kann man hier durch Aufspüren mehr oder weniger kryptischer Taxa unterschiedlicher Umweltansprüche wertvolle Zusatzinformationen gewinnen.

Hängen Merkmalsausprägungen bzw. die Ausbildung oder das Fehlen von Merkmalen mit unterschiedlichen Stadien des Entwicklungszyklus eines Taxon zusammen?

Für die Beurteilung, inwieweit Merkmale oder Merkmalsausprägungen für systematische Untersuchungen geeignet sind, ist es wichtig, zu klären, ob und gegebenenfalls wie sich ein Merkmale eines Organismus im Laufe seiner Individualentwicklung verändert. Treten im Entwicklungszyklus eines Taxons unterschiedliche Morphotypen auf, kann das bei mangelnder Kenntnis zu erheblichen Problemen bei der korrekten Einordnung bestimmter Formen in die Systematik führen. Historische Beispiele wie die Auftrennung von Gametopyten und Sporophyten von *Batrachospermum* in die zwei Gattungen *Batrachospermum* und *Chantransia* (ETTL 1980, ESSER 1986) legen hiervon Zeugnis ab. Insbesondere bei Mikroalgen gestaltet sich die Beobachtung unterschiedlicher Stadien im Entwicklungszyklus in situ als extrem schwierig, da de novo eine eindeutige Zuordnung der verschiedenen Entwicklungsstadien zu einem Taxon in der Regel unmöglich ist. Kulturversuche erlauben dagegen eine Abschätzung der morphologischen Plastizität und die Unterscheidung verschiedener Morphotypen während der Individualentwicklung, den Zellteilungszyklen und der sexuellen Fortpflanzung bei Mikroalgen.

Im Hinblick auf die durchgeführten genetischen Analysen sind unterschiedliche Entwicklungsstadien in den Kulturen ohne Relevanz. Da die Kulturen als monoklonal angelegt werden, liegt innerhalb einer Kultur nur ein (diploider) Satz Erbinformation vor. Dieser wird im Laufe der Kultivierung nur vervielfältigt, eine Änderung findet nicht statt. Die Selbstinkompatibilität von vielen monoklonalen Kieselalgenkulturen (MANN & CHEPURNOV 2004.) verhindert zudem, dass durch Crossing-Over-Vorgänge bei der Meiose die beiden Chromosomensätze der diploiden *Nitzschia*-Zellen vermischt würden.

Sollte eine Kultur nicht monoklonal vorliegen, sondern als Gemisch zweier oder mehrerer Stämme ließen sich bei der DNA-Sequenzierung mit der verwendeten Methodik keine eindeutig lesbaren Sequenzen gewinnen, da sich die Sequenzen der Stämme, die in der entsprechenden Kultur vorliegen, überlagern würden. Da in diese Arbeit nur morphologische Daten von Stämmen mit eindeutig lesbaren Sequenzdaten übernommen wurden, kann davon ausgegan-

gen werden, dass keine Mischkulturen in die Auswertung eingeflossen sind und die somit gemachten Aussagen bezüglich unterschiedlicher Entwicklungsstadien für alle in dieser Arbeit dargestellten Stämme Gültigkeit besitzen.

Wie beurteilen unterschiedliche Bearbeiter das gleiche Merkmal?

Für taxonomische und systematische Fragestellungen ist es auch von großem Interesse, wie Merkmale von unterschiedlichen Betrachtern bewertet werden. Insbesondere Charakteristika, bei denen nicht das bloße Vorhandensein oder Fehlen, sondern die Ausprägung bzw. die Ausmaße wichtig für die Klassifizierung sind, bereiten häufig Probleme, wenn sie nicht objektiv genau erfasst werden. Was ein Autor beispielsweise als „relativ lang“ bezeichnet, kann von einem anderen Bearbeiter anders interpretiert werden und so zu Fehlbestimmungen und Unklarheiten führen. Eine Vermessung von Merkmalen kann hier Probleme vermeiden, sofern sichergestellt ist, dass die Messgröße ausreichend genau definiert ist, um von unterschiedlichen Vermessern reproduzierbar, d.h. mit nur kleinen Abweichungen gegenüber anderen Bearbeitern vermessen zu werden.

Bei molekularbiologischen Verfahren wie RFLP und AFLP kann es ebenfalls Probleme durch unterschiedliche Bewertung der Daten geben. Als Ergebnis der erwähnten Analysen erhält man zunächst ein Bandenmuster der beim jeweiligen Verfahren amplifizierten Fragmente (VOS, HOGERS ET AL. 1995). Die Auswertung dieser Bandenmuster bringt jedoch Probleme mit sich: Nicht alle Banden sind gleich stark. Banden unterhalb einer gewissen Intensität werden unter Umständen gar nicht detektiert, meist werden Banden unterhalb einer gewissen Stärke vom Auswerter diskriminiert. Auch unter den nahezu konstanten Bedingungen während der Gelelektrophorese können winzige Störungen im Gel und andere kleine, technisch kaum auszuschließende Störquellen wie Temperatur- oder Spannungsschwankungen unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten der DNA-Fragmente im Gel bewirken. Deshalb führt die Umformung des Bandenmusters in eine weiter auswertbare Datenmatrix oft zu einer mangelhaften Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen. In der vorliegenden Arbeit wurde als molekularbiologisches Werkzeug

ausschließlich die Sequenzierung einzelner DNA-Abschnitten verwendet. Da hier als Ergebnis eine Abfolge von Basen des entsprechenden Abschnittes geliefert wird, ist eine weitere Bewertung eines Merkmals nicht nötig und somit die Möglichkeit, dass zwei unterschiedliche Bearbeiter das gleiche Merkmal unterschiedlich beurteilen, nicht gegeben.

6.3 Anwendbarkeit der untersuchten Merkmale

Homologie

Inwieweit erfüllen die hier untersuchten Merkmale diese Kriterien? Wie bereits im vorhergehenden Absatz diskutiert wurde, treten bei der Analyse von DNA-Sequenzen viele der Probleme prinzipiell nicht auf, die bei der Bewertung von Charakteristika eines Stammes Schwierigkeiten bereiten können. Schwieriger als bei der Verwendung der DNA-Sequenzen stellt sich die Bewertung der morphologischen Parameter hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für systematische Analysen dar. Eines der wichtigsten Kriterien für die Verwendbarkeit eines Merkmals ist Homologie. Bei Strukturen wie Areolen, Raphe oder Fibulae ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von homologen Strukturen auszugehen. Sie entsprechen mehreren Homologiekriterien von REMANE. Für die untersuchten Stämme sind die erwähnten Charakteristika als Plesiomorphien zu bezeichnen. Schwieriger ist die Beurteilung in Fällen, in denen das Fehlen einer Struktur verbreitet ist. Hier können drei Situationen vorliegen: Ein einfacher Verlust einer ehemals plesiomorphen Struktur, der Neuerwerb einer Struktur bei einem Tocharten oder die Reduktion einer Struktur infolge der Ausbildung anderer neu erworbener Merkmale. Da ein einfacher Verlust einer Struktur leichter erfolgt als die Ausprägung einer neuen Struktur, kann im Falle eines einfachen Verlustes nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der Verlust infolge einer Standortanpassung mehrfach unabhängig voneinander erfolgte. Fehlt ein Merkmal bei einigen Taxa dagegen deshalb, weil das Merkmal erst später in der Evolution erworben wurde, ist es eher unwahrscheinlich, dass sich das gleiche Merkmal mehrfach unabhängig voneinander entwickelte. Setzt das Fehlen eines Merkmals die Bildung anderer Strukturen voraus, ist die

Wahrscheinlichkeit ebenfalls geringer, dass der gleiche Entwicklungsschritt mehrfach unabhängig voneinander passierte. Problematisch für die Verwendung eines Charakteristikums in der Systematik ist vor allem der erste Fall, in dem ein plesiomorphes Merkmal nicht in allen Tochtertaxa ausgebildet ist.

Im Falle von zentralen Raphenenden und Zentralknoten ist davon auszugehen, dass die Entwicklung der Raphe von zwei verlängerten Poren ausgehend zunächst in zwei Raphenäste erfolgte (MANN, CHEPURNOV & IDEI 2003). Durch stabilisierende Silikatspangen unter dem Raphenspalt (=Fibulae) wurden Zellen mit stabiler Schale auch mit reduzierten und, weiter abgeleitet, ohne stabilisierenden Zentralknoten möglich. Man kann also von einem apomorphen Merkmal sprechen. Eine Verwendung zur systematischen Einordnung ist somit möglich, wenn auch der Wert im konkret vorliegendem Fall nur sehr eingeschränkt ist, da sich bei keinem untersuchten Stamm außer Stamm OS02, der als einziger nicht dem *Nitzschia palea*-Komplex zuzuordnen ist, Anzeichen für zentrale Raphenenden respektive Zentralknoten finden.

Conopea sind bei keinem der untersuchten Stämme festgestellt worden. Die Frage, inwieweit es sich bei einem Conopeum um eine Apomorphie oder eine Sympleiomorphie handelt, kann hier nicht schlüssig beantwortet werden. Ohnehin wäre der Nutzen bezogen auf die untersuchten Stämme (unabhängig von größeren Kontexten) wegen der Konstanz des Merkmals sehr gering. Gleiches gilt für das Fehlen sigmoider Krümmungen oder das Fehlen von Stacheln.

Die stark exzentrische Anordnung der Raphen bei den untersuchten Frusteln dagegen stellt bezogen auf alle raphiden Diatomeen ein apomorphes Merkmal vieler Nitzschien dar. Eine Verwendbarkeit für phylogenetische Anwendungen wäre somit prinzipiell gegeben. Für die in dieser Arbeit einbezogenen Algen ist das Merkmal jedoch konstant. Eine Differenzierung der Stämme aufgrund der Anordnung der Raphe ist in diesem Rahmen nicht möglich.

Die hohe Zahl konstanter morphologischer Merkmale bei den untersuchten Stämmen legt den Schluss nahe, dass diese sich phylogenetisch relativ nahe stehen. Unter dieser Annahme wäre die Voraussetzung gegeben, Größenausprägungen von unterschiedlichen Strukturen und Zellformen als Merkmale in eine phylogenetische Analyse ausreichend kleinen Maßstabes mit einzubeziehen.

Merkmalskonstanz

Für die häufigsten in der Literatur verwandten Merkmale (z.B. HUSTEDT 1928, KRAMMER & LANGE-BERTALOT 1988) wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt, inwieweit die Merkmale individuell anders ausgeprägt werden.

Die Freilanduntersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Studie in Zusammenarbeit mit CZANDERLE (2003) durchgeführt wurden, zeigen einen schwachen Zusammenhang zwischen der Breite von Kieselalgenzellen und der Nährstoffversorgung im Gewässer. Zellen des eutrophen Waschsees waren insgesamt kleiner als die aufgrund ihrer Morphologie als konspezifisch eingestuft Zellen des gering nährstoffbelasteten Herrensees. Speziell bei Zellen, die dem *N. palea*-Formenkreis zugerechnet werden können, tritt in situ mit höherer Nährstoffbelastung eine geringfügig größere Breite und eine etwas höhere Dichte der Fibulae auf. Die Laborversuche zu Einflüssen der Nährstoffversorgung auf die Zelldimensionen eines Stammes, der als *Nitzschia palea* var. *debilis* klassifiziert wurde, hingegen zeigen, dass sich nur in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 89 µg/l PO₄-P die Länge der Frusteln mit zunehmender Phosphatkonzentration geringfügig verringert. Bei höheren Konzentrationen vergrößert sich die Zelllänge leicht bei zunehmender Phosphorversorgung. Im gleichen Versuch wurde auch eine schwache positive Korrelation der Breite mit der Phosphatkonzentration im Medium festgestellt. Die widersprüchlichen Ergebnisse der beiden Untersuchungen sind vermutlich darin begründet, dass die Proben aus dem Freiland einer Reihe synökologischer Einflüsse wie Beschaffenheit des Sediments, Grazing, Konkurrenz, Störungen etc. unterlagen, während für die Untersuchung im Labor Stämme ohne den Einfluss anderer Organismen untersucht wurden bzw. werden sollten⁴.

Die in dieser Arbeit untersuchten Algenstämme wurden unter weitgehend gleichen Bedingungen kultiviert. Licht und Temperatur waren in der Klimakammer für alle Algenkulturen annähernd gleich. Die oben erwähnten Einflüsse im Freiland waren in den Kulturen grundsätzlich ausgeschlossen. Die Verwendung von Kulturmedien mit Standortwasser kann gewisse Unterschiede für die Algen

4 Bei genetischen Untersuchungen des verwendeten Stammes stellte sich im Nachhinein heraus, dass neben den kaum vermeidbaren geringen Kontaminationen durch Bakterien auch ein Pilz in den Kulturen enthalten war.

bedeuten. Da zumindest die Konzentrationen der Makronährstoffe im Standortwasser im Verhältniss zu den zugesetzten Mengen im fertigen Medium sehr gering sind, ist zu vermuten, dass der ohnehin geringe Einfluss der Nährstoffversorgung auf die Morphologie weitgehend minimiert wird.

Es ist also wahrscheinlich, dass die hier untersuchten morphologischen Merkmale bzw. Merkmalsunterschiede tatsächlich von genetischen Anlagen und nicht von Standortunterschieden hervorgerufen wurden.

Durch die oben beschriebenen Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass die *Nitzschia*-Kulturen zumindest während einer achtwöchigen Kulturzeit keine statistisch nachweisbare Schrumpfung erfahren. Die schon im Jahr 1942 isolierte Kultur aus Göttingen (Stamm KG02 bzw. 1052-3a) zeigte dagegen Anzeichen für eine Schrumpfung: Die Zellen dieses Stammes waren die kleinsten der untersuchten Stämme. Der Stamm ist nach über 60 Jahren bzw. nach mehr als ca. 7000 Zellgenerationen, die sich bei einer Zellteilung in drei Tagen ergeben, noch vital. Es ist daher davon auszugehen, dass dieser Stamm Mechanismen besitzt, der die teilungsbedingte Schrumpfung der Zellen teilweise kompensiert, so dass eine zur Funktion ausreichende Mindestgröße der Zellen erhalten bleibt. Ausgehend von diesen Befunden kann man schließen, dass die Schrumpfung der Zellen bei *Nitzschia* üblicherweise so gering ist, dass sie bei regelmäßiger sexueller Fortpflanzung, wie sie in situ vermutlich stattfindet, keinen deutlichen Einfluss auf die Morphologie ausübt.

Wird außerdem die Autoinkompatibilität der Zellen in den monoklonalen Kulturen vorausgesetzt, kann abgesehen von individuellen Missbildungen für die untersuchten Stämme von Merkmalskonstanz ausgegangen werden.

Reproduzierbarkeit und Objektivität

Um eine Abschätzung der Reproduzierbarkeit geben zu können, wurden die morphometrisch erfassten Merkmale in dieser Arbeit von verschiedenen, im Umgang mit Diatomeen unterschiedlich erfahrenen Bearbeitern gemäß den in Punkt 4.4.4 gegebenen Definitionen an den gleichen Schalen vermessen und die Messungen verglichen.

Die Vermessung der am häufigsten zur Bestimmung verwendeten Merkmale Länge, Breite, das Verhältnis von Länge zur Breite, die Dichte von Streifen und Fibulae erwiesen sich in den unter Punkt 4.4.6 beschriebenen Versuchen als sehr gut reproduzierbar. Als weitere Größen sind Schalenumfang, Projektionsfläche und Rundheit ebenfalls sehr gut und reproduzierbar erfassbar. In diesen Fällen waren die Unterschiede zwischen den Ergebnissen verschiedener Bearbeiter niedriger, als die der „etablierten“ Messgrößen Länge und Breite. Die Vermessung von einzelnen Fibulae dagegen erwies sich als wenig vergleichbar. Der Unterschied, der hier von der unterschiedlichen Auswahl der Fibulae verursacht wird, die an ein und derselben Schale von den verschiedenen Bearbeitern vermessen werden, ist zweifellos der Hauptgrund, dass die Messungen dieses Parameters besonders stark divergieren. So wenig Wert daher Einzelmessungen an Fibulae haben, so interessant können Vermessungen der Fibulae sein, um deren Regelmäßigkeit als ein wichtiges Merkmal in der Bestimmungsliteratur genauer zu bestimmen, als das mit den bisher üblichen groben und subjektiven Abschätzungen üblich war.

Ein weiteres wichtiges Merkmal in der Bestimmungsliteratur ist die mehr oder minder starke Ausprägung der Zellenden als Köpfchen. Dieses Charakteristikum konnte mit dem verwendeten Ansatz nicht reproduzierbar genug bestimmt werden. Die Messung einer „Köpfchenbreite“ und einer „Isthmusbreite“ an den unter Punkt 4.4.4.1 beschriebenen Stellen und die Verwendung des Quotienten der beiden Größen als quantifizierte Aussage über Ausprägung der Köpfchen an den Zellpolen erwies sich als untauglich. An ein und der selben Schale schwankte der aus Köpfchenbreite und Isthmusbreite errechnete Quotient je nach Bearbeiter zwischen 85 % und 124 %. Das Hauptproblem bei dieser Messung ist die mangelnde Eindeutigkeit der Messpunkte wenn Köpfchen und Isthmus nicht extrem deutlich ausgeprägt sind. Mögliche Ansätze, um die Form der Schalenpole genauer zu beschreiben, könnten Messungen der Zellbreite in definierten Abständen zum Schalenende, also beispielsweise eine Breitenmessung in 1 μm und 3 μm Abstand zur Schalenende oder eine Bestimmung des Krümmungsradius des Zellendes sein. Letztere könnte mit einer Messung der Breite im Abstand des zweifachen Radius vom Zellende kombiniert werden.

Neben den quantifizierbaren Merkmalen gibt es noch eine Reihe nur qualitativ erfassbarer, für die Bestimmung relevanter Merkmale. Die Frage nach genauen, vom Bestimmer möglichst unabhängigen Erfassung stellt sich bei der Wahl zwischen „Merkmal vorhanden“ oder „Merkmal nicht vorhanden“ prinzipiell zunächst nicht. Probleme bei der Beurteilung dieser Charakteristiken können allerdings entstehen, wenn bestimmte Eigenschaften nur mit speziellen Hilfsmitteln, wie dem Rasterelektronenmikroskop (REM) sicher angesprochen werden können. Als ein sehr wichtiges Merkmal sei hier der Zentralknoten bzw. dessen Fehlen angeführt. WENDKER & GEISSLER (1986) zeigen in vergleichenden Untersuchungen am REM, dass Zellen von *Nitzschia gandersheimensis* lichtmikroskopisch zwar nicht von *Nitzschia palea* unterscheidbar sind, bei *N. gandersheimensis* aber konstant ein Zentralknoten im REM festgestellt werden kann, während dieser bei *N. palea* stets fehlt.

DNA-Sequenzen

Basis der hier durchgeführten phylogenetischen Analyse bilden drei Abschnitte der so genannten ribosomalen DNA bzw. rDNA. Diese gliedert sich bei den meisten Eukaryonten in verschiedene Abschnitte (GRAW 2006):

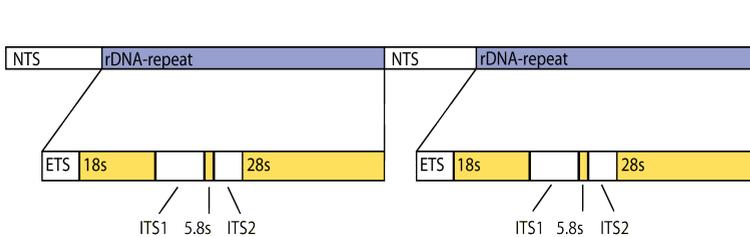


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Bereiche der rDNA

Die nontranscribed spacer (NTS) sowie die transkribierten rDNA-repeats.

Diese wiederum werden in die folgenden Bereiche eingeteilt:

Den external transcribed spacer (ETS), den Bereich, der die Informationen für die 18s-Untereinheit der Ribosomen enthält (SSU bzw. 18s), den internal transcribed spacer 1 (ITS1), den Bereich, der die 5.8s-Untereinheit kodiert (5.8s), den internal transcribed spacer 2 (ITS2) und dem Bereich mit den Erbinformation für die 28s-Untereinheit (LSU bzw. 28s). Die kodierenden Bereiche (in Abbildung 27 orange dargestellt) der ribosomalen DNA stellen für die Zelle essentielle Informationen dar, da ohne Ribosomen eine Zelle nicht lebensfähig ist. Folglich

können Mutationen in diesen Bereichen rasch dazu führen, dass die mutierte Zelle nicht mehr in der Lage ist, funktionierende Ribosomen herzustellen und die Mutation somit letal ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass also eine Mutation in den der 28s-, 18s- oder 5.8s-Bereichen der r-DNA die Lebensfähigkeit einer Zelle nicht beeinträchtigt, ist somit gering. Die entsprechenden DNA-Abschnitte sind somit sehr konservativ.

Im Gegensatz hierzu enthalten die transkribierten Spacer nach heutigem Wissenstand keine genetischen Informationen, sondern dienen durch Einnahme einer bestimmten räumlichen Struktur der transkribierten RNA lediglich als Faltungshilfe (GOERTZEN & CANNONE 2003). Folglich können Mutationen, solange eine ungefähre Bildung der sekundären Strukturen der RNA noch erfolgen kann, relativ frei stattfinden, ohne dass die Funktion der Zelle beeinträchtigt wird. Die Spacer der rDNA sind somit sehr schwach konserviert.

Die starke Konservierung der kodierenden Abschnitte und die nahezu freie Mutationsfähigkeit der Spacer hat zunächst einen sehr praktischen Aspekt. Die internen Spacer ITS1 und ITS2 sind von sehr konservativen DNA-Abschnitten eingerahmt. Daher ist es relativ einfach, für die zu betrachtende Organismengruppe universell verwendbare Primer, die eine wichtige Voraussetzung für die PCR darstellen, zu finden. Aus evolutiver Sicht ergibt sich aus der unterschiedlichen Konservativität der verschiedenen rDNA-Abschnitte, dass sich die weniger konservativen Bereiche eignen, evolutionäre Prozesse in einem kleinen Maßstab zu untersuchen, während die konservativen Bereiche eine Untersuchung in größeren Maßstäben ermöglichen. Diese Tatsache eröffnet auch die Möglichkeit eines umfangreichen Vergleichs mit mutmaßlich verwandtschaftlich weiter entfernten Taxa. Für den hier untersuchten, die SSU der Ribosomen kodierenden DNA-Abschnitt wurde diese Möglichkeit mit den zum Zeitpunkt der Analyse in GenBlast verfügbaren SSU-Sequenzen von *Nitzschia* ausgiebig genutzt.

Als Ergebnis dieser Analyse größerer Auflösung finden sich alle Stämme, die dem *Nitzschia palea*-Sippenkomplex zugeordnet wurden, in einem Monophylum. Die weitere Auftrennung dieses Monophylums ist statistisch nur schlecht gesichert.

Im Gegensatz zur den Sequenzen der SSU-Abschnitte sind die Sequenzen der ITS₁ und ITS₂ Bereiche bei mutmaßlich verwandtschaftlich weiter entfernten Taxa derart unterschiedlich, dass ein Alignment der diversen Sequenzen mit herkömmlichen Methoden⁵ meist unmöglich ist. Daher ist eine Verwendung von Sequenzen aus Datenbanken ungleich schwieriger. Andererseits liefern die ITS-Sequenzen wertvolle Daten über die Verwandtschaftsverhältnisse sich nahestehender Taxa.

Die Ergebnisse aller ITS-Sequenzen zeigen dem zu Folge auch Aufgliederung der Stämme des *Nitzschia-palea*-Komplexes in drei Gruppen, wobei diese je nach Analyse unterschiedlich weiter aufgeteilt werden. Hier offenbaren sich auch die Unterschiede zwischen den Dendrogrammen, die mit verschiedenen Algorithmen errechnet wurden. Die Stammbäume, die auf Parsimony-Kriterien beruhen, stellen die gefundene Diversität der Merkmale so dar, wie dies mit der geringst möglichen Zahl von Mutationen erklärbar ist⁶. Die so errechneten Phylogramme stellen somit die Lösung mit den „sparsamsten“ (= most parsimonious) Ästen bzw. Knoten dar.

Die Algorithmen, die nach Distance-Kriterien arbeiten, errechnen dagegen eine statistische Ähnlichkeit zwischen den Taxa und stellen darauf basierend in den Dendrogrammen jeweils die nächst verwandten Taxa zueinander. Somit erklären sich gewisse Unterschiede in den auf gleichen Daten basierenden Dendrogrammen.

In der aktuellen taxonomischen Diskussion stoßen Algorithmen, die nur auf numerischer Distanz zwischen Taxa bzw. deren Merkmalsausprägungen basieren, auf wenig Akzeptanz. Grund für diese Ablehnung ist das Fehlen eines evolutionstheoretischen Hintergrundes (vgl. PLATNICK 1977, SOBER 1988). Es kann argumentiert werden, dass daher diese Verfahren nicht geeignet seien, die

5 Nach GOERTZEN & CANNONE (2003) ist ein Alingment entfernter Taxa über die Funktion der Sequenzabschnitte bei der Faltung der ITS-RNA möglich. Wegen der Unsicherheit, inwieweit hier tatsächlich homologe Basen im Alingment und später in der phylogenetischen Analyse miteinander verglichen werden, wurde hier auf eine Anwendung dieser Methode verzichtet.

6 In der Praxis verwenden die meisten Algorithmen Zufallsfunktionen, wodurch es sich korrekt um eine Näherung an die mathematisch genaue Lösung handelt.

Grundlagen für eine natürliche Systematik zu liefern, also eine Systematik auf Basis der durch Evolution entstandenen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Taxa und Gruppen von Taxa.

Dieser Argumentation folgend wurde in dieser Arbeit auch darauf verzichtet, die Daten der Distance-basierten Algorithmen in den zusammenfassenden „Supertrees“ zu verwenden. Die in Absatz 5.1.3.4 wiedergegebenen Supertrees können somit als Konsensus der evolutionstheoretisch begründeten Ergebnisse der genetischen Analysen angesehen werden. Durch die Zusammenfassung der ITS1-, ITS2- und SSU-Daten liefern die Supertrees Aussagen über verschiedene Betrachtungsebenen hinweg.

Die im o.g. Absatz dargestellten Supertrees stellen den Konsensus aus einer großen Anzahl von den Dendrogrammen dar. Die Vielzahl an gleichermaßen „most parsimonious“ Dendrogrammen ergibt sich nur zum Teil aus „echten“ Unterschieden zwischen den Baumdiagrammen infolge von widersprüchlichen Zuordnungen von Stämmen. Wesentlich häufiger werden in diversen „most parsimonious trees“ verschiedene Gruppen von Stämmen mal feiner, mal weniger fein aufgelöst. Bildet man, wie in Abbildung 24 dargestellt, einen „strict consensus“ aus diesen unterschiedlich fein aufgegliederten Dendrogrammen, so wird im resultierenden Konsensus-Dendrogramm nur die Verzweigungen dargestellt, die in allen Dendrogrammen stets gleich waren. Dem gegenüber stellt ein Adams-Konsensus alle Verzweigungen dar, zu denen es keinen Widerspruch in allen „most parsimonious trees“ gab. Läge den Dendrogrammen eine Merkmalsmatrix zu Grunde, die auf echten Merkmalskombinationen der inkludierten Stämme beruhte, wären die im Strict-Konsensus dargestellten Beziehungen gegenüber denen des Adams-Konsensus als besser gesichert zu betrachten. Die Merkmalsmatrix, die den Supertrees zu Grunde liegt, wird jedoch synthetisch aus den zusammenfassenden Bäumen errechnet. Bedingt durch die Methode zur Erstellung der Merkmalsmatrix, in der die Zugehörigkeit eines Stammes zu einem Ast bzw. Unterast im Dendrogramm als Merkmal dient, findet hier eine künstliche Gewichtung statt, in der die Daten aus reich verzweigten, umfangreichen Baumdiagrammen stärker gewichtet werden. Daher ist im Falle der Supertrees nicht von besser gesicherten Daten des Strict-Konsensus gegenüber dem Adams-Konsensus auszugehen. Das Adams-Konsensus-Diagramm in Abbildung 25 spiegelt die wesentlichen Befunde der einzelnen DNA-

Sequenzanalysen wider. Alle Stämme die aufgrund von morphologischen Charakteristika dem *Nitzschia palea*-Sippenkomplex zugeordnet wurden, gruppieren sich in einem Monophylum zusammen. Dies trifft sowohl auf eigene Stämme als auch auf Stämme zu, deren DNA-Sequenzen aus Datenbanken zitiert wurden. Innerhalb dieses Astes lassen sich neben einigen nicht näher zuzuordnenden Stämmen wieder drei größere Gruppen feststellen, die zum Teil weiter aufgeschlüsselt sind.

Es lässt sich also aus allen untersuchten Sequenzdaten schliessen, dass der Sippenkomplex um *Nitzschia palea* nicht nur morphologisch, sondern auch genetisch gegenüber den anderen, in die Untersuchung eingeflossenen *Nitzschia*-Taxa abgrenzen lässt. Weiter zeigen alle Ergebnisse der Sequenzanalysen, dass es innerhalb des Komplexes drei größere gut gesicherte Gruppen mit zum Teil ebenfalls gut gesicherten Untergruppen gibt.

6.4 Vergleich der morphologischen Merkmale mit den Ergebnissen der DNA-Analysen

Um den angestrebten Vergleich der Ergebnisse der DNA-Analyse mit den Daten der morphologischen Untersuchungen leisten zu können, war in der Anfangsphase dieser Arbeit angedacht worden, die erfassten morphologischen Parameter der einzelnen Stämme, ähnlich den Datenmatrizes mit DNA-Sequenzen, in einer Datenmatrix zu erfassen und mit den gleichen Werkzeugen zu analysieren. Für Merkmale, die sich nominell erfassen lassen, d.h. deren Ausprägung in distinkten Kategorien erfolgt (auch „vorhanden“ bzw. „nicht vorhanden“) stellt dieses Vorgehen prinzipiell kein Problem dar. Teilweise wurden die Methoden sogar für derartigen Datensätze entwickelt und erst später für molekularbiologische Daten angewendet. Merkmale, die metrisch erfasst werden, eignen sich dagegen nicht für eine direkte Verwendung in derartigen Datenmatrizes, da die Algorithmen, die in der Phylogenie verwendet werden, im allgemeinen nur mit diskreten „character states“ aber nicht mit metrischen, also potentiell ein Kontinuum bildenden Daten arbeiten können. Im Falle des Vorliegens von metrischen Daten müssen diese erst in Kategorien umgewandelt werden. In dieser Arbeit wurde sehr bald davon Abstand genommen, die morphologischen Charakteristika auf die beschriebene Art auszuwerten. Ein

Grund hierfür ist, dass bei den untersuchten Stämmen des *Nitzschia palea*-Komplexes die meisten der in der Gattung *Nitzschia* ohnehin relativ wenigen Merkmale konstant und damit für eine phylogenetische Analyse innerhalb dieses Komplexes ungeeignet sind. Bei den metrischen Eigenschaften der Stämme zeichnete sich sehr bald ab, dass diese Messgrößen häufig eine mehr oder minder konjunkte Morphokline beschreiben. Eine Klassifizierung in disjunkte Kategorien wäre somit rein willkürlich und somit aus wissenschaftlicher Sicht abzulehnen gewesen.

Eine Untersuchung der morphometrischen Daten mit „klassischen“ Methoden der Statistik wie ANOVA oder T-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen stellt stets ein Vergleich der Mittelwerte dar. Die Aussage, dass sich zwei Gruppen z.B. hinsichtlich ihrer Länge signifikant unterscheiden, drückt also aus, dass die Zellen der ersten Gruppen im Mittel mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % länger bzw. kürzer sind als die der zweiten Gruppe. Für die Unterscheidung der Gruppen ist diese Aussage aber unbrauchbar, da man in der Regel nicht den Mittelwert einer gesamten Population bei der Bestimmung zur Verfügung hat, sondern einige Einzelexemplare. Für die Eignung eines Merkmals zur Differenzierung zwischen Taxa ist es von viel größerem Interesse, ob es hinsichtlich des Merkmals Überschneidungen zwischen den beiden Gruppen gibt. Sind diese Überschneidungen nur die Ausnahme, kann das untersuchte Merkmal als Differenzialmerkmal Verwendung finden. Treten Überschneidungen jedoch regelmäßig auf, ist das untersuchte Merkmal zur Unterscheidung zweier Taxa nicht geeignet.

Von den an dieser Stelle untersuchten morphometrischen Daten eignen sich das Verhältnis von Zelllänge zur Zellbreite sowie die Streifen-, Fibulae- und Areolendichte zur Unterscheidung zwischen Stamm OS02 und den übrigen untersuchten Stämmen, da dieser als einziger Stamm dieser Untersuchung nicht dem *Nitzschia palea*-Komplex zugeordnet ist. Innerhalb des *Nitzschia palea*-Komplexes sind nur die Gruppen 1.2 und 2.1 aufgrund von Länge, Breite, dem Verhältnis von Länge zur Breite und der Projektionsfläche der Zellen scheinbar unterscheidbar. Da aber von beiden erwähnten Gruppen nur sehr wenige Frusteln vermessen werden konnten, ist nicht mit Sicherheit festzustellen, ob es sich hier um einen „echten“ Unterschied handelt, oder ob nur die natürliche Variabilität aufgrund der zu geringen Zahl untersuchter Schalen unzureichend

erfasst wurde. Somit konnte bei keinem der untersuchten metrischen Merkmale eine Eignung als Differenzialmerkmal innerhalb des *Nitzschia palea*-Komplexes nachgewiesen werden. Dieses Resultat deckt sich mit den Beobachtungen von BONIK & LANGE-BERTALOT (1978). Den Autoren stand hierbei zum Zeitpunkt der Untersuchung jedoch keine molekularbiologische Diagnostik zur Verfügung. Ein Vergleich, inwieweit die damals untersuchten Stämme mit denen aktueller Untersuchungen ähnlich oder konspezifisch sind, ist daher nicht möglich.

6.5 Anwendung der Artkonzepte auf die Ergebnisse

Raphide Kieselalgen verhalten sich über viele Zellgenerationen hinweg wie Agamotaxa, d.h. die Vermehrung findet nur durch mitotische Zellteilungen statt. Ein Austausch von Erbinformation durch Karyogamie tritt nur sehr sporadisch auf. Dies führt zu Problemen, da die sexuellen Vorgänge nur sehr selten beobachtet werden können und es von daher extrem schwierig ist, gesicherte Aussagen über (potentielle) sexuelle Kompatibilität oder sexuelle Isolation zu treffen. Eine direkte Anwendung der Artkonzepte nach MAYR oder HENNIG ist also zunächst nicht möglich.

Ein regelmäßig stattfindender sexueller Austausch bewirkt aber andererseits eine gewisse Ähnlichkeit der Erbinformation. Bei sexuell isolierten Populationen dagegen wird sich eine größere Divergenz der Erbinformation einstellen. Findet sich also eine Individuengruppe mit untereinander sehr ähnlichem genetischen Material, die sich gegenüber anderen Individuengruppen ähnlichen genetischen Materials deutlich unterscheidet, ist dies ein deutlicher Hinweis, dass zwei genetisch bzw. sexuell isolierte Taxa vorliegen (BEHNKE, FRIEDL ET AL. 2004; CASTELEYN, EVANS ET AL. 2009). In einem solchen Fall kann man also bei Anwendung der o.g. Artkonzepte von zwei Arten sprechen (AMATO, KOOISTRA ET AL. 2007).

Aufgrund der DNA-Sequenzen der untersuchten Stämme lassen sich innerhalb der Stämme drei größere (bzw. vier – den außerhalb des *Nitzschia palea*-Komplexes anzusiedelnden Stamm OS02 eingeschlossen) Gruppen unterscheiden, die die obigen Ansprüche erfüllen. Es gibt also Hinweise darauf, dass eine sexuelle Isolation zwischen den Gruppen vorliegt und somit von mehr als einer Art

im Sinne von HENNIG (1950) oder MAYR (1999) ausgegangen werden muss. Innerhalb der Gruppen gibt es jedoch weitere Untergruppen, die jeweils gewisse genetische Abweichungen zeigen. Inwieweit diese Divergenzen nur Mutationen innerhalb der uniparentalen Fortpflanzungslinien oder Folgen von sexueller Isolation sind, ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht objektiv feststellbar.

Morphologische Merkmale sind für die Einteilung in Arten im Sinne von MAYR oder HENNIG nicht von Relevanz, solange sie nicht zur sexuellen Inkompatibilität führen. Eine entsprechende Bedeutung ist für alle hier behandelten Charakteristika unwahrscheinlich. Nach heutigem Wissenstand kann allerdings zu keiner der untersuchten Strukturen eine gesicherte Aussage darüber gemacht werden, inwieweit diese für den Vorgang der Karyogamie und somit für die sexuelle Kompatibilität von Bedeutung sind. Solange es keine tiefergehenden Erkenntnisse über die Funktion der Strukturen bei sexuellen Vorgängen gibt, müssen diese bei Artkonzepten, die auf Fortpflanzungsgemeinschaften basieren, unberücksichtigt bleiben. Im Gegensatz zu genetischen Merkmalen werden in diesen Artkonzepten nur phaenetische Merkmale „zugelassen“, um biologisch, d.h. mit sexueller Kompatibilität begründete Spezies in der Praxis unterscheiden zu können. Wie in zahlreichen Untersuchungen (z.B. KOOISTRA, SARNO ET AL. 2004) festgestellt wurde, sind häufig Populationen, die miteinander im (räumlichen) Kontakt stehen, sexuell inkompatibel. Sie stellen also Arten sensu MAYR BZW. HENNIG dar, die sich aber morphologisch nicht unterscheiden. Es wird in einem solchen Fall von kryptischen Arten gesprochen

Da sich auch unter den morphologischen Merkmalen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, keine Differenzialmerkmale zur Unterscheidung der genetischen Gruppen fanden, sind diese ebenfalls als kryptische Arten anzusprechen.

Der Definition von MISHLER & THERIOT (2000) folgend ergeben sich nach den phylogenetischen Analysen der unterschiedlichen DNA-Sequenzen unterschiedliche Einteilungen in Arten. Die Parsimony-Analyse⁷ der ITS 2-Region (Abbildung 17) zeigt eine eindeutige Aufspaltung in vier, jeweils nicht weiter unterteilbare Monophyla. Es kann diesem Ergebnis zufolge von vier Arten gesprochen werden, wobei sich die Stämme des *Nitzschia palea*-Komplexes in

⁷ Die Ergebnisse der Distance-Analysen bleiben für die Anwendung der phylogenetischen Artkonzepte unberücksichtigt, da diese auf Algorithmen der „numerischen Kladistik“ beruhen, die in modernen phylogenetischen Diskussionen meist abgelehnt wird.

drei gut gesicherte Arten einteilen lassen. Im Vergleich dazu werden in der Parsimony-Analyse der ITS 1-Regionen (Abbildung 15) im wesentlichen ähnliche Gruppen eingeteilt, jedoch werden diese weiter untergliedert. Geht man vom geringst umfassenden Taxon in der Klassifikation aus, in das Organismen aufgrund von Anzeichen für Monophylie gruppiert werden, so können einige der untersuchten Stämme als eigene Spezies aufgefasst werden. Beispielsweise wird in der hellblau dargestellten Gruppe in Abbildung 15 Stamm SG01 von den übrigen Stämmen der Gruppe (OA11, OW01, OA05 und OW05) schwach abgetrennt, wodurch SG01 als separate Art aufgefasst werden muss. In der darüber dargestellten blausviolett hinterlegten Gruppe könnten alle Stämme in eine Art zusammengefasst werden. Die am wenigsten umfassende Gruppe innerhalb dieses Monophylums wären aber lediglich die Stämme OH05 und OA02, woraus resultieren würde, dass alle übrigen Stämme des Monophylums als einzelne Arten aufgefasst werden müssten. Die schlechte Absicherung der Abtrennung der blausviolett hinterlegten Stämme gegenüber dem Rest offenbart ein weiteres Dilemma: Die Grenze, ab der in einem Phylogramm Stämme in eine nicht aufgelöste Gruppe zusammengefasst oder in Untergruppen aufgeteilt werden, ist willkürlich. Im vorliegenden Fall wurde die Grenze gemäß den Standardeinstellungen der Software bei einem Bootstrapwert von $> 50\%$ gesetzt. Das heißt im Umkehrschluss, dass bei bis zu 50% der Bootstrapreplikate die jeweilige Gruppierung anders aufgelöst sein kann, ohne dass sich dieses sichtbar auf das Ergebnis auswirkt. Im Beispiel der SSU-Sequenzen (Abbildung 19) wirkt sich diese willkürliche Begrenzung besonders deutlich aus: Legt man den Bootstrapwert, unter dem Gruppen nicht als solche dargestellt werden mit 50% fest, so wird der *Nitzschia palea*-Komplex in 17 Arten aufgespalten, legt man den Bootstrapwert mit 70% fest, wird der gesamte Komplex als eine Art dargestellt.

Zur Problematik der methodisch bedingten Artefakte in phylogenetischen Analysen äußern sich PLATNICK & WHEELER (2000) in den Erläuterungen zu ihrem relativ ähnlichen Artkonzept. Sie stellen die Forderung auf, dass sich die Ergebnisse, die zur Artabgrenzung genutzt werden, mit verschiedenen Datensätzen reproduzieren lassen müssen. Auf diese Weise wird auch vermieden, dass durch ungeeignete Merkmalskombinationen fehlerhafte Zuordnungen entstehen. Bezogen auf die hier vorliegenden Resultate heißt das in der Konsequenz,

dass die in allen durchgeführten Analysen gefundene monophyletische Zusammengruppierung der Stämme, die morphologisch dem *Nitzschia palea*-Komplex zugeordnet wurden, gegenüber den anderen Stämmen und Sequenzdaten aus den Sequenzdatenbanken für das Konzept von PLATNICK & WHEELER (2000) von Relevanz sind. Die Aufteilung des Komplexes um *Nitzschia palea* in drei größere Äste findet sich in allen Dendrogrammen der ITS-Sequenzen (Abbildungen 15, 16, 17 und 18) wieder. Zunächst könnte hier also von drei Arten sensu PLATNICK & WHEELER (2000) gesprochen werden. Jedoch bestätigt die Analyse der SSU-Sequenzen (Abbildungen 19 und 20) diese Aufteilung nicht. Hier werden bis auf SG01, NPAL6 und SU01 in einer Untergruppe und OA09 sowie OA11 in einer zweiten Untergruppe alle Stämme des *Nitzschia palea*-Komplexes in eine nicht weiter aufgelöste Gruppe zusammengefasst. Da die genetische Information der SSU als codierender Bereich mit essentiellen Funktionen für die Zelle wesentlich konservativer ist als die ITS-Bereiche, ist denkbar, dass die drei „ITS-Gruppen“ aufgrund ihrer relativen Nähe zueinander nicht separiert werden können. Ein Widerspruch zu den Ergebnissen der ITS-Sequenzanalysen stellt die fehlende Auflösung der SSU-Analyse also nicht unbedingt dar. Vergleicht man die morphologischen Daten der Stämme mit den gefundenen „ITS-Gruppen“, finden sich bis auf die Fibulae- Streifen- und Punktdichte und der Ausbildung zentraler Raphenenden bei Stamm OS02 keinerlei morphologische Charakteristika, anhand derer eine Unterscheidung dieser Arten möglich wäre. Die Messwerte zu den morphologischen Parametern der übrigen hier untersuchten Stämme stellen vielmehr mehr oder weniger ausgeprägte Kontinua dar. Dieses wiederum bestätigt eher den Befund der SSU-Sequenzanalyse, nach der die dem *Nitzschia palea*-Komplex zugeordneten Stämme in eine Art sensu WHEELER & PLATNICK (2000) zusammengefasst würden. Für eine nicht willkürliche Einteilung in Arten wären diesem Konzept zufolge weitere Analysen zur Erzeugung weiterer Datensätze nötig, die dann entweder die Zusammenfassung in eine Art „*Nitzschia palea*“ oder die Aufteilung in (mindestens) drei Arten bestätigen bzw. ausschließen.

Das evolutionäre Artkonzept von WHILEY (2000) offenbart bei einer Anwendung auf die vorliegenden Daten deutliche Probleme. Das Bewahren einer eigenen Identität gegenüber anderen Abstammungslinien ist im Grundsätzlichen der sexuellen Kompatibilität, wie MAYR (2000) oder HENNIG (1950) sie zur Defi-

nition der Art verwenden, sehr ähnlich. Folglich gilt, was für die Anwendung der Artkonzepte von MAYR oder HENNIG bereits diskutiert wurde. Wodurch sind aber „eigene evolutive Tendenzen“ definiert? Reicht die Aussage über Änderungen im Genom aus, um eine „eigene evolutive Tendenz“ festzustellen, oder ist die Beobachtung von speziellen physiologischen oder morphologischen Eigenschaften nötig, die eine Tendenz zu eigenen Anpassungen an Umweltbedingungen bewirken? Im ersten Fall können für alle genetisch unterschiedlichen Gruppen dieser Arbeit eigene evolutive Tendenzen festgestellt werden. Im Falle nötiger Aussagen über eigene Anpassungstendenzen an Umweltparameter sind die in dieser Arbeit erhobenen Daten für eine Anwendung des evolutionären Artkonzepts nach WHILEY (2000) unzureichend. Beweise für eine eigene Geschichte einer Abstammungslinie lassen sich direkt nur über Reihen von fossilen bzw. historischen, konservierten Exemplaren finden, die die Evolution einer Abstammungslinie reflektieren – für die meisten Abstammungslinien eine utopische Forderung. Wenn, wie bei den behandelten Stämmen aus dem *Nitzschia palea*-Komplex, sexuelle Isolation gegenüber anderen Abstammungslinien sich nicht in morphologisch feststellbaren Unterschieden manifestiert, ist ein Beweis einer eigenen Historie einer Abstammungslinie in direkter Form unmöglich, da zum fossilen oder subfossilen Material nur in sehr seltenen Ausnahmefällen Aussagen über Genom oder Physiologie getroffen werden können. Eine Verwendung der Äste eines Dendrogramms als Hinweis auf eine eigenen Geschichte ist extrem problematisch, da es sich dabei nicht zwangsläufig um das Abbild der Evolution von Abstammungslinien handelt. Vielmehr stellen die Äste eines Dendrogrammes ein theoretisches Konstrukt dar, welches insbesondere bei Methoden der numerischen Kladistik vom Maßstab der Betrachtung und den zugrunde liegenden Daten abhängt.

6.6 Schlussfolgerungen für die Taxonomie

Die Auftrennung des Sippenkomplexes um *Nitzschia palea* in mindestens drei Arten, wie sie nach mehreren Artkonzepten gerechtfertigt scheint, wirft ein taxonomisches Problem auf: Welche der Arten ist die „echte“ *Nitzschia palea*? Der Typus der Art stellt ein Glühpräparat dar, das zwischen zwei Glimmerplättchen eingebettet ist (TROBAJO 2004) Bedingt durch diese Präparation ist davon

auszugehen, dass im Typus keinerlei verwertbare DNA vorhanden sein wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine Entscheidung, welche der drei Arten dem Taxon entspricht, das der Erstbeschreibung zugrunde liegt, aufgrund von morphologischen Eigenschaften nicht objektiv möglich ist. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob überhaupt eine der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Formen äquivalent zum Typus ist. Das gleiche Problem besteht auch bei der Benennung der übrigen Arten im Sippenkomplex. Hier müsste anhand genetischer Analysen geprüft werden, ob eine hier also solche bezeichneten Arten dem Typus eines als Synonym zu *N. palea* eingestuften Taxon entspricht, bzw. dem Typus eines anderen Taxons. Dieses Vorgehen ist jedoch im gleichen Maße unmöglich, wie die Feststellung, was denn die „echte“ *N. palea* ist. Die einzige legitime Lösung dieser Probleme wäre die Festlegung von Neotypen, die zusätzlich auch genetisch charakterisiert sind.

Für die „Praxis“, also beispielsweise die Anwendung in Bioindikationsystemen, bleibt eine derartige Aufgliederung solange unpraktikabel, wie molekularbiologische Verfahren zur Bestimmung der Taxa in einer Probe gegenüber mikroskopischen Verfahren zu aufwändig, zu zeitintensiv und zu teuer sind.

7. Literatur

- Alles, E. 1999. *Fließgewässerversauerung im Schwarzwald Ökologische Bewertung auf der Basis benthischer Diatomeen*. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg.
- Amato, A., Kooistra, W. H. C. F., Ghiron, J. H. L., Mann, D. G., Proschold, T., Montresor, M. 2007. Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158: 193-207.
- Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C. Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, a. e., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kröger, N., Lau, W.W.Y., Lane, T. W., Larimer, F. W., Lippmeier, J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Schnitzler-Parker, M., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Schwartz, D. C., Thamtrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F. P. & Rokhsar, D. S. 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* 306, 79–86.
- Azovsky, A. I. & Saburova, M. A. 2005. Selective feeding of littoral harpacticoids on diatom algae: hungry gourmands? *Marine Biology* 148(2): 327-337.
- Beck, B. 2005. Langjährige Entwicklung der Makrophytenvegetation und der Nährstoffsituation der Osterseen. Diplomarbeit an der Limnologischen Station der TU München, Iffeldorf.
- Behnke, A., Friedl, T., Chepurinov, V. A., Mann, D. G. 2004. Reproductive compatibility and rDNA sequence analysis in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *Journal of Phycology* 40(1): 193-208
- Bergé, J.P., Bourgougnon, N., Carbonelle, D., Le Bert, V., Tomasoni, C., Durand, P. & Roussakis, C. 1997. Antiproliferative effects of an organic extract from the marine diatom *Skeletonema costatum* (GREV.) CLEVE

against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). *Anticancer Research* 17: 2115-2120

- Bergé, J.P., Bourgougnon, N., Pojer, F. Billaudel, S. Cherman, J.C., Robert, J.M. & Franz, G. 1999. Antiviral and anticoagulant activities of a water soluble fraction of the marine Diatom *Haslea ostrearia*. *Plant Med* 65: 604-609
- Bhattacharya, D., Medlin, L., Wainright, P. O., Ariztia, C., Bibeau, C., Stickel, S. K. & Sogin, M. L. 1992. Algae containing chlorophylls a + c are paraphyletic: Molecular evolutionary analysis of the chromophyta. *Unveröffentlicht, direkte Eingabe in GenBank*.
- Bonik, K. & Lange-Bertalot, H. 1978. Strukturvariationen ökologisch wichtiger Kieselalgen – ein Beitrag zur Taxonomie der lanceolaten Nitzschien und kleinen Naviculaceen. Courier Forschungsinstitut Senckenberg 33.
- Casteleyn, G., Evan, K. M., Backeljau, T., D'hondt, S. Chepurnov V. A., Sabbe, K., Vyverman, W. 2009. Lack of population genetic structuring in the marine planctonic diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) in a heterogeneous area in the Southern Bight of the North Sea. *Marine Biology* 156 (6): 1149-1158.
- Chen, D., Eulenstein, O. & Fernández-Baca, D. 2004. Rainbow: A Toolbox for Phylogenetic Supertree Construction and Analysis. *Bioinformatics*. 20(16):2872-2873.
- Cholnoky, B. J. 1968. Die Ökologie der Diatomeen im Binnengewässer. Verlag J. Cramer, Weinheim.
- Czanderle, S. 2003. Bewertung von Gewässern unterschiedlicher Trophie (Osterseen) anhand des Diatomeenindex sowie biometrische Charakterisierung von *Nitzschia*-Arten. Diplomarbeit an der Limnologischen Station der TU München, Iffeldorf.
- Eberle, M. 2004. Phänotypische Plastizität und populationsökologische Verhaltensweisen von *Nitzschia palea* var. *debilis* in Abhängigkeit unterschiedlicher Nährstoffgradienten. Diplomarbeit an der Limnologischen Station der TU München, Iffeldorf.

- Esser, K. 1986. Kryptogamen: Cyanobakterien, Algen, Pilze, Flechten; Praktikum und Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Ettl, H. 1980. Grundriß der allgemeinen Algologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Field, C. B. & M. J. Behrenfeld. 1998. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281(5374): 237-240.
- Fraunholz, M. 1999. Das Nucleomorph Chromosom II der Cryptomonade *Guillardia theta*: Struktur, Sequenzanalyse und evolutionäre Implikationen. Dissertation an der Philipps-Universität Marburg.
- Goertzen, L. R. & J. J. Cannone. 2003. ITS Secondary Structure Derived from Comparative Analysis: Implications for Sequence Alignment and Phylogeny of the Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29(2): 216-234.
- Goos, F.-M. 1999. Entwicklung und Architektur von Aufwuchsgesellschaften unter definierten Licht- und Nährstoffverhältnissen. Dissertation an der TU München.
- Graw, J. 2006. Genetik. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Hennig, W. 1950. Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Deutscher Zentralverlag, Berlin
- Hofmann, G. 1993. Bibliotheca Diatomologica Band 30: Aufwuchs in Seen und ihre Eignung als Indikatoren der Trophie. Verlag J. Cramer, Berlin Stuttgart.
- Hürlimann, J. 1993. Kieselalgen als Bioindikatoren aquatischer Ökosysteme zur Beurteilung von Umweltbelastungen und Umweltveränderungen. Dissertation an der ETH-Zürich.
- Hustedt, F. 1930. Bacillariophyta. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Kooistra, W.H.F.C., Sarno, D., Percopo, I., Medlin, L. K., Sims, P. & Zingone, A. 2004. High Species Diversity in Skeletonema. 18th International Diatom Symposium, 27.

- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot 1988. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae - Band 2/2 - 2.Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Kremer, B. P. 2002. Mikroskopie, Das große Kosmos-Buch. Franckh-Kosmos, Stuttgart.
- Lange-Bertalot, H. 1976. Eine Revision zur Taxonomie der *Nitzschiae lanceolatae* GRUNOW, Die Klassischen bis 1930 beschriebenen Süßwasserarten Europas, Nova Hedwigia 28, 253-307.
- Lange-Bertalot, H. 1980. New Species, Combinations and Synonyms in the Genus *Nitzschia*. Bacillaria 3: 41-77.
- Lange-Bertalot, H. & Simonsen, R. 1978. A Taxonomic Revision of the *Nitzschiae lanceolatae* Grunow, 2. European and Related Extra-European Fresh Water and Brackisch Water Taxa. Bacillaria 1: 113-136.
- Lebeau, T. & Robert, J. M. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. Applied Microbiology and Biotechnology 60(6): 612-623.
- Lebeau, T. & Robert, J. M. 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. Applied Microbiology and Biotechnology 60(6): 624-632.
- Li, H., Yang, G. & Zhang, X. 2004. Isolation and molecular identification of two strains of *Cylindrotheca closterium*. Direkte Eingabe in GenBank
- Li, H., Yang, G. & Shi, Y. 2005. Isolation of *Nitzschia longissima* and its morphological and molecular identification. Direkte Eingabe in GenBank
- Li, H., Wu, S. & Sun, Y. 2005. Phylogenetic analysis of *Cylindrotheca closterium*. Direkte Eingabe in GenBank
- Loibl, K. 2005. Genetischer und Morphologischer Vergleich zwischen Arten der Gattung *Nitzschia* und anderen Bacillariaceen. Diplomarbeit an der Limnologischen Station der TU München, Iffeldorf.
- Lunter, G., Rocco, A., Mimouni, N. 2007. Uncertainty in homology interferences: Assessing and improvin genomic sequence alingment. Genome Research 18: 298-309.

- Mann, D. G. 1982. The Use of the Central Raphe Endings as a Taxonomic Character. *Plant Systematics and Evolution* 141(2): 143-152.
- Mann, D. G. & Chepurnov, V. A. 2003. Mating system, sexual reproduction, and auxosporulation in the anomalous raphid diatom *Eunotia* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology* 39 (6): 1067-1084
- Mann, D. G. & Chepurnov, V. A. 2004. What have the Romans ever done for us? The past and the future contribution of culture Studies to Diatoms Systematics. *Nova Hedwigia* 79: 237-291.
- Mayden R. L. 1997. A hierarchie of species concepts: the denouement on the saga of the species problem. In: Claridge, M. A., Dawah, H. A., Wilson, M. R. (Hrsg.) *Species: Units of diversity*. Chapman & Hall, New York.
- Mayr, E. 1996. What is a species and what is not? *Philosophy of Science* 63:262-277
- McCormick, P. V. & Stevenson, R. J. 1989. Effects of Snail Grazing on Benthic Algal Community Structure in Different Nutrient Environments. *Journal of the North American Benthological Society* 8(2): 162-172.
- Medlin, L. K. & Kaczmarska, I. 2002. Evolution of the diatoms: V. Morphological and Cytological Support for the Major Clades and a Taxonomic Revision. Direkte Eingabe in GenBank
- Medlin, L. K., Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R. & Wellbrock, U. 1996. Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta). II. Nuclear-Encoded Small-Subunit rDNA Sequence Comparisons Confirm a Paraphyletic Origin for the Centric Diatoms. *Molecular Biology and Evolution* 13(1):67-75.
- Meier, R., & Willman, R. 2000. The Henningian Species Concept. In: Wheeler, Q.D.; Meier, R. 2000. *Species concepts and phylogenetic theory, A Debate*. Columbia University Press, New York.
- Melzer, A. & Zimmermann, S. 2001. Aktualisierung der Seeuferkartierung für den Starnberger See. Wasserwirtschaftsamt München
- Metzner, H. 1973. *Biochemie der Pflanzen*. Verlag Enke Ferdinand, Stuttgart.

- Mills, K. H. & Schindler, D. W. 1986. Biological indicators of lake acidification. *Water, Air and Soil Pollution* 30: 779-789.
- Mishler, B. D., Theriot, E. C. 2000. The Phylogenetic Species Concept (sensu Mishler and Theriot): Monophyly, Apomorphy, and Phylogenetic Species Concepts. In: Wheeler, Q.D.; Meier, R. 2000. *Species concepts and phylogenetic theory, A Debate*. Columbia University Press, New York.
- Nicotri, M. E. 1977. Grazing effects of four marine intertidal herbivores on the microflora. *Ecology* 58: 1020-1032.
- Norton, T. A.; Melkonian, M. & Anderson, R. A. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35(4), 308-326
- Passmore, A. J., Jarman, S.N., Swadling, K. M., Kawaguchi, S., McMinn, A. & Nicol, S. 2004. DNA as a Dietary Biomarker in Antarctic Krill, *Euphausia superba*. *Marine Biotechnology*. 8 (6), 686-696
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs W. 2004. Ten Species in one: DNA Barcoding Reveals Cryptic Species in the Neotropical Skipper Butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, (41): 14812-14817.
- Regan, C. T. 1926. *Organic Evolution*, Report of the British Association for the Advancement of Science 1925:75-86 zitiert in: Wheeler, Q.D.; Meier, R. 2000: *Species concepts and phylogenetic theory, A Debate*. Columbia University Press, New York.
- Remane, A. 1952. *Die Grundlagen des natürlichen Systems, der vergleichenden Anatomie und der Phylogenetik*. (2.Aufl. 1956, Nachdruck der 2.Auflage bei Verl. Otto Koeltz, Koenigstein/Taunus 1971)
- Rimet, F., Beszteri, B., Berzano, M., Masquelier, S., Nicot, N. & Ector, L. 2004 (1). Phylogeny of *Nitzschia* based on 18S rDNA sequences. Direkte Eingabe in GenBank
- Rimet, F., Beszteri, B., Berzano, M., Masquelier, S., Nicot, N. & Ector, L., 2004 (2). Phylogeny of *Nitzschia* based on 18S rDNA sequences. Direkte Eingabe in GenBank

- Rott, E. & G. Hofmann. 1997. Indikationslisten für Aufwuchsalgen Teil 1: Saprobienle Indikation. Bundesministerium f. Land.- u. Forstwirtschaft. Wien.
- Round, F.E., Crawford, R.M. & Mann, D.G. 1990. The diatoms – biology & Morphology of the Genera. Cambridge University Press, Cambridge.
- Salomoni, S. E. & O. Rocha. 2006. Epilithic diatoms as indicators of water quality in the Gravatai river, Rio Grande do Sul, Brazil. *Hydrobiologia* 559: 233-246.
- Sandmann, E. 1995. Die Entwicklung der Nährstoffsituation und der Makrophytenvegetation in den Osterseen zwischen 1981 und 1994. Diplomarbeit an der Limnologischen Station der TU München, Iffeldorf.
- Scala, S. & Bowler, C. 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58(11): 1666-1673.
- Sober, E. 1988. *Reconstructing the Past: Parsimony, Evolution, and Inference*. MIT Press, Cambridge (Massachusetts).
- Sogin, M. L. & Patterson, D. J. 1995. *Stramenopiles*. Version 01 January 1995 (under construction). <http://tolweb.org/Stramenopiles/2380/1995.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
- Stein, J. R. 1973. *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge, London, N.Y.
- Steinberg, C. E. W. 1992. Kieselalgen als Indikatoren für die Versauerung stehender und fließender Gewässer. Veröffentlichungen zum Projekt „Angewandte Ökologie“ 3: 111-129.
- Strasburger, E., Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. 1991. *Lehrbuch der Botanik*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Swofford D. 2003. *PAUP**. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 10. Sinauer, Sunderland,.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment

- through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Trobajo, R. & Cox E. J. 2004. Examination the type Material of *Nitzschia frustulum* (KÜTZING) GRUNOW and *N. palea* (KÜTZING) W. SMITH. 18th International Diatom Symposium, 114.
 - Van den Hoek, C., H. M. Jahns & Mann, D. G. 1993. *Algen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
 - Van der Werff, A. 1955. A New Method of Concentrating and Cleaning Diatoms and Other Organisms. *Proceedings of the International Association for theoretical and applied Limnology* 13: 276-277.
 - Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandeele, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP – A new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407-4414.
 - Wen, Z. Y. & Chen, F. 2002. Perfusion culture of the diatom *Nitzschia laevis* for ultra-high yield of eicosapentaenoic acid. *Process Biochemistry* 38(4): 523-529.
 - Wendker, S. & Geissler, U. 1986. Investigations on Valve Morphology of Two *Nitzschiae Lanceolatae*, 9th Diatom-Symposium, 469-480
 - Wheeler, Q. D. & Platnick, N. I. 2000. The Phylogenetic Species Concept (sensu Wheeler and Platnick). In: Wheeler, Q.D.; Meier, R. 2000. *Species concepts and phylogenetic theory, A Debate*. Columbia University Press, New York.
 - Whiley, E. O. & Mayden, R. L. 2000. The evolutionary Species Concept : In: Wheeler, Q.D.; Meier, R. 2000. *Species concepts and phylogenetic theory, A Debate*. Columbia University Press, New York.
 - Wikipedia. 2007. Ribosomale DNA. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 16. Dezember 2007, 13:13 UTC. URL: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ribosomale_DNA&oldid=40123783

Literatur

- Yongmanitchai, W. & Ward O. P. 1991. Growth of and Omega-3-Fatty-Acid Production by *Phaeodactylum-Tricornutum* under Different Culture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 57(2): 419-425.

Anhang

DNA-Sequenzen eigener Stämme

Stamm KG02

SSU

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
1-   50  GTGGAACCTG TGTGGCATTG GGTGTGTCGTG CAGGGGATGC CCATCATTTA
51-  100  CTGTGAAAAA ATTAGAGTGT TCAAAGCAGG CTTATGCCGT TGAATATATT
101- 150  AGCATGGAAT AATAAGATAG GACCTTGGTA CTATTTTGTG GGTTTGCGCA
151- 200  CCAAGGTAAT GATTAATAGG GACAGTTGGG GGTATTTCGT TTCCAATTGC
201- 250  AGAGGTGAAA TTCTTGGATT TCTGGAAGAC GAACTACTGC GAAAGCAITTT
251- 300  ACCAAGGATG TTTTCATTAA TCAAGAACGA AAGTTAGGGG ATCGAAGATG
301- 350  ATTAGATACC ATCGTAGTCT TAACCATAAA CTATGCCGAC AAGGGAITGG
351- 400  CGGAGTCTCG TTTTGTCTCC GTCAGCACCT TATGAGAAAT CACAAGTCTT
401- 450  TGGGTTCGGG GGGGAGTATG GTCGCAAGGC TGAAACTTAA AGAAATTGAC
451- 500  GGAAGGGCAC CACCAGGAGT GGAGCCTGCG GCTTAATTTG ACTCAACACG
501- 550  GGAAAACTTA CCAGGTCCAG ACATAGTGAG GATTGACAGA TTGAGAGCTC
551- 600  ----- --ATGGGTGG TGGTGCATGG CCGTTCCT-- -----T
601- 650  GATTTGTCTG GTTAATTTCCG TTAACGAACG AGACCCCTGC CTGCTAAATA
651- 700  GCTTGCCGAG TGAATTTTCA CTGGGTGAAG CTTCTTAGAG GGACGTGCAT
701- 750  TCTATTAGAT GCAGGAAGAT AGGGGCAATA ACAGGTCTGT GATGCCCTTA
751- 800  GATGTTCTCG GCCGCACGCG CGCTACACTG ATGCATTCAA CGAGTTCCTC
801- 850  CTTGGCCGAG AGGCCTGGGC AATCTTTTGA ACGTGCATCG TGATAGGGAT
851- 900  AGATTATTGC AATTATTAAT CTTGAACGAG GAATTCCTAG TAAACGCAGA
901- 950  TCATCAATCT GCAITGATTA CGTCCCTGCC CTTTGTACAC ACCGCCCGTC

```

Anhang

951-1000 GCACCTACCG ATTGAATGGT CCGGTGAAGC CTCGGGATTG TGGTGAATTT
1001-1050 CCTTTACTGG GAGTTCATTG CGAGAACTTG TCTAAACCTT ATCATTTAGA
1051-1100 GGAAGGTGAA GTCGTAAACAA GGTTTCCGTA GGTTGAACCTG CAGAAG

Stamm LG09

ITS 1

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ACCTGGGGAA GGATCATTAC CACACCTCTT CCGGCGTGCG TGCATCAGTG
51- 100 TGCCCTGGCA TGCTGGCGCC GCCGCCAGAA AACAAATAGAA GGTTGAAGCGT
101- 150 CACTGCGGAT CCAACTATTG CGTCCCACGT AACCAAACCT AAATTTGTGG
151- 200 TGTTCTCGG AATGCCATC TTTATTAAIN ACATTTCAA TGTGACCTG
201- 250 ATCTTAATTT TCAATAATTG GCGAGTGTGT TFACTCACGC AACCCATCAA
251- 300 AATTAATGAA AAAACACTTT CAGCACGGAT GTCTTGG

ITS 2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 GATTTTGAAC GCACATGCG CTTTCGGGTT TTCCCATAG CATGCTTGTC
51- 100 TGAGTGTCTG TGAACCCAC TCAGCATICT GTTGGTCCGT TCCAAACNGA
101- 150 TACACGGGAT AGCTGGACIN TGGTGGTGT CCGCCGAACC ACGGTAGTGG
151- 200 ATCTCCACTT GAATGTGAAG GACAACAGAT CAATGGACGT GTACCCTCT
201- 250 CAATGTGTGC TGCAACAAAC AAGTGTGCG CTACCATGAG ACCTACGICT
251- 300 ATCTCCGGTA GCAACTTC

Stamm LG11

ITS1

....|....||....||....||....||....|

Anhang

1- 50 TTGGCTGCAA CAAACAAGTG TTGCGCTACC ATGAGACCTA CGTCTATCTC
51- 100 CGGTAGCAAC TTCNGANGCG TNACTGCGGA TCCAAC TATT GCGTCCCACG
101- 150 TAACCAAACN TAAATTTGTG GIGTTCTCTG GAATGCCCAT NITTTATTAAT
151- 200 AACATNITCA AATGCTGACC TGATCTTAAT TTTCAATAAT TGGCGAGNIG
201- 250 TGTITACTCA CGCAACCCAT CAAAATTAAT GAAAAACAC TITCAGCAAC
251- 300 GGATGICTTG G

Stamm OA02

SSU 1. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 TCGTGTGGT GTTTGCTCGC GTCGCCATCC TTGGGTGGAA CCTGTGTGGG
51- 100 CATTAGGTTG TCCGTGCAGG GGATGCCCAT CATT TACTGT GAAAAAATTA
101- 150 GAGTGTCAA AGCAGGCTTA TGCCGTGAA TATAATTAGCA TGGAAATAATA
151- 200 AGATAGGACC TTGGTACTAT TTTGTGGT TCGCACCAA GGTAATGATT
201- 250 AATAGGGACA GTTGGGGTA TTCGTATTCC ATTGT CAGAG GIGAAATCT
251- 300 TGGATTTCTG GAAGACGAAC TACTGCGAAA GCATTTACCA AGGATGTTTT
301- 350 CATTAAATCAA GAACGAAAGT TAGGGGATCG AAGATGATTA GATACCATCG
351- 400 TAGTCTTAAC CATAAACTAT GCCGACAAGG GATTGGCGGA GTCTCGTTTT
401- 450 GTCTCCGTCA GCACCTTATG AGAAATCACA AGTCTTTGGG TTCCGGGGGG
451- 500 AGTATGGTCG CAAGGCTGAA ACTTAAAGAA ATTGACGGAA GGCACCACC
501- 550 AGGAGTGGAG CCTGCGGCTT AATTTGACTC AACACGGGAA AACTTACCAG
551- 600 GTCCAGACAT AGTGAGGATT GACAGATTGA GAGCTATGGG TGGTGGTGCA
601- 650 TGGCCGTCT T

SSU 2. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

Anhang

1- 50 GTAGGTGAAC CTGCAGAAG

ITS1

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 TCTTTCTTTT TCGAACAGG CCGCGCCCGG CAGCGAGCCG GTTGCTAAGA

51- 100 GTATCGAGGG CATTGCAGCA TAGACGGAGC CTGGCCTCTG TGTGTGTGC

101- 150 ACGCCATCGT CTCCGGCCGA CTGCCTGTTG TTCACANICA CAGTTGTGAC

151- 200 AGTGAGGAAC ACGCAGATCT TATGCTATCA TACGGAAGAT AGCCTAATGC

201- 250 TTTGAGGGCA TAGGTTGGGG TGTTTGCTGT CAANAGCCCT TGGCATTTC

251- 300 CAGCTGATGC TCAGCCGAAC TTTTTACAAC GAACCAGAAT GGAAACGAAG

301- 350 AACITACGGA AAGGATGTGC TGTGAGACAG CCTTGTGCTG TTCGAGCAGAA

351- 400 CATCCCAAAC CTAATCTAGT ACAACTTTCA GCGG

Stamm OA03

ITS1

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 CTTTCTTTT GCGAACAGGC CGCGCCCGG AGCGAGCCG TTGCTAAGAG

51- 100 TATCGAGGGC ATTGCAGCAT AGACGGAGCC TGGCCTCTGT GTGTGNTGCA

101- 150 CGCCATCGTC TCCGGCCGAC TGCCTGTTGT TCACAGTCAC AGTTGTGACA

151- 200 GTGAGGAACA CGCAGATCTT ATGCTATCAT ACGGAAGATA GCCTAATGCT

201- 250 TTGAGGGCAT AGGTTGGGGT GTTNGCTGTC AANAGCCCTT GG

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 CATTTTGAAC GCACATTGCG CTTTTTGGTT TTCCCAGATAG CATGCTTGC

51- 100 TGAGTGTCTG TGAACCCNC TCACCANTCT GNTGGTCGGT TCCAAACNGA

Anhang

101- 150 TACANGGNAT ANCTGGANTG NGGNGGIGTC CCGCCGAACC ACGGTAGTGG
151- 200 ATCTCCANTT GAATGTGAAG GANAACAGAN CANTGGACGT GTTACCCNIT
201- 250 CAATGTTGGC TGCANCAAN AANTGTTGNG CTACCATGAG ACCTACNICT
251- 300 ATCTCCGGTA NCAACTTCGT TGTGTGAGG AGTGTGGCG GTTGGTTTTTC
301- 350 ATAGTAGTGC GATGTTGTTG CAATACCAAC TTGGTGGAGG TAACCGACGC
351- 400 TGTACGIGTA CCTACATCAG CGCTTTCCAA TTCCANAINI CAGNITAA

Stamm OA05

ITS1

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ACCTGGGGAA GGATCATTAC CACACCGATC CAAGATCTTT CTTTTTGCGA
51- 100 ASAGGCCGCG CCCAGCAGCG AGCTGGTTGC TAAGAGCTGG GATGAGGTGC
101- 150 TAGCACGGAG TCWGCTCTGT GTCTTGTAAG WCACTTCATC CYCTCCGGCC
151- 200 AACTGTTTGT TGTTCGAATG GTTTTGAACA GCATGACAGA ATCGAATCCA
201- 250 GTGCTCTCAG GGCATAGGTT GGAGYGIYK TTCATGTTCT TGGCTTATITG
251- 300 ACATGGACAT GATCWAGCGC TCGACCGAAA CTTTCACAAC GAACCAGAAT
301- 350 CGAAATGAAG ATCTGACGAA AAAGGGIGTG GTGTGAGTCA GTCTCGTAGT
351- 400 AACTACGIGT CTGTTGAGC AAACCACCCG AAACCTAATS YWRTACAAC
401- 450 TTCAGCG

ITS2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTTTGAACG CACATTCGCG TTTCCGGTTT TCCCGGTAGC ATGCTTGTCT
51- 100 GAGTGTCTGT GAACCCACT CAGTGTTTAG TTGTTCCGGC TACACGCTAT
101- 150 GCGCTAGACC GAAGAAGTAG ATAACGGAC TTTGGTGGTG TCCCGCNGCA
151- 200 GGGATCTCCA CTTGAATCAC AGTGAAAGAA CAAGATGIGT TGCCCTCTCA

Anhang

201- 250 ATGCTGGCTG CAACAAAGCA AGTGTTCGCG TGCCACGAGG CCTACGTCTA
251- 300 TCTCCGGTAG CAACCTTGGT GTGTGTGAGGA GTTGTGGCGG TTGGTTAATTG
301- 350 TGACAGCGGG ACTTTGATTT GGCTTGGCTT GCTTGTCTAT ACTATATATG
351- 400 AC

Stamm OA08

ITS2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GATAGCATGC
51- 100 TTGTCAGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGC GTTCTGTGAG CCAGTCCCAA
101- 150 ACAGGGGCAG ACGCATAGGA TAGCTGGATT ATGGTGGTGG CCAGTCGTAC
151- 200 TGGCCCTCCA CTTGAATGAA CAGAACAGGA CGTGCTGCC TCTCGACTGT
201- 250 TGGCTGCAAT AGTACAAATG TTGCAGCTGC CACGAGACCT ACGTCTATCT
251- 300 CCGGTAGCAA CCTGGTGTG TGAGGAGTTG TGGCAATTGG TTTTGGCGCA
301- 350 GAGTGACATA CTGTTGGTAT GCTAACTTTG GAGATGGTAG CCATCGCTAT
351- 400 GTCATTACAT GCTAGTGATT AAGCGATTTT TAATTCCAGA TCTCAGCTTA
401- 450 A

Stamm OA11

SSU, 1. Fragment

....|....||....||....||....||....|
1- 50 TTAAGCCATG CATGTCCTAAG TATAAATCTT TTACTTTGAA ACTGNGAACG
51- 100 GCTCATINNA TCAGTTATAG TTTAATTGAT AGTCCCTTAC TACTTGGATA
101- 150 ACCGTAGTAA TTCTAGAGCT AATACATGCG GTCAATACCC TTCTGGGGTA
151- 200 GIATTTATTA GATTGAAACC AACCCCTTCG GGGTATGTG GTGATTTCATA

Anhang

201- 250 ATAAGCTTGC GGGATCGCAT GGCTTTGCCG GCGATGGATC AITCAAGITTT
251- 300 CTGCCCTATC AGCTTTGGAT GGTAGGGTAT TGGCCTACCA TGGCTTTAAC
301- 350 GGGTAACGGG AAATTAGGGT TTGATTCCGG AGAGGGAGCC TGAGAGACGG
351- 400 CTACCACATC CAAGGAAGGC AGCAGGCGCG TAAATTACCC AATCCTGACA
401- 450 CAGGGAGGTA GTGACAATAA ATANCAA

SSU, 2. Fragment

 ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
1- 50 TTCGTGTCGG TGTTTGCTCG CGTCGCCATC CTTGGGTGGA ACCTGTGTGG
51- 100 CATTAGGTTG TCGTGCAGGG GATGCCCATC AITTTACTGTG AAAAAATTAG
101- 150 AGTGTTCAAA GCAGGCTTAT GCCGTTGAAT ATATTAGCAT GGAATAATAA
151- 200 GATAGGACCT TGGTACTAAT TTGTTGGTIT GCGACCAAG GTAATGATTA
201- 250 ATAGGGACAG TTGGGGGTAT TCGTATTCCA TTGTCAGAGG TGAAAITCTT
251- 300 GGATTTCTGG AAGACGAACT ACTGCGAAAG CATTTACCAA GGATGTTTTT
301- 350 ATTAATCAAG AACGAAAGTT AGGGGATCGA AGATGATTAG ATACCATCGT
351- 400 AGTCTTAACC ATAAACTATG CCGACAAGGG AITGGCGGAG TCTCGTTTTG
401- 450 TCTCCGTCAG CACCTTATGA GAAATCACAA GTCTTTGGGT TCCGGGGGGA
451- 500 GTATGGTCCG AAGGCTGAAA CTTAAAGAAA TTGACGGAAG GGCACCACCA
501- 550 GGAGTGGAGC CTGCGGCTTA ATTTGACTCA ACACGGGAAA ACTTACCAGG
551- 600 TCCAGACATA GTGAGGATTG ACAGATTGAG AG----- -----TGG
601- 650 GTGGTGGTGC ATGGCCGTTT TT----- -----AAT
651- 700 TCCGTTAACG AACGAGACCC CTGCCNGCTA AATAGCTTGN CCAGTGAANTT
701- 750 TCCTGGGTGA AACCTCTTAA AGGGACGTGC ATTCTATTAG ATGCAGGAAG
751- 800 ATAGGGGCAA TAACAGGTCT GTGATGCCCT TAGATGTTCT GGGCCGCACG
801- 850 CGCGCTACAC TGATGCATTG AACGAGTINT TCCTTGGCCG AGAGGCCTGG
851- 900 GCAATCTTTT GAACGTGCAT CGTGATAGGG ATAGATTATT GCAATTATTA
901- 950 ATCTTGAACG AGGAATTCCT AGTAAACGCAG ATCATCAAT CTGCATTGAT

Anhang

951-1000 TACGTCCTTG CCCTTTGTAC ACACCGCCCGT CGCACCTAC CGATTGAATG
1001-1050 GTCCGGTGAA GCCTCGGGAT TGTGGTGAATT TCCTTCACT GGGAGTTCAT
1051-1100 TGCGAGAACT TGTCTAAACC TTATCATTTAG AGGAAGGTG AAGTCGTAAC
1101-1150 AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCAGAAG

ITS1

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATCTTTCITTT TTGCGAAGAG GCCCGCGCCC AGCAGCGAGC TGGTTGCTAA
51- 100 GAGCTGGGAT GAGGTGCTAG CACGGAGTCN GCTCTGTGTC TTGTACGACA
101- 150 CTTTATCCCC TCCGGCCAAC TGTTTGTGTGT TCGAATGGTT TTGAACAGCA
151- 200 TGACAGAATC GAATCCAGTG CTCTCAGGGC ATAGGTTGGA GCGTGNATTC
201- 250 ATGTTCTTGG CTTAATGACA TGGACATGAT CTAGCGCTCG ACCGAAACTT
251- 300 TCACAACGAA CCAGAATCGA AATGAAGATC TGACGAAAAA GGGTGTGGTG
301- 350 TGAGTCAGTC TCGTAGTAAC TACGTGTCGTG TTGAGGAAA CCACCCGAAA
351- 400 CCAAATCTAG TACAACITTC AGCGGTGGAT GTCTAGGTTT CCACAAC

ITS2, 1. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTTCCC GGTAGCATGC
51- 100 TTGTCTGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGT GTTTAGTGTG TCGGGCTACA
101- 150 CGCTATGCCG TAGACCGAAG AAGTAGATAA CTGGACTTTG GTGGTGTCCC
151- 200 GCTGCAGGGA TCTCCACTTG AATCACAGTG AAAGAACAAG ATGTGTTGCC
201- 250 CTCTCAATGC TGGCTGCAAC AAAGCAAGTG TTGCGCTGCC ACGAGGCCTA
251- 300 CGTCTATCTC CGGTAGCAAC CTTGGTGTGTG NGAGGAGTTG TGGCGGTTGG
301- 350 TTATT

ITS2, 2. Fragment

Anhang

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 TGATTTGATT TGGCTTGGCT TGCTTGICTA NACTATATAT GACAGTGA

Stamm OE03

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GATAGCATGC
51- 100 TTGTCTGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGC ATTCTGTITGG TCGGTTCCAA
101- 150 ACTGATACAC GGGATAGCTG GACTATGGTG GTGTCCCGCC GAACCACGGT
151- 200 AGTGGATCTC CACTTGAATG TGAAGGACAA CAGAITAATG GACGTGTTAC
201- 250 CCAGTCAATG TTGGCTGCAA CAAACAAGTG TTGCGCTACC ATGAGACCTA
251- 300 CGTCTATCTC CGGTAGCAAC TTCGTTGTTG TGAGGAGITG TGGCGATTGG
301- 350 TTTTCANANT AGINCGATGT TGTTGCAATA CCAACTTGGT GGAGGTAACC
351- 400 GACGCTGTAC ATGNACCTAC ATCAGCGCTT TCCAATCCA GATCTCAGCTT
401- 450 AA

Stamm OH02

ITS1

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATTACCACC ACCCWCCAAGA TCTTTCTTTT TGCGAACAGG CCGCGCCCGG
51- 100 CAGCGARCC GGTGCTAAGA GTATCGAGGG CATTGCAGCA TAACGGAGCC
101- 150 TGGCCTCTG TGTGTGTGCAC GCCATCGTCT CCGGCCGACT GCCTGTTGTT
151- 200 CACAGTCAC AGTTGTGACAG TGAGGAACAC GCARATCTTA TGCTATCATA
201- 250 CGGAAGATAG CCTAATGCTT TGAGGGCATA GGTGGGGTTG TTTGCTGTCA
251- 300 AGAGCCCTTT GGCATTTGCC AGCTGATGCT CAGCCGAAct TTTTACAACG

Anhang

301- 350 ACCARAATGG AAACGAARAA CTTACGGAAA GGATGTGCTG TGAGACAGCC
351- 400 TTGTGCTGTT CGAGCAGAAC ATCCCAAACC WAATCTAGIM CAACTTTCAG
401- 450 CGGGGATGTY TAGGGTYCCM MMAM

Stamm OH03

ITS1

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATTACCACAC CGMWCYAAAT YTTTCTTTTT GCGAAAGGCC GGCCCGGCAA
51- 100 CACCGGTCTA AAGTTAGGGC MITGCARYAA ARACRSARWK CCTGGCCTYT
101- 150 GGGTGATGAC GCCATYGWCG GCCGATGCCT GTGTTYACAS WCGTTGTACA
151- 200 TAGGACCGCA AATATTAGCT ATCATACGGA AGATAGCCTA ATGCTTTGAG
201- 250 GGCATAGGYT GGGGTGKTKC WGTQMARAG CCCTTGCAAT TSCAGYTGAT
251- 300 SCTCACCAAY TTTTTTAACG ACCCAAATWG SAACGAARRC TCGGAARGGW
301- 350 TGSCTGAAAS CCTTGSTGTC ACAGAGTCCC AAACCWAATY WATMCAACTT
351- 400 TCASSGGSSG WKKTYWGGTY CMMAM

Stamm OH04

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 GAACGCACAT TGCGCTTTCG GGTTTTCCCG ATAGCATGCT TGCTGAGTG
51- 100 TCTGTGAACC CCACTCAGCA TTCTGTGGT CGGTCCAAA CTGATACAG
101- 150 GGATAGCTGG ACINTGGTGG TGTCCCGCCG AACCACGGTA GTGGATCTCC
151- 200 ACTTGAATGT GAAGGACAAC AGATNAATGG ACGTGTACC CTCTCAATGT
201- 250 TGGCTGCAAC AAACAAGTGT TCGCTACCA TGAGACCTAC GTCTATCTCC
251- 300 GGTAGCAACT TCGTTGTGT GAGGAGTGT GGGNINGGT TINNAANAA

Anhang

301- 350 GTTGANNGIN GTTCCAATNC CAACTINGGTG NAGGTACCGG ACGNGGANCT
351- 400 NGAACCTACA TCAGCGCTTT CCAATTCCAG ATCTCAGCTT AA

Stamm OH05

ITS1

....|....||....||....||....||....|
1- 50 CACCSAWCCA AGATCTTTCT TTTTGCGAAC AGGCCGCGCC CGGCAGCGAG
51- 100 CCGGTTGCTA AGAGTATCGA GGGCATTGCA GCATAGACGG AGCCTGGCCT
101- 150 CTGTGTGTGT TGCACGCCAT CGTCTCCGGC CGACTGCCTG TTGTTACACAG
151- 200 TCACAGTTGT GACAGTGAGG AACACGCAGA TCTTATGCTA TCATACGGAA
201- 250 GATAGCCTAA TGCTTTGAGG GCATAGGTTG GGGTGTGGC TGTCARACC
251- 300 CTTTGCCATT TGCCAGCTGA TGCTCAGCCG AACTTTTTTAC AACGAACCAG
301- 350 AATGGAAACG AAAACTTACG GAAAGGATGT GCTGTGAGAC AGCCTTGTC
351- 400 TGTTGAGCA GAACATCCCA AACCTAATCT AGTACAACTT TCAGCGGGAT
401- 450 GTCATGGGCC TYCC

ITS2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTTCC GATAGCATGC
51- 100 TTGTCGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGC ATTCGTGTGG TCGGTTCCAA
101- 150 ACNGATACAC GGGATAGCTG GACTATGGTG GTGTCCCGCC GAACCACGGT
151- 200 AGTGGATCTC CACTTGAATG TGAAGGACAA CAGATCAATG GACGTGTTA
201- 250 CCCINTCAAT GTTGGCTGCA ACAAACAAGT GTTGCCTAC CATGAGACC
251- 300 TACGTCATC TCCGGTAGCA ACTTCGTTGT TGTGAGGAGT TGTGG

Stamm OL01

SSU, 1. Fragment

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1- 50  GTGCAGGGGA TGCCCATCAT TTACTGIGAA AAAATTAGAG TGITCAAAGC
51- 100 AGGCTTATGC CGTTGAATAT ATTAGCATGG AATAATAAGA TAGGACCTTG
101- 150 GTACTATTTTT GTTGGTTTGC GCACCAAGGT AATGATTAAT AGGGACAGTT
151- 200 GGGGGTATTG GTATTCCATT GTCAGAGGTG AAATTCCTGG ATTTCTGGAA
201- 250 GACGAACTAC TGCGAAAGCA TTTACCAAGG ATGTTTTTCAT TAATCAAGAA
251- 300 CGAAAGTTAG GGGATCGAAG ATGATTAGAT ACCATCGTAG TCTTAACCAT
301- 350 AAACATATGCC GACAAGGGAT TGGCGGAGTC TCGTTTTTGC TCCGTCAGCA
351- 400 CCTTATGAGA AATCACAAGT CTTTGGGTTT CGGGGGGAGT ATGGTCGCAA
401- 450 GGCTGAAACT TAAAGAANTT GACGGAAGGG CACCACCAGG AGTGGAGCCT
451- 500 GCGGCTTAAT TTGACTCA
```

SSU, 2. Fragment

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1- 50  GGACGTGCAT TCTATTAGAT GCAGGAAGAT AGGGGCAATA ACAGGTCGTG
51- 100 GATGCCCTTA NATGTTCTGG GCCGCACGCG CGCTACACTG ATGCATTCAA
101- 150 CGAGTTTTTC CTGGCCGAG AGGCCTGGGC AATCTTTTGA ACGTGCATCG
151- 200 TGATAGGGAT AGATTATTGC AATTATTAAT CTGAACGAG GAATTCCTAG
201- 250 TAAACGCAGA TCATCGNICT GCATTGATTA CGTCCCTGCC CTTTGTACAC
251- 300 ACCGCCCGTC GCACCTACCG ATTGAATGGT CCGGTGAAGC CTCGGGATTG
301- 350 TGGTGAATTT CCTTCACTGG GAGTTCATTG CGAGAACTT
```

ITS1, 1. Fragment

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1- 50  ATCTTTCTTT TTGCGAACAG GCCGCGCCCG GCAGCGAGCC GGTGCTAAG
```

Anhang

51- 100 AGTATCGAGG GCATTGCAGC ATAGACGGAG CCTGGCCTCT GGTGTGTGNTG
101- 150 CACGCCATCG TCTCCGGCCG ACTGCCTGTT GTTCACAG

ITS1, 2. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 TTTGGCATTG GCCAGCTGAT GCTCAGCCGA ACTTTTTTACA ACGAACCAGA
51- 100 ATGGAACCGA AGAACTTACG GAAAGGATGT GCTGTGAGAC AGCCTTGTGC
101- 150 TGTTCCGAGCA GNACATCCCA AACCTAATCT AGTACAACCT TCAGCGGTG

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 AACGCACATT GCGCTTTCGG GTTTTCCCGA TAGCATGCTT GTCTGAGTGT
51- 100 CTGTGAACCC CACTCAGCAT TCTGTGTGGTC GGTTCCAAAC TGATACACGG
101- 150 GATAGCTGGA CTNTGGTGGT GTCCCGCCGA ACCACGGTAG TGGATCTCCA
151- 200 CTTGAATGTG AAGGACAACA GATCAATGGA CNGTGTTACC CTCTCAATGT
201- 250 TGGCTGCAAC AAACAAGTGT TGGCTACCA TGAGACCTAC GTCTATCTCC
251- 300 GGTAGCAACT TCGTTGTGTG GAGGAGNTGT GCGGATTGGT TTTCANAGNA
301- 350 GTTGGATGNT GTTINCAATAC CAACTTGGTG GAGGTAACCG ACGCTGTACA
351- 400 TGNACCTACA TCAGCGCTTT CCAATTCAG ATCTCAGCTT AA

Stamm OQ09

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GATAGCATGC
51- 100 TTGTCTGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGC GTTCTGTGAG CCAGTCCCAA
101- 150 ACAGGGGCAG ACGCATAGGA TAGCTGGATT ATGGTGGTGG CCAGTCGTAC

Anhang

151- 200 TGGCCCTCCA CTTGAATGAA CAGAACAGGA CGTGTGCCC TCTCGACTGT
201- 250 TGGCTGCAAT AGTACAAATG TTGCTGCTGC CACGAGACCT ACGTCTATCT
251- 300 CCGGTAGCAA CCTGGTGTG TGAGGAGTTG TGGCAATTGG TTTTGGCGCA
301- 350 GAGTGACATA CTGTTGGTAT GCTAACTTTG GAGATGGTAG CCATCGCTAT
351- 400 GTCATTACAT GCTAGTGTAT AGCGATTTCT AATTCCAGAT CTCAGCTTAA

Stamm OR02

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GGTAGCATGC
51- 100 TTGTCTGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGT GTTTAGTTGT TCGGGCTACA
101- 150 CGCTATGNGC TAGACCGAAG AAGTAGATAA CTGGACTTTG GTGGTGTCCC
151- 200 NCNGCAGGGA TCTCCACTTG AATCACAGTG AAAGAACAAG ATGTGTTGCC
201- 250 CTCTCAATGC TGGCTGCAAC AAAGCAAGTG TTGCGCTGCC ANGAGGCCTA
251- 300 CGTCTATCTC CCGTAGCAAC CTTGGTGTG TGAGGAGTTG TGGCGGTTGG
301- 350 TTATTGTGAC AGCGGGACTT TGATTTGGCT TGGCTTGCTT GTCTATACTA
351- 400 TATATGACAG TGA

Stamm OS02

SSU

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 TCAAAGATTA AGCCATGCAT GTCTAAGTAT AAATCTTTTA CTTTGAAACT
51- 100 GCGAACGGCT CATTATATCA GTTATAGTTT AATTGATAGT CCCTTTCTAC
101- 150 TCGGATAACT GTAGAAATTC TAGAGCTAAT ACGTGGCTCA AGACTCTTCT
151- 200 GGAGTCGTAT TTATTAGATT GAAACCAACC CCTTCGGGGT GATGTGGTGA

Anhang

201- 250 TTCATAATAA GTTTGCGGAT CGCATGCCTT TGGCGGCGAC GGATCAITCA
251- 300 AGTTTCTGCC CTATCAGCTT TGGATGATAA GGTATTGGCT TATCATGGCT
301- 350 TTAACGGGTA ACGGGAAATT AGGGTTTGAT TCCGGAGAGG GAGCCTGAGA
351- 400 GACGGCTACC ACATCCAAGG AAGGCAGCAG GCGCGTAAAT TACCCAATCC
401- 450 TGACACAGGG AGGTAGTGAC AATAAATAAG AATGCCGGGC CNCCGNAGGT
451- 500 CTGGCAATTC GAANCAGAAC AATTTANACC CCTTAT

ITS1

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTACCACAC CGATCCAAGA TCTTTCCACT ATGIGAATTC TGTACAGTTT
51- 100 AGGACATGTC TATATGGCAT GTGTTGACAA CTGTATCCAT TCCCCCAAC
101- 150 AACCAACACTT CTTTTTCATG AGAAATATGG TAACCTGAAA TGAACCAAAG
151- 200 NACCTGAAGC AAAGGGGTTT GTTCGGTGTG TCTGACATAG GTCTGTGAGG
201- 250 ACCAATTTAG ATCCACCCAT TCCCCATCTC CAAACTAATG GATACATTTA
251- 300 CAACTTTCAG CGGTGGATGT CTAGGTTCCC ACAACGATGA AGAACGCAGC
301- 350 GA

ITS2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATCAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGATTTTCC CGGTAGCATG
51- 100 CTTGTCTGAG TGTCTGTGGA TCCCTCTCAG CGTTGAGTTG TTGACTAGTT
101- 150 TTAGCAACAT TCTTCAGCTG GATTGCTTAT GGIGTTGTGC TCCTTTATTTG
151- 200 TTCGGCTCCA CTGGAATGCT GGTGTTGTAG TTTTCTACAC ATGGACATGA
201- 250 TATTGTCCCA TTGGACAAGG ATTGGGIGTT NGCGCAGCAA CATTTTGACT
251- 300 GTCACAAATC CTGTATGAT CTCTGGTAGC TTGTGTAGTT ACTTGGAGTT
301- 350 GTTTGAGCTA GGGATGTTGA TGG

Stamm OW01

ITS1

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 ATTACCACAC CGATCCAAGA TCTTTCITTTT TGCGAAGAGG CCGCGCCCAG

51- 100 CAGCGAGCTG GGTGCTAAGA GCTGGGATGA GGTGCTAGCA CGGAGTCTGC

101- 150 TCTGTGTCTT GTACGNCACT TCATCCNCTC CGGCCAACTG TTTGTGTGTT

151- 200 GAATGGTTTT GAACAGCATG ACAGAATCGA ATCCAGTGCT CTCAGGGCAT

201- 250 AGGTTGGAGC GTGNATTCAT GTTCTTGGCT TATTGACATG GACATGATCT

251- 300 AGCGCTCGAC CGAAACTTTC ACAANGAACC AGAATCGAAA TGAAGATCTG

301- 350 ACGAAAAAGG GTGTGGGTGA GTCAGTCTCG TAGTAACTAC GTGTCTGTTC

351- 400 GAGCAAACCA CCCGAAACCA ATCTAGTACA ACTTTCAGCG GTGGATGTCT

401- 450 AGGTTCCAC

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 AACGCACATT GCGCTTTCGG GTTTTCCCGG TAGCATGCIT GTCTGAGTGT

51- 100 CTGTGAACCC CACTCAGTGT TTAGTTGTTC GGGCTACACG CTATGCGCTA

101- 150 GACCGAAGAA GTAGATAACT GGACTTTGGT GGTGTCCNC NGCAGGGATC

151- 200 TCCACTTGAA TCACAGTGAA AGAACAGAT GTGTGCCCT CTCAATGCTG

201- 250 GCTGCAACAA AGCAAGTGT GCGCTGCCAN GAGGCCTACG TCTATCTCCG

251- 300 GTAGCAACCT TGGTGTGTG AGGAG

Stamm OW03

ITS1

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 CTTTCTTTTT GCGAACAGGC CGGCCCGCA GCGAGCCGGT TGCTAAGAGT

Anhang

51- 100 NTCGAGGGCA TTGCAGCATA GACGGAGCCT GGCTCTGTG TGIGTTGCAC
101- 150 GCCATCGTCT CCGGCCGACT GCCTGTGTGT CACAGTCACA GTTGTGACAG
151- 200 TGAGGAACAC GCAGATCTTA TGCTATCATA CGGAAGATAG CCTAATGCTT
201- 250 TGAGGGCATA GGTITGGGGTG TTGGCTGTCA AGAGCCCTTG GCAGAATGGN
251- 300 NACNAAGAAN TTTTCGAAAG CATNINCTGT GAGNCAGCNN TGIGCTGTTC
301- 350 GAGCAGGACA TCCCNINCCT AATCTAGTAC AACTTTTCAG

Stamm OW05

SSU, 1. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 GTTGTCTGTC AGGGGATGCC CATCATTTAC TGTGAAAAA TTAGAGTGTT
51- 100 CAAAGCAGGC TTATGCCGTT GAATATATTA GCATGGAATA ATAAGATAGG
101- 150 ACCTTGGTAC TATTTTGTG GTTTGCGCAC CAAGGTAATG AITTAATAGGG
151- 200 ACAGTTGGGG GTAITCGIAT TCCAITGTCA GAGGTGAAAT TCTTGGAITTC
201- 250 TGGAAGACGA ACTACTGCGA AAGCATTTAC CAAGGATGTT TTCATTAATC
251- 300 AAGAACGAAA GTTAGGGGAT CGAAGATGAT TAGATACCAT CGTAGTCTTA
301- 350 ACCATAAACT ATGCCGACAA GGGATTGGCG GAGTCTCGTT TTGTCTCCGT
351- 400 CAGCACCTTA TGAGAAATCA CAAGTCTTTG GGTTCGGGG GGAGTATGGT
401- 450 CGCAAGGCTG AAACTTAAAG AAATTGACGG AAGGGCACCA CCAGGAGTGG
451- 500 AGCCTGCGGC TTAATTTGAC TCAACACGGG AAAACTTACC AGGTCCAGAC
501- 550 ATAGTGAGGA TTGACAGATT G

SSU 2. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 TGATTTGTCT GGTTAATTCC GTTAAACGAAC GAGACCCCTG CCTGCTAAAT
51- 100 AGCTTGCCGA GTGAATTTTC ACTGGGTGAA GCTTCTTAGA GGGACGTGCA

Anhang

101- 150 TTCTATTAGA TGCAGGAAGA TAGGGGCAAT AACAGGICTG TGATGCCCTT
151- 200 AGATGTTCTG GGCCGCACGC GCGCTACACT GATGCATTCA ACGAGTTCTT
201- 250 CCTTGGCCGA GAGGCTGGG CAATCTTTTG AACGTGCATC GTGATAGGGA
251- 300 TAGATTATTG CAATTATTAA TCTTGAACGA GGAATTCTTA GTAAACGCAG
301- 350 ATCATCAATC TGCATTGATT ACGTCCCTGC CCTTTGTACA CACCGCCCGT
351- 400 CGCACCTACC GATTGAATGG TCCGGTGAAG CCTCGGGATT GTGGTGAATT
401- 450 TCCTTCACTG GGAGTTCATT GCGAGAACTT GTCTAAACCT TATCATTTAG
451- 500 AGGAAGGTGA AGTCGTAAACA AGGTTTCCGT AGGTGAACCT GCAGAAG

ITS1

....|....||....||....||....||....|
1- 50 CCGATCCAAG ATCTTTCTTT TTGCGAAGAG GCCGCGCCA GCAGCGAGCT
51- 100 GGTGCTAAG AGCTGGGATG AGGTGCTAGC ACGGAGTCAG CTCTGTGTCT
101- 150 TGTAGACACT TCATCCCTC CGGCCAACTG TTTGTTGTTC GAATGGTTTT
151- 200 GAACAGCATG ACAGAATCGA ATCCAGTGCT CCAGGGCATA GGTGGAGCG
201- 250 TGNATTCATG TTCTTGCTT ATTGACATGG ACATGATCTA GCGCTCGACC
251- 300 GAACTTTCA CAACGAACCA GAATCGAAAT GAAGACTGAC GAAAAAGGGT
301- 350 GTGGTGTGAG TCAGTCTCGT AGTAACTACG TGTCGTTCG AGCAAACCAC
351- 400 CCGAAACCNA ATCTAGTACA ACTTTCAG

ITS2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GGTAGCATGC
51- 100 TTGTCTGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGT GTTTAGTGTG TCGGGCTACA
101- 150 CGCTATGCGC TAGACCGAAG AAGTAGATAA CTGGACTTTG GTGGTGTCCC
151- 200 GCNGCAGGGA TCTCCACTTG AATCACAGTG AAAGAACAAG ATGTGTTGCC
201- 250 CTCTCAATGC TGGCTGCAAC AAAGCAAGTG TTGCGCTGCC ANGAGGCCTA

Anhang

251- 300 CGTCTATCTC CGGTAGCAAC CTTGGTGTG TGAGGAGTTG TGGCGGTGG
301- 350 TTATTTGINAC ANCGGGACGN TGNINITTATG TNAACTTTGA NGAGGTAACC
351- 400 NACGCNATG ATTTGATTTG ATTTGGCTTG GCTTGCCTGT CTATACTATA
401- 450 TATGACAGTG A

Stamm OW09

....|....||....||....||....||....|
1- 50 CCCGGCAGCG AGCCGGTTGN TAAGAGTATC GAGGGCATTG CAGCATAGAC
51- 100 GGAGCCTGGC CTCTGTGTGT GTTGCACGCC ATCGTCTCCG GCCGACTGCC
101- 150 TGTGTGTTAC AGNCACAGTT GTGACAGTGA GGAACACGCA GATCTTATGC
151- 200 TATCATAACG AAGATAGCCT AATGCTTTGA GGCATAGGT TGGGGTGTG
201- 250 GCTGTCAAAA GCCCTTTGGC CGAACTTTTC CAACGANCCA GAATGGAANC
251- 300 GAAGGACTTA CGGAAAGNAT NTGCTGTGAG ACAGCCTTGT GCTGTTCGAG
301- 350 CAGAACATCC CAAACCTAAT CTAGTACAAC TTTCAG

Stamm OW11

ITS1

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTACCACAC CGATCCAAGA TCTTTCTTTT TGCGAACAGG CCGCGCCCGG
51- 100 CAGCGAGCCG GTTGCTAAGA GTATCGAGGG CATTGCAGCA TAGACGGAGC
101- 150 CTGGCCTCTG TGTGTGTGTC ACGCCATCGT CTCCGGCCGA CTGCCTGTG
151- 200 TTCACAGTCA CAGTTGTGAC AGTGAGGAAC ACGCAGATCT TATGCTATCA
201- 250 TACGGAAGAT AGCCTAATGC TTTGAGGGCA TAGGTTGGGG TGTGTGGCTGT
251- 300 CAAGAGCCCT TTGGCATTTG CCAGCTGATG CTCAGCCGAA CTTTTTACAA

Anhang

301- 350 CGAACCAGAA TGGAAACGAA GAACTTACGG AAAGGATGTG CTGTGAGACA
351- 400 GCCTTGTGCT GTTCGAGCAG NACATCCCAA ACCTAATCTA GTACAACITTT
401- 450 CAGCGGTGGA TGTCTAG

Stamm SG01

....|....||....||....||....||....|
1- 50 GGTGPTTGCT CGCGTCGCCA TCCTTGGGTG GAACTGTGTG GGCATTAGGT
51- 100 TGTCTGTGAG GGGATGCCCA TCATTTACTG TGAAAAAATT AGAGTGTTC
101- 150 AAGCAGGCTT ATGCCGTTGA ATATATTAGC ATGGAATAAT AAGATAGGAC
151- 200 CTTGGTACTA TTTTGTGGT TTGCGCACCA AGGTAATGAT TAATAGGGAC
201- 250 AGTTGGGGT ATTCTGTTTC CATTGTGAGA GGTGAAATTC TTGGAITTCT
251- 300 GGAAGACGAA CTTACTGCGAA AGCATTTACC AAGGATGTTT TCATTAATCA
301- 350 AGAACGAAAG TTAGGGGATC GAAGATGATT AGATAACATC GTAGTCTTAA
351- 400 CCATAAACTA TGCCGACAAG GGATTGGCGG AGTTTCGTTT TGICTCCGTC
401- 450 AGCACCTTAT GAGAAATCAC AAGTCTTTGG GTTCCGGGGG GAGTATGGTC
451- 500 GCAAGGCTGA AACTTAAAGA AATTGACGGA AGGGCACCAC CAGGAGTGG
501- 550 GCCTGCGGCT TAATTTGACT CAACACGGGA AAACCTACCA GGTCCAGACA
551- 600 TAGTGAGGAT TGACAGATTG AGAGTCATGG GTGGTGGTGC ATGGCCGTTT
601- 650 TTTGTGGATG GAAAACCTAC CAGGTCCAGA CATAGTGAGG ATTGACAGAT
651- 700 TGAGAGTCTT TCTTGATTCT ATGGGTGGTG GTGCATGGCC GTTCTTAGTT
701- 750 GGTGGAGTGA TTTGTCTGGC AATTCCGTTA ACGAACGAGA CCCCTGCCCTG
751- 800 CTAAATAGCT TGCCGAGTGA ATTTTCACTG GGTGAAGCTT CTTAGAGGGA
801- 850 CGTGCATTCT ATTAGATGCA GGAAGATAGG GGCAATAACA GGICTGTGAT
851- 900 GCCCTTAGAT GTTCTGGGCC GCACGCGGC TACACTGATG CATTCAACGA
901- 950 GTTCTTCCTT GGCCGAGAGG CCTGGGCAAT CTTTTGAACG TGCATCGTGA

Anhang

951-1000 TAGGGATAGA TTATTGCAAT TATTAATCTT GAACGAGGAA TTCCTAGTAA
1001-1050 ACGCAGATCA TCAATCTGCA TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC
1051-1100 GCCCGTCGCA CCTACCGATT GAATGGTCCG GTGAAGCCTC GGGATTGTGG
1101-1150 TGAATTTCTT TTTACTGGGAG TTCATTGCGA GAACTTGICT AAACCTTATC
1151-1200 ATTTAGAGGA AGGTGAAGTC GTAACAAGGT TTCCGTAGGT GAACCTGCAG
1201-1250 AAG

ITS1

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTACCACAC CGATCCAAGA TCTTTCTTTT TCGCAATAGG CCGCGCCCAG
51- 100 CAGCGAGCTG GTTGCTAAGA GCTTGAATGG AGTCTAGCAC TGCATCTAGC
101- 150 ACGAGCACAA AAGCATCCGT GCCTTGTACC TCGTGACTGG TATCTAGTAC
151- 200 CTACTCTTCA TCCTCTCCGG CTACTATTTT GTTGTTCAAA TGGTTTTGAT
201- 250 CAACGCAATC CAGTGCTGT GAATAAGGCA TAGGTTGGAG TAAGAATGGT
251- 300 CGATATCTTA GATTATCTAA ATTATTTGAT CAGTCATGCT CTGCCGAAAC
301- 350 TTTCAACAAC AACCAGAATA GAAACTAAGA ACTTACGGAA AGGGTGTGCT
351- 400 GCGAGACAGT CGCGTACGAA TACTATAAGT ATTCTAGGT GAACTGGTTA
401- 450 AGCAGAACAC TCGAAACCTA ATCTAGTACA ACTTTCAGCG GTGGATGTCT
451- 500 AGGTTCCAC AA

ITS2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GATAGCATGC
51- 100 TTGTCTGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGC GTTCTGTGAG CCAGTCCCAA
101- 150 ACAGGGGCAG ACGCATAGGA TAGCTGGATT ATGGTGGTGG CCAGTCGTAC
151- 200 TGGCCCTCCA CTTGAATGAA CAGAACAGGA CGTGCTGCC TCTCGACTGT
201- 250 TGGCTGCAAT AGTACAAATG TTGCGCTGCC ACGAGACCTA CGTCTATCTC

Anhang

251- 300 CCGTAGCAAC CTGGTGTGTG GAGGAGTTGT GGCAATTGGT TTTGGCGCAG
301- 350 AGTGACATAC TGTTGGTATG CTAACTTTGG AGATGGTAGC CATCGCTATG
351- 400 TCATTACATG CTAGTGATTA GCGATTTCTA ATTCCAGATC TCAGCTTAA

Stamm SU01

SSU, 1. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 TCCTTGGGTG GAACCTGTGT GGCATTAGGT TGTCTGTGCG GGGATGCCCA
51- 100 TCATTTACTG TGAAAAAATT AGAGTGTTC AAGCAGGCTT ATGCCGTTGA
101- 150 ATATATTAGC ATGGAATAAT AAGATAGGAC CTTGGTACTA TTTTGTGGT
151- 200 TTGCGCACCA AGGTAATGAT TAATAGGGAC AGTTGGGGT ATTCTGATTC
201- 250 CATTGTGAGA GGTGAAATTC TTGGATTTCT GGAAGACGAA CFACTGCGAA
251- 300 AGCATTACC AAGGATGTTT TCATTAATCA AGAACGAAAG TTAGGGGATC
301- 350 GAAGATGATT AGATACCATC GTAGTCTTAA CCATAAACTA TGCCGACAAG
351- 400 GGATTGGCGG AGTTTCGTTT TGCTCCGTC AGCACCTTAT GAGAAATCAC
401- 450 AAGTCTTTGG GTTCCGGGGG GAGTATGGTC GCAAGGCTGA AACTTAAAGA
451- 500 AATTGACGGA AGGGCACCAC CAGGAGTGA GCCTGCGGCT TAATTTGACT
501- 550 CAACACGGGA AAACCTACCA GGTCCAGACA TAGTGAGGAT TGACAGATTG
551- 600 AGAGCTCTTTC

SSU, 2. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
1- 50 ATGCAGGAAG ATAGGGCAA TAACAGTCT GTGATGCCCT TAGATGTTCT
51- 100 GGGCCGACG CGCGCTACAC TGATGCATTC AACGAGTTCT TCCTTGGCCG
101- 150 AGAGCCCTGG GCAATCTTTT GAACGTGCAT CGTGATAGGG ATAGATTATT
151- 200 GCAATTATTA ATCTTGAACG AGGAATTCCT AGTAAACGCA GATCATCAAT

Anhang

201- 250 CTGCATTGAT TACGTCCTTG CCCTTTGTAC ACACCGCCCG TCGCACCTAC
251- 300 CGATTGAATG GTCCGGTGA GCTTCGGGAT TGTGGTGAAT TTCCTTTACT
301- 350 GGGAGTTCAT TGCGAGAACT TGTCTAAACC TTATCAITTA GAGGAAGGTG
351- 400 AAGTCGTAAC AAGGTTTCCG TAGGTGAACC TGCAGAAG

ITS2

....|....||....||....||....||....|
1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GATAGCATGC
51- 100 TTGTCTGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGC GTTCTGTGAG CCAGTCCCAA
101- 150 ACAGGGGCAG ACGCATAGGA TAGCTGGATT ATGGTGGTGG CCAGTCGTAC
151- 200 TGGCCCTCCA CTTGAATGAA CAGAACAGGA CGTCTGCC TCCTGACTGT
201- 250 TGGCTGCAAT AGTACAAATG TTGCGCTGCC ACGAGACCTA CGTCTATCTC
251- 300 CGGTAGCAAC CTGGTGTGT GAGGAGTGT GCCAAITGGT TTTGGCGCAG
301- 350 AGTGACANAC TGTGTGTATG CTAACTTTGG AGATGGTAGC CATCGCTATG
351- 400 TCATTACATG CTAGTGATTA GCGAITTCTA AITCCAGATC TCAGCTTAA

Stamm SU02

SSU

....|....||....||....||....||....|
1- 50 AACCTGGTIG ATCCTGCCAG TAGTCATACG CTGGICTCAA AGATTAAGCC
51- 100 ATGCATGTCT AAGTATAAAT CTTTTACTTT GAAACTGCGA ACGGCTCATT
101- 150 ATATCAGTTA TAGTTTATTT GATAGTCCCT TACTACTTGG ATAACCGTAG
151- 200 TAAITCTAGA GCTAATACAT GCGTCAATAC CCTTCTGGGG TAGTATTTAT
201- 250 TAGATTGAAA CCAACCCCTT CGGGGTGATG TGGTGATTCA TAATAAGCTT
251- 300 GCGGATCGCA TGGCTTTGCC GCGGATGGAT CATTCAAGTT TCTGCCCTAT
301- 350 CAGCTTTGGA TGGTAGGGTA TTGGCCTACC ATGGCTTTAA CGGGTAACGG

Anhang

351- 400 GAAATTAGGG TTTGATTCCG GAGAGGGAGC CTGAGAGACG GCTACCACAT
401- 450 CCAAGGAAGG CAGCAGGCGC GTAAATTACC CAATCCTGAC ACAGGGAGGT
451- 500 AGTGACAATA AATAACAATG CCGGGCCTTT GTAGGTCTGG CAATINGAAT
501- 550 GAGAACAATT TAAACCCCTT ATCGAGTATC AATTGGAGGG CAAGTCTGGT
551- 600 GCCAGCAGCC GCGGTAATTC CAGCTCCAAT AGCGTATATT AAAGTTGTGTG
601- 650 CAGTTAAAAA GCTCGTAGTT GGATTTGTGG CAGTCGCATG CGGCCCGGCA
651- 700 TTCGTGTCGG TGTTTTGCTCG CGTCGCCATC CTTGGGTGGA ACCTGTGTGG
701- 750 CATTAGGTTG TCGTGCAGGG GATGCCCATC AITTTACTGTG AAAAAATTAG
751- 800 AGTGTTCAAA GCAGGCTTAT GCCGTTGAAT ATATTAGCAT GGAATAATAA
801- 850 GATAGGACCT TGGTACTATT TTGTTGGTTT GCGCACCAAG GTAATGATTA
851- 900 ATAGGGACAG TTGGGGGTAT TCGTATTCCA TTGTGAGAGG TGAAATTCCT
901- 950 GGATTTCTGG AAGACGAACT ACTGCGAAAAG CATTTACCAA GGATGTTTTC
951-1000 ATTAATCAAG AACGAAAGTT AGGGGATCGA AGATGATTAG ATACCATCGT
1001-1050 ARTCTTAACC ATAAACTATG CCGACAAGGG ATTGGCGGAG TCTCGTTTTG
1051-1100 TCTCCGTCAG CACCTTATGA GAAATCACAA GTCTTTGGGT TCCGGGGGGA
1101-1150 GTATGGTCCG AAGGCTGAAA CTTAAAGAAA TTGACGGGAA GGCACCACCA
1151-1200 GGAGTGGAGC CTGCGGCTTA ATTTGACTCA ACACGGGAAA ACTTACCAGG
1201-1250 TCCAGACATA GTGAGGATTG ACAGATTGAG AGCTCTTTCT TGATTCTATG
1251-1300 GGTGGTGGTG CATGGCCGTT CTTAGTTGGT GGAGTGATTT GTCTGGTTAA
1301-1350 TTCCTTAACG AACGAGACCC CTGCCTGCTA AATAGCTTGC CGAGTGAATT
1351-1400 TTCACTGGGT GAAGCTTCTT AGAGGGACGT GCATTCTATT AGATGCAGGA
1401-1450 AGATAGGGGC AATAACAGGT CTGTGATGCC CTTAGATGTT CTGGGCCGCA
1451-1500 CGCGCGCTAC ACTGATGCAT TCAACGAGTT TTTCCTTGGC CGAGAGGCCT
1501-1550 GGGCAATCTT TTGAACGTGC ATCGTGATAG GGATAGATTA TTGCAATTAT
1551-1600 TAATCTTGAA CGAGGAATTC CTAGTAAACG CAGATCATCA ATCTGCATTG
1601-1650 ATTACGTCCC TGCCCTTTGT ACACACCGCC CGTCGCACCT ACCGATTGAA
1651-1700 TGGTCCGGTG AAGCCTCGGG ATTGTGGTGA ATTTCCCTCA CTGGGAGTTC
1701-1750 ATTGCAGAAA CTTGTCTAAA CCTTATCATT TAGAGGAAGG TGAAGTCGTA

Anhang

1751-1800 ACAAGGTTTC CGTAGGIGAA CCTGCAGAAG

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 TTGGCTGCAA CAAACAAGNG TTGNCGTINCC ATNANACCTA NGICTATCTC

51- 100 CGGTAGCAAN TTGGTTGTIN TNAGNAGITG TGGCGGTTGG TTTTNAANN

101- 150 ANTGNATGT NGTINCAANA CCAACTTGGT GGAGGTAACC GACNCTGTAC

151- 200 GTGNACCTAC ATCAGCGCTT TCCAATTCCA GATCTCAGCT TAA

Stamm SU03

SSU, 1. Fragment

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 CTCGCGTCGC CATCCTTGGG TGAACCTGT GTGGCATTAG GTTGTCTGTC

51- 100 AGGGGATGCC CATCATTTAC TGTGAAAAA TTAGAGTGT CAAAGCAGGC

101- 150 TTATGCCGTT GAATATATTA GCATGGAATA ATAAGATAGG ACCTTGGTAC

151- 200 TATTTTGTGTG GTTTGCGCAC CAAGGTAATG ATTAATAGGG ACAGTTGGGG

201- 250 GTATTCTGTAT TCCATTGTCA GAGGTGAAAT TCTTGGATTT CTGGAAGACG

251- 300 AACTACTGCG AAAGCATTTA CCAAGGATGT TTTCAITTAAT CAAGAACGAA

301- 350 AGTTAGGGGA TCGAAGATGA TTAGATACCA TCGTAGTCTT AACCATAAAC

351- 400 TATGCCGACA AGGGATTGGC GGAGTCTCGT TTTGTCTCCG TCAGCACCTT

401- 450 ATGAGAAATC ACAAGTCTTT GGGTTCGGG GGGAGTATGG TCGCAAGGCT

451- 500 GAAACTTAAA GAAATTGACG GAAGGGCACC ACCAGGAGTG GAGCCTGCGG

501- 550 CTTAATTTGA CTCAACACGG GAAAACCTAC CAGGTCCAGA CATAGTGAGG

551- 600 ATTGACAGAT TGAGAG

SSU, 2. Fragment

Anhang

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 TCTGTGATGC CCTTAGATGT TCTGGGCCGC ACGCGCGCTA CACTGATGCA
51- 100 TTCAACGAGT TTTTCCTTGG CCGAGAGGCC TGGGCAATCT TTTGAACGIG
101- 150 CATCGTGATA GGGATAGATT ATTGCAATTA TTAATCTTGA ACGAGGAATT
151- 200 CCTAGTAAAC GCAGATCATC AATCTGCATT GATTACGTCC CTGCCCTTTC
201- 250 TACACACCGC CCGTCGCACC TACCGATTGA ATGGTCCGGT GAAGCCTCGG
251- 300 GATTGTGGTG AATTTCTTTC ACTGGGAGTT CATTGCGAGA ACTTGTCTAA
301- 350 ACCTTATCAT TTAGAGGAAG GTGAAGTCGT AACAAAGTTT CCGTAGGIGA
351- 400 ACCTGCAGAA G

ITS2

.....|.....||.....||.....||.....||.....|

1- 50 ATTAAGATTT TGAACGCACA TTGCGCTTTC GGGTTTTCCC GGTAGCATGC
51- 100 TTGTC TGAGT GTCTGTGAAC CCCACTCAGT GTTTAGTTGT TCGGGCTACA
101- 150 CGCTATGCGC TAGACCGAAG AAGTAGATAA CTGGACTTTG GTGGTGTCCC
151- 200 GCCGCAGGGA TCTCCACTTG AATCACAGTG AAAGAACAAG ATGTGTTGCC
201- 250 CTCTCAATGC TGGCTGCAAC AAAGCAAGTG TTGCGCTGCC ACGAGGCCTA
251- 300 CGTCTATCTC CCGTAGCAAC CTTGGTGTG TGAGGAGTTG TGGCGGTTGG
301- 350 TTATTTGAC AGCGGGACGT TGTGCTATG TCAACTTTGA GGAGGTAACC
351- 400 GACGCTCATG ATTTGATTTG ATTTGGCTTG GCTTGCTTGT CTATACTATA
401- 450 TATGACAGTG A

Danksagungen

Während die vergangenen Kapitel dieser Arbeit, fachlich auf den Gegenstand der wissenschaftlichen Untersuchung bezogen, etwas darstellten, dass man während seiner „akademischen Laufbahn“ gelernt und geübt hat, muß ich feststellen, dass mir die Danksagungen gewisse Schwierigkeiten machen. Wie kann ich Leistungen wie den tollen Rückhalt von Seiten meiner Familie würdigen?

Wen muss ich in welcher Form einbeziehen, wenn ich mich für die wunderbare Zeit in Iffeldorf bedanken möchte?

Soll ich in einer endloslangen Liste alle, die auf die eine oder andere Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben, aufzählen, bis ich letztlich beim Bäcker Huber gelandet bin, der durch den Verkauf von leckerem Punschkrantz zu guter Stimmung und noch besserer Kohlenhydratversorgung des Doktoranden beitrug? Eine Liste, in der dann Personen wie Arnulf Melzer und Uta Raeder, deren großes Engagement in Hinblick auf die Finanzierung und die Betreuung diese Arbeit überhaupt erst ermöglichten, in der gute Freunde wie Tanja Beier, die stets ein offenes Ohr für fachliche und sonstige Probleme hatten, „gleichberechtigt“ neben oben genanntem Bäcker Huber stehen?

Soll ich eine wesentlich kürzere Liste verfassen, in der nur die „wichtigen“ Leistungen bzw. deren Träger bedacht werden – und was sind dann wichtige Leistungen? Wie wichtig sind dann anregende und manchmal auch kritische Anmerkungen von (ehemaligen) Kollegen wie Susi Schneider, Michael Bögle, Beate Mannschreck (um nur einige wenige zu nennen)? Sind dann auf dieser Liste Wissenschaftler wie Ursula Geissler, Linda Medlin oder Frederic Rimet, die durch „fachlichen Input“ mir mit der Arbeit direkt weitergeholfen haben, während Menschen wie Christina Dieminger oder Brigitte Beier, die keinen fachlichen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben, aber dafür sorgten, dass ich mich während der Zeit in Iffeldorf nur mit einem Mindestmaß an „Verwaltungskram“ und sonstigen Arbeiten beschäftigen musste, fehlen? Was für Worte werden der Einführung in Kulturtechniken und genetische Arbeitsmethoden durch Anke Behnke und Thomas Friedl gerecht?

Und was mache ich, um das Problem zu umgehen, dass ich irgendwen im Eifer des Listenschreibens hier übersehe, um mir dann zwei Wochen nach Veröffentlichung der Dissertation auf die Stirn zu klatschen und zu seufzen: „Jetzt hab' ich Hornochs' doch „meine“ vier Diplomanden vergessen“ (Silvia Czanderle, Martin Eberle, Katrin Loibl und Rene Bison – alle haben durch die Bearbeitung von Teilbereichen dieser Arbeit wichtige Beiträge geleistet)?

Klar ist jedenfalls: Diese Arbeit wäre ohne vielfältige Unterstützungen, die ich erfahren durfte, nicht möglich gewesen.

Da häufig die einfachsten Lösungen die besten sind, möchte ich jetzt zum Punkt kommen und ganz schlicht

Allen

die zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben
ein riesengroßes, von Herzen kommendes

Danke

sagen.