



„Genetische Untersuchung von Kieselalgen (*Bacillariophyta*) aus Sibirischen Seen
und Marker-Entwicklung für die Analyse von Umwelt-DNA“

Bachelorarbeit

Phillip Graaf

Erstgutachterin:

Prof. Dr. Ulrike Herzschuh

Alfred-Wegener-Institut für Polar-
und Meeresforschung, Potsdam

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Wolfgang Schuster

Institut für Biologie

Freie Universität Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Die Arbeit wurde zwischen dem 27.05.2016 und dem 01.08.2016 angefertigt. Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichere ich, dass ich sie selbst verfasst und keine unerlaubten Hilfsmittel verwendet habe. Ebenfalls versichere ich, dass es zu keinen Interessenkonflikten kam und die Arbeit nicht schon in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde.

Ort, Datum

Phillip Graaf

Matrikelnummer: 4783378

Danksagung

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe der Sektion Periglazialforschung des Alfred-Wegener-Instituts für die freundliche Unterstützung. Frau Ilona Schäpan war so freundlich, bei der Erstellung der rasterelektronen-mikroskopischen Aufnahmen zu helfen. Ich möchte Frau Prof. Dr. Ulrike Herzsuh (Alfred-Wegener-Institut Potsdam) danken, die sich bereit erklärte meine Arbeit als Erstprüferin zu betreuen und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schuster (Freie Universität Berlin), der die Zweitprüfung vornimmt. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kathleen Stoof-Leichsenring, die mir immer hilfeich mit Rat und Tat zur Seite stand, deren Freundlichkeit mich stets ermutigte und die nie die Geduld mit mir verlor.

Gliederung

1.	Einleitung.....	1
	1.1 Diatomeen.....	1
	1.2 DNA Barcoding und Metabarcoding.....	5
	1.3 Sedimentäre DNA.....	5
2.	Zielsetzung.....	5
3.	Material und Methoden.....	6
	3.1 Material.....	6
	3.1.1 Verwendete Chemikalien und Geräte.....	6
	3.1.1.1 Extraktionen.....	6
	3.1.1.2 PCR.....	6
	3.1.1.3 Gelelektrophorese.....	7
	3.1.1.4 Klonierung.....	7
	3.1.1.5 Slide-Vorbereitung für Rasterelektronenmikroskop.....	7
	3.1.2 Beprobungsgebiet.....	8
	3.1.3 Proben.....	9
	3.2 Methoden.....	12
	3.2.1 DNA-Extraktion.....	12
	3.2.2 Polymerasekettenreaktion PCR.....	12
	3.2.2.1 PCR Algenkulturen.....	16
	3.2.2.2 PCR Sedimentproben.....	17
	3.2.3 Agarosegelelektrophorese.....	17
	3.2.4 Klonierung und Reamplifikation der Klone.....	19

3.2.5	Sequenzierung nach Sanger.....	20
3.2.6	DNA Sequenzanalysen.....	20
3.2.7	Primerdesign.....	21
3.2.8	EcoPCR.....	22
3.2.9	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM).....	22
4.	Ergebnisse.....	23
4.1	Bestimmung der Diatomeenarten in Monokulturen.....	23
4.1.1	Genetisch.....	23
4.1.2	Morphologisch (Bilder, REM, LM)	25
4.2	Auswahl der neuen Primer.....	26
4.3	Testung der neuen Primer auf Sedimentärer DNA.....	29
4.4	Diversität der Diatomeenarten in Sedimentproben.....	30
4.5	Vergleich der unterschiedlichen Primer	32
4.5.1	Gegenüberstellung von Primer- und EcoPCR-Daten.....	32
4.5.2	Vergleich der Primer untereinander.....	33
5.	Auswertung, Interpretation, Diskussion.....	35
5.1	Genetische vs. Morphologische Analyse.....	36
5.2	Effektivität der verschiedenen Primer im Vergleich.....	37
5.3	Vergleich von Primern und EcoPCR.....	40
6.	Zusammenfassung.....	41
7.	Ausblick.....	41
8.	Quellen.....	43
9.	Anhang.....	47

1. Einleitung

1.1 Diatomeen

Diatomeen (*Bacillariophyta*) sind mikroskopisch kleine einzellige Eukaryoten. Sie bilden einen Teil des frei schwebenden ozeanischen Phytoplanktons und machen rund ein Drittel aller pflanzlichen Planktonarten aus (R. Ganßauge, 2001). Taxonomisch werden sie zu den Protisten gezählt (N.A. Campbell, J. B. Reece, 2009). Sie besitzen eine hartschalige Zellwand aus Silikat, die sie vor äußeren Einwirkungen wie Fressfeinden, Parasiten und Krankheitserregern schützt. Diatomeen kommen in allen Gewässern, im Erdboden und teilweise als Aeroplankton in der Luft vor. Sie besiedeln sowohl gemäßigte Gebiete, als auch den oberen und unteren Teil der arktischen und antarktischen Eisformationen (Van Baalen & O'Donnel, 1983; Aletsee & Jahnke 1992; Van der Vijver *et al.*, 2014). Mit ≥ 200.000 verschiedenen Arten (Mann & Droop 1996) gelten Diatomeen als eines der artenreichsten Taxa innerhalb der Eukaryoten (Mann & Vanormelingen, 2013). Viele Arten sind in der Lage extremen Umweltbedingungen wie z.B. Austrocknung bei Dürren standzuhalten, indem sie Dauerstadien bilden. Sie leben sowohl pelagisch als auch benthal und setzen sich an verschiedensten Substraten wie Sand, Steinen, Pflanzen und Tieren fest. Viele am Substrat lebende Arten besitzen sog. Raphen, aus denen sie ein Sekret absondern, durch dessen Hilfe sie sich mit einer Geschwindigkeit von bis zu $20 \mu\text{m/s}$ fortbewegen können (Kadareit *et al.*, 2014).

Morphologisch werden Diatomeen in zentrische (radialsymmetrische) und pennate (bilateral-symmetrische) Arten unterteilt (J. Zimmermann, 2014). Zentrische Diatomeen werden in der Klasse der *Coscinodiscophyceae* zusammengefasst (Round & R.M. Crawford, 1990). Die pennaten Arten unterteilen sich nochmals in araphide (*Fragilariophyceae*) (Round, 1991) und raphide Arten (*Bacillariophyceae*) (Haeckel, 1878). Sie besitzen zwei hartwandige Schalen, die sog. Valven; die Hypoalve (innere, kleine Valve) und die Epivalve (große Valve) passen wie Schuhkarton und Deckel ineinander. Beide Valven sind durch gut sichtbare Gürtelbänder miteinander verbunden. Die Valven weisen verschiedenste, komplexe Strukturen auf, die zwischen den einzelnen Taxa stark variieren. (Round *et al.*, 1990)

Da Diatomeen empfindlich auf Änderungen der äußeren Umwelteinflüsse reagieren, gelten sie seit Jahrzehnten als Indikatoren zur Bestimmung der Gewässerqualität (J. Zimmermann, 2014). Sie stellen ein Proxy für Umweltveränderungen dar, sowohl unter räumlichem als auch zeitlichem Aspekt und sind somit wichtige Zeigerorganismen für

ökologische und paläoökologische Studien. Da Diatomeen Bioindikatoren mit kurzen Generationszeiten sind, besitzen sie das Potential, nicht nur Langzeit- sondern auch Kurzzeitveränderungen der Umwelt aufzuzeigen. Die Zusammensetzung der Diatomeen-Taxa ist für jede Umwelt spezifisch. Vorkommen oder Abwesenheit einer Spezies sind eine direkte Reaktion auf Veränderungen der biologischen, chemischen und physikalischen Faktoren, welche die Umwelt beeinflussen; so können mittels verschiedener Diatomeen-Umweltparameter-Transferfunktionen Rekonstruktionen vergangener klimatologischer Gegebenheiten gefertigt werden (A.B. Diekmann & U. Herzsuh, 2005). Angesichts des Globalen Klimawandels bietet die weitere Forschung an Diatomeen eine Grundlage für Voraussagen über mögliche Veränderungen bezüglich Klima und Klimaparametern.

Diatomeen werden traditionell mit dem Lichtmikroskop untersucht, wobei durchschnittlich 300-500 Valven gezählt und mittels Fachliteratur taxonomisch bestimmt werden (M. Kahlert *et al.*, 2012). Die Ergebnisse dieser Analyse geben Auskunft über die Diversität der Diatomeen in einer Probe, wobei spezielles Fachwissen zur Detektion der verschiedenen Taxa notwendig ist. Neben morphologischen Untersuchungen kann die Diatomeen-Diversität auch mit Hilfe von DNA-Analysen an Umweltproben durchgeführt werden.

1.2 DNA Barcoding und Metabarcoding

DNA Barcoding ist eine etablierte Methode zur genetischen Identifikation einzelner Taxa anhand von DNA Sequenzen, sog. Markergenen, deren Region im Genom festgelegt und eindeutig identifizierbar ist (Ratnasingham & Hebert, 2007). DNA Barcoding stellt eine Alternative zur morphologischen Bestimmung dar (Herbert *et al.*, 2003) und findet z.B. bei der Untersuchung von Algenkulturen Verwendung. Beim Barcoding wird ein Individuum mit einem Taxon gleicher bzw. annähernd gleicher genetischer Sequenz in einer Referenzdatenbank verglichen und bei Übereinstimmung verbunden (Ratnasingham & Hebert 2007). So lassen sich laut Collins & Cruickshank (2013) in Verbindung mit der Sequenzierung nach Sanger sowohl eindeutige Aussagen bezüglich der Identifikation von Arten treffen, als auch neue Arten entdecken.

Beim Metabarcoding auf Umwelt-DNA werden gattungs- bzw. arttypische oder allgemeine Primer verwendet, um mehrere Taxa gleichzeitig zu identifizieren. Damit steht Metabarcoding in Kontrast zum DNA-Barcoding, das mithilfe spezifischer Primer nur einige ausgewählte Arten amplifiziert. Der Vorteil des Metabarcodings liegt sowohl in

der simultanen Amplifikation einer Vielzahl von Taxa aus Umweltproben, als auch in einer erweiterten Chance zur Entdeckung bisher unbekannter bzw. unerwarteter Taxa.

Die Methoden des Barcodings und des Metabarcodings unterscheiden sich somit in erster Linie in der Anzahl der simultan identifizierten Taxa. Metabarcoding vereinfacht die Findung bekannter bzw. neuer Arten, da aus verschiedensten Habitaten Umweltproben (z.B. Sediment-DNA) entnommen und untersucht werden können; es spiegelt die Diversität der vorhandenen Taxa sowohl qualitativ als auch quantitativ wider. Metabarcoding birgt somit ebenfalls eine Zeit- und Arbeitersparnis gegenüber dem DNA-Barcoding. Während beim DNA-Barcoding als limitierender Faktor vor allem die eingesetzten Datenbanken gelten, welche häufig noch nicht auf dem gewünschten Stand sind, ist die Methode des Metabarcodings vor allem durch die Qualität der eingesetzten Umwelt-DNA (eDNA) limitiert.

1.3 Sedimentäre DNA

Das Alfred-Wegener-Institut arbeitet sowohl mit rezenter, als auch mit fossiler DNA aus Sedimenten, die ein „ideales Klimaarchiv“ der kontinentalen Klima- und Umweltentwicklung der jüngeren Erdgeschichte darstellen (A.B. Diekmann & U. Herzschuh, 2005). Diese, sog. Umwelt-DNA oder eDNA wird durch die Auflösung toten Zellmaterials freigegeben. Die DNA hat anschließend drei mögliche Schicksale: Sie kann aufgrund ihrer Anfälligkeit für bakterielle und pilzliche Exonukleasen abgebaut werden, mittels natürlicher Transformation rekombinant in das Erbgut eines Organismus eingebaut werden, oder beispielsweise durch Bindung an Mineralien in der Umwelt fort dauern.

Die besondere Herausforderung bei der Arbeit mit Umwelt-DNA besteht darin, dass sie teils stark fragmentiert vorliegt, was es schwer macht sie zu rekonstruieren und zu amplifizieren (Pedersen *et al.*, 2014). Die DNA wird durch verschiedenste Umwelteinflüsse im Laufe der Jahre denaturiert und zerstört, so dass nur kurze Fragmente übrig bleiben. Je nach Substrat reicht die Degradationszeit der DNA von Tagen bis Wochen (Süß- und Salzwasser) bis hin zu mehreren hunderttausend Jahren (Grundeis). Als Folge dieser Denaturierungen ist eine Reamplifizierung mithilfe üblicher Primer größerer Fragmentlänge wie *rbcL* oder *18s* nicht mehr möglich. Die Länge der von diesen Primern erzeugten Fragmente ist zu groß, als dass die Primer an die fragmentierte DNA angreifen könnten.

In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Studien zum DNA barcoding für die Identifikation von Diatomeenarten durchgeführt, es wird jedoch nach wie vor diskutiert, welcher Marker geeignet ist. Verschiedenste barcoding Marker wurden bereits untersucht, darunter die große Untereinheit der *ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase* (rbcL), aus der 2012 der erste barcoding Marker für sedimentäre Diatomeen-DNA hervorging (K. Stoof-Leichsenring *et al.* 2012). Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt bei der Entwicklung von barcoding Markern ist die eingesetzte Referenzdatenbank, mit der die untersuchten Sequenzen verglichen werden. Die Taxonomische Einordnung der Sequenzdaten mithilfe öffentlich zugänglicher Datenbanken ist oft fraglich, da zum einen oftmals nicht genug Referenzen zur Verfügung stehen, zum anderen die vorliegenden Daten unbekanntem Ursprungs sind. Zudem sind derzeit relativ wenige genetische Referenzen von Diatomeen bekannt, die in sibirischen Seen vorkommen. Daher gilt es bestehende Datenbanken zu erweitern bzw. eigene Referenzdaten zu erstellen.

Morphologische und genetische Untersuchungen unterscheiden sich in der Findung der Taxa. Bei der morphologischen Bestimmung wird zumeist Fachliteratur und Expertenwissen als erste Quelle bei der Analyse eingesetzt, wohingegen genetische Analysen auf den Einsatz einer online erstellten Referenzdatenbank angewiesen sind. Bei der morphologischen Bestimmung können jedoch schon kleinste Fehler, beispielsweise bei der Betrachtung der Valvenform (River diatoms: a multiaccess key; Round *et al.*, 1990) und deren Ausstülpungen zu einer Fehlinterpretation und somit zur Fehlidentifikation der Taxa führen. Genetische Untersuchungen hingegen stützen sich auf die genetische Sequenz des Organismus und sind somit – wenn auch abhängig von der Referenzdatenbank – meist genauer. Beide Methoden können ergänzend Verwendung finden und als ganzheitliche Methode fungieren.

Es existieren verschiedene, für Diatomeen geeignete Primer, jedoch erst einer, der für sedimentäre, fragmentierte DNA effizient anwendbar ist. Dies ist der von Dr. Kathleen Stoof-Leichsenring 2012 entwickelte rbcL-Primer rbcL 512/808. Die weitere Auswahl der in der vorliegenden Studie verwendeten Primer orientierte sich an verschiedener Literatur (s. Tab.2). Die Diatomeenprimer, die auf Umwelt-DNA angewendet wurden waren rbcL (Stoof-Leichsenring *et al.*, 2012), P026 (Bowler, Taberlet), V4 (Stoeck *et al.*, 2010) und V9 (Amaral-Zettler *et al.*, 2009). Die Primer wurden unter der Annahme getestet, dass Chloroplasten-Marker (rbcL) auf Umweltproben effektiver für die Identi-

fikation von Diatomeen sind als ribosomale Marker nukleärer DNA (P026, V4, V9), da die Amplifikation nicht pflanzlicher Organismen ausscheidet.

2. Zielsetzung

Bei der Planung dieser Studie ergaben sich verschiedene Fragen die sich wie folgt gliederten:

1. Welche Diatomeenarten aus dem großen Chabyda See befinden sich in den von uns angesetzten Monokulturen?
2. Lässt sich ein weiterer Primer entwickeln, der für sedimentäre Diatomeen-DNA geeignet ist?
3. Wird der Primer den Anforderungen bezüglich Spezifität und Diversitätserkennung gerecht?
4. Wie groß ist die Diversität der Diatomeenarten in den vorliegenden Sedimentproben?

Für die vorliegende Studie wurden folgende Ziele bestimmt:

1. Beitrag zur Erstellung einer Referenzdatenbank für Diatomeen aus dem großen Chabyda See
2. Entwicklung eines neuen Primers für sedimentäre Diatomeen-DNA mit dem Ziel einer möglichst hohen Spezifitäts- und Diversitätsrate

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

3.1.1.1 Extraktionen

DNeasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen
FastPrep [®] -24	MP Biomedicals
Impact resistant tubes	Starlab
Zentrifuge	Thermo Scientific/Sigma

3.1.1.2 PCR

H ₂ O (DEPC behandelt)	VWR
Sigma Puffer	Sigma
HiFi Puffer	Life Technologies
BSA (20mg/ml)	Life Technologies
MgSO ₄ (50mM)	Invitrogen
dNTPs	Qiagen
F-Primer (10 μ M)	IDT
R-Primer (10 μ M)	IDT
Sigma Taq Polymerase	Sigma
HiFi Taq Polymerase (5U/ μ l)	Life Technologies
Qiagen Kit	Qiagen
Sprout Minizentrifuge	Biozym
Vortex-Genie [®] 2	MO Bio Laboratories, Inc.
Goße Zentrifuge für Wells	Sigma
icycler	BioRad
TC-Plus Cyclers	Techne/Biostep [®] GmbH
Professional Thermocycler	Biometra (Jena)
DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	Biosan
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Biozym
Handschuhe – lila Nitril	Kimtech

3.1.1.3 Gelelektrophorese

10x/50x TAE Puffer 500ml	AppliChem/Penreac
GelRed, DNA Stain G	Serva
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific
Agarose NEEO ultra Qualität, 1kg Roti®Garose	ROTH
Waage	Sartorius
Mikrowelle	Severin
Elektrophoresekammern Sub-Cell®Modell 96 u. 192	Biorad
Transilluminator	UVP
Kamera	Nikon

3.1.1.4 Klonierung

Sterilbank, HeraSafe	Fisher Scientific
TOPO® TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen
MicroPulser™	BioRad
GenePulser®Küvetten 0,1 cm	BioRad
Electrocomp cells	Invitrogen
SOC culture medium	Invitrogen
Agarose	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Inkubator	Binder
Gefrierschrank	Fryka Kältetechnik

3.1.1.5 Slide-Vorbereitung für Rasterelektronenmikroskop:

Zentrifuge	Sigma
Wasserbad	GFL
Objektträger	Carl Roth
Deckgläser	Th. Geyer

3.1.2 Beprobungsgebiet

Das in dieser Studie beprobte Gebiet liegt im sibirischen Jakutien (Russland), westlich der Stadt Jakutsk. Die Region befindet sich zur Hälfte hinter dem Polarkreis und ist eine der kältesten der Welt (S. Iuncker, 2013) mit einer jährlichen Temperaturschwankung von etwa 60-70°C zwischen Sommer und Winter.

Jakutien, das in der Republik Sacha liegt, ist etwa 72% von Taiga bedeckt. Den Rest der Republik bestimmen Waldtundra, Tundra und arktische Wüste. Matveev zufolge wird das Klima in Zentral-Jakutien vor allem durch Zyklone und Antizyklone bestimmt, wodurch die Niederschlagsrate - gerade in den Wintermonaten - relativ gering ist und somit vergleichsweise wenig Schnee fällt (Matveev, 1989). Der jährliche Niederschlag beträgt zwischen 200-300 mm. Die Region Jakutien ist geprägt durch den Permafrost. Aufgrund der niedrigen, winterlichen Schneedecke, kann der Permafrostboden bis zu mehrere 100 Meter tief frieren und taut in den wärmeren Sommermonaten nur etwa 0,5-2 m auf. Die vorherrschende Vegetation des sibirischen Waldes setzt sich vor allem aus Lärchen (*Larix dahurica*), Kiefern (*Pinus sylvestris*) und Birken (*Betula pendula*) zusammen (Kaitaniemi und Lintunen, 2010). Sie ist für diese Region typisch und von größter globaler und ökologischer Bedeutung (Shepashenko, Shvidenko, Nilsson, 1998).

Der klimatischen und biowissenschaftlichen Forschung in der Arktis ist aus mehreren Gründen eine besondere Bedeutung zuzumessen.

Die Permafrostregion reagiert sensibel auf kleinste klimatische Veränderungen. Dies wird deutlich, durch das seit Jahrzehnten beobachtete und als „*shrubification*“ bezeichnete Phänomen der Verschiebung der Vegetationsgrenze nach Norden (Frost und Epstein, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

Die zunehmende Vertiefung des in den Sommermonaten aufgetauten Bereichs und die Verschiebung der Südgrenze der Permafrostregion nach Norden gelten als mögliche Kippunkte des Klimasystems. Sie können durch Freisetzung von im Permafrost gespeichertem Methan (CH₄) und Kohlendioxyd (CO₂) einen irreversiblen Rückkopplungseffekt darstellen und so die regionale und globale Erwärmung weiter beschleunigen. Die Kenntnis über die Prozesse im Permafrostboden lässt Rückschlüsse auf klimatische Veränderungen zu und dient als Grundlage für Prognosen bezüglich zukünftiger Veränderungen.

Die Analyse von Kieselalgen im Sediment ist - mit Blick auf die globale Erwärmung -

als Klimaindikator zu verstehen, da sie Aufschluss darüber gibt, wie sich rezente und vergangene Biozönosen in Abhängigkeit von den jeweiligen klimatischen Bedingungen entwickeln bzw. entwickelt haben.

Die in dieser Studie verwendeten Proben stammen aus einem der zahlreichen Seen in der Sacha Region, dem großen Chabyda See (большая Чабыда; 61°58'32.36"N; 129°22'49.53"E) (Abb. 1-3). Er liegt etwa 20 km südwestlich von Jakutsk im Einzugsgebiet des Flusses Lena und ist den größten Teil des Jahres komplett zugefroren. Der See befindet sich etwa 290 Meter über dem Meeresspiegel und hat eine Oberfläche von ca. 2,1 km². Seine durchschnittliche Tiefe beträgt 0,5 m, der tiefste Punkt 2 m. Der im Sommer 2005 gemessene pH-Wert betrug 7,58 (Pestryakova *et al.*, 2012). Innerhalb des Einzugsgebiets des Sees findet sich keine direkte Einwirkung durch den Menschen.

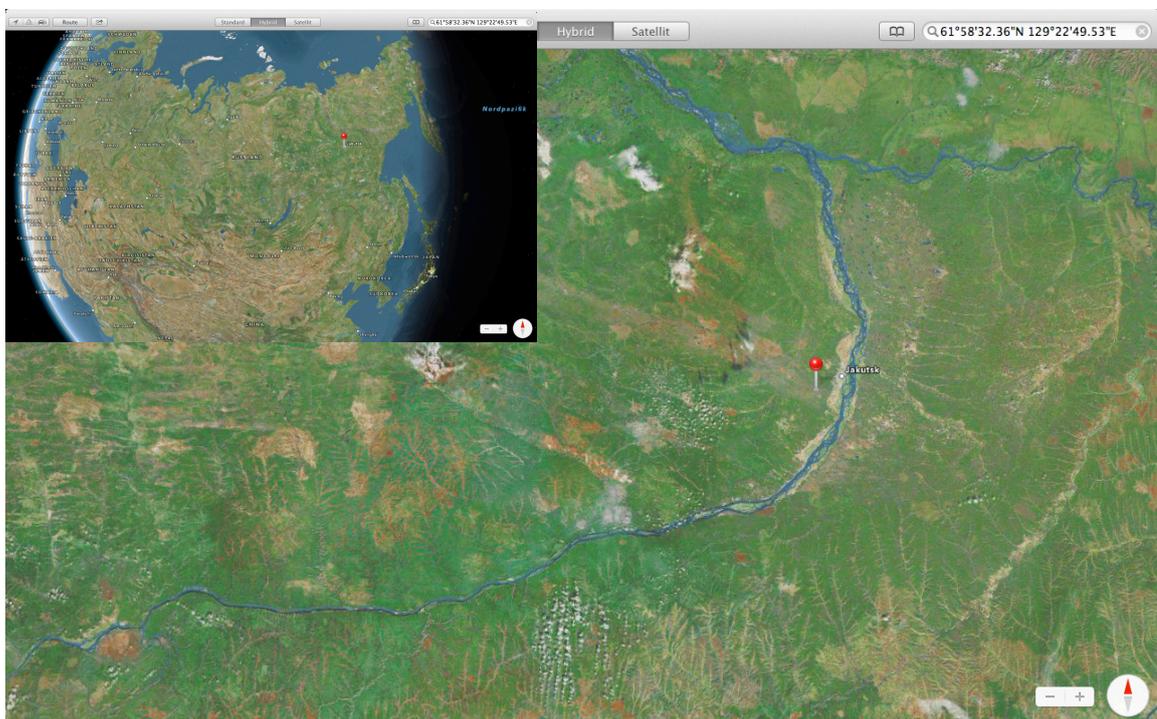


Abb. 1: Region des Beprobungsgebietes im Einzugsgebiet des Flusses Lena

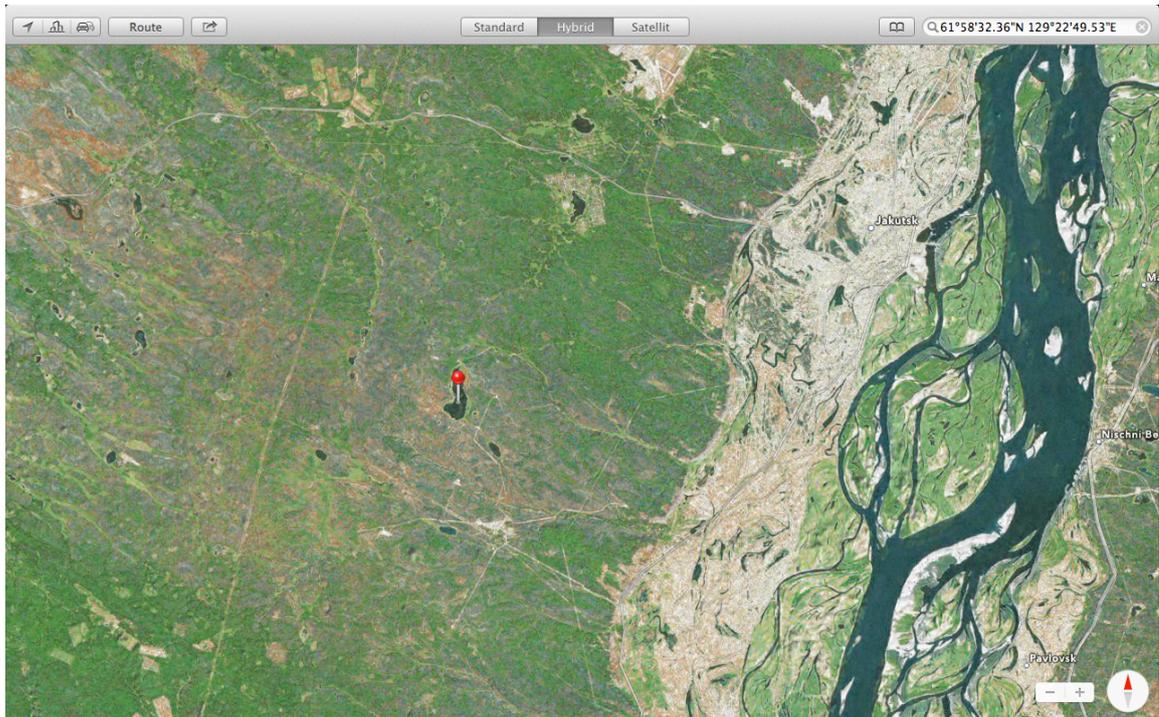


Abb. 2: Großer Chabyda See, westlich der Stadt Jakutsk

3.1.3. Proben

Die hier verwendeten Proben wurden von zwei Studentinnen aus Jakutien mitgebracht und vom Alfred-Wegener-Institut für diese Studie bereitgestellt. Es handelt sich um Proben aus Oberflächen-Sedimenten, aus dem Wasser-Sediment-Übergang und aus Eis (Tab. 1). Aus diesen Proben waren Algenkulturen (Monokulturen) angesetzt worden, welche vom Alfred-Wegener-Institut für diese Arbeit bereitgestellt wurden. 9 der 10 in dieser Studie verwendeten Proben werden diesen Algenkulturen zugeordnet. Die Diatomeen wurden in WC-Medium - einem Standard-Kultivierungsmedium für Diatomeen - kultiviert und im Abstand von einigen Wochen neu angesetzt, d.h. einzelne Diatomeen wurden aus den Proben extrahiert und in neue Wells gesetzt, in denen sie weiter kultiviert wurden. So sollten sich mit der Zeit Monokulturen bilden, die es mit biochemischen/biotechnologischen Methoden zu analysieren galt. Die letzte der 10 Proben war der sedimentären DNA zugeordnet.

Tab. 1: Proben aus dem Großen Chabyda See

Nummer	Originalprobe	Habitat	Probentyp	Extraktion	Plattenummer
1	15-BCH-01 1 cm/15-BCH	Oberflächen- Sediment, Wasser- Sediment- Übergang	Algenkultur in WC Medium	EPG001	33.C1
2	15-BCH-01 1 cm/15-BCH	Oberflächen- Sediment, Wasser- Sediment- Übergang	Algenkultur in WC Medium	EPG002	33.G3
3	15-BCH-01 1 cm/15-BCH	Oberflächen- Sediment, Wasser- Sediment- Übergang	Algenkultur in WC Medium	EPG008	33.E9
4	15-BCH-01 1 cm/15-BCH	Oberflächen- Sediment, Wasser- Sediment- Übergang	Algenkultur in WC Medium	EPG009	33.F9
5	15-BCH-01 1 cm/15-BCH	Oberflächen- Sediment, Wasser- Sediment- Übergang	Algenkultur in WC Medium	EPD090	45.B3
6	15-BCH-2 ice	Eis	Algenkultur in WC Medium	EPD094	46.A1
7	15-BCH-1 1 cm	Oberflächen- Sediment	Algenkultur in WC Medium	EPD096	46.C1
8	15-BCH-2 ice	Eis	Algenkultur in WC Medium	EPD098	46.A3
9	15-BCH-1 1 cm	Oberflächen- Sediment	Algenkultur in WC Medium	EPD099	46.B3
10	15-BCH	Oberflächen- Sediment	Sedimentprobe	EPD010	/

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Extraktion

Um DNA von Organismen untersuchen zu können, muss diese zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Bei der DNA-Extraktion werden Zellen von Organismen mit verschiedenen Methoden aufgeschlossen um die DNA freizugeben. Bei Sedimentproben beginnt das Verfahren nach dem Dneasy® Plant Mini Kit von Qiagen mit dem Aufbrechen der Zellen in einem dafür geeigneten Schüttler (FastPrep) für 50 Sekunden. (Der Probe werden kleine Stahlkügelchen beigefügt, die die Zellen beim Schütteln zerplatzen lassen, so dass die DNA freigegeben wird.) Hinzugegeben werden 400 μ l eines Lyse-puffers. Die Lösung wird mit 4 μ l Rnase versetzt, gevortext und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend werden 130 μ l P3 Puffer hinzugegeben und die Lösung wird 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach weiteren Zentrifugierschritten wird die Lösung mithilfe von Tubes, die eine kleine Silika-Säule besitzen, mehrmals gewaschen und anschließend nochmals zentrifugiert. Die DNA bindet dabei an die Silika-Säule und wird anschließend unter Zugabe von 60 μ l AE Puffer eluiert, so dass sie nun getrennt von den anderen Bestandteilen der Lösung vorliegt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Lösung erneut 1 Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Zusätzlich zu der durchgeführten Extraktion konnte auf bereits extrahierte Algen- und Sediment-Extrakte zurückgegriffen werden.

3.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die im Extrakt vorhandene DNA stammt von den verschiedensten Organismen. Um die jeweiligen geringen Mengen an DNA zu amplifizieren, wird die Polymerasekettenreaktion verwendet. Hierbei werden Primer genutzt, die an gesonderte Stellen der DNA bestimmter Organismen binden und so einen spezifischen Bereich der Nukleinsäuren vervielfältigen. Eine PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt, der die DNA über eine festgelegte Anzahl von Zyklen abwechselnd erhitzt und abkühlt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt in drei Phasen: Denaturierung, Annealing und Elongation.

Zunächst wird die DNA bei starker Erhitzung denaturiert (>90°C); hierbei trennen sich die beiden Stränge der Doppelhelix voneinander. Im nächsten Schritt binden spezifische Primer an die einzelsträngige DNA. Hierbei wird die Reaktion auf 40-60°C abgekühlt (Annealing Temperatur). Die Primer stellen den Ansatzpunkt für das Enzym Polymerase dar. Die Polymerase baut nach und nach freie Desoxinukleosidtriphosphate

(dNTPs) ein und synthetisiert so den komplementären, neuen DNA-Strang (68-75°C). Dieser Prozess wird etwa 35 mal wiederholt (mind. 50 mal bei eDNA).

Die in dieser Studie verwendeten Primer (Tab. 2) waren die, in Regionen des Chloroplastengenoms bindenden Primer *rbcL* (Guo *et al.* 2015), *UPA* (Guo *et al.* 2015), *psbC* (Alverson *et al.* 2007), und *16s* (Iwatani *et al.* 2005), die beiden, in der Cytochrom-C-Oxidase-Region des mitochondrialen Genoms bindenden Marker *COI* (Guo *et al.* 2015) und *Cox* (Iwatani *et al.* 2005), und die, aus ribosomalen Genen des Kerngenoms stammenden Primer *ITS* (Guo *et al.* 2015), *18s* (Guo *et al.* 2015), *P026* (Bowler & Taberlet), *V9* (Amaral-Zettler *et al.* 2009), *V4* (Stoeck *et al.* 2010) sowie der Marker *D512/D978*, der ebenfalls eine Primersequenz für *18s* Amplifikate darstellt (Zimmermann *et al.*, 2011).

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Primer

Name	Sequenz	Primerlänge	Fragmentlänge (bp)	Annealing Temperatur	Referenz	Genom	Material	Polymerase	Anzahl Referenzen
Diat_rbcL-F	ATGTCCTCAATCTGTAWCAGAAGC GACTC	28	669	59	Guo et al. 2015	Chloroplastengenom	Algenkulturen	QIAGEN	3534
Diat_rbcL-R	TAARAAWKYTCTCTCCAAGCA	23	669	59	Guo et al. 2015	Chloroplastengenom	Algenkulturen	QIAGEN	3534
Diat_UPA-F*	GGACAGAAAGACCCCTATGAA	20	374	58	Guo et al. 2015	Chloroplastengenom	Algenkulturen	QIAGEN	81
Diat_UPA-R*	TGAGTGACGGCTTTCCACT	26	374	58	Guo et al. 2015	Chloroplastengenom	Algenkulturen	QIAGEN	81
Diat_psbC_F -a	CACGACCWGAATGCCACCAAT(G ?)	23	1252	53	Alverson et al. 2007	Chloroplastengenom	Algenkulturen	QIAGEN	548
Diat_psbC_R -b	ACAGGTTYGCTTGGTGAGTG G	24	1252	53	Alverson et al. 2007	Chloroplastengenom	Algenkulturen	QIAGEN	548
Diat_16sF	CCATATGCTTTCGAGTAAAT	21	452-460	51	Iwatani et al. 2005	ribosom. Chloropl. Genom	Algenkulturen	QIAGEN	1418
Diat_16sR	CTACTACTAGTCTAATAGTTT C	26	452-460	51	Iwatani et al. 2005	ribosom. Chloropl. Genom	Algenkulturen	QIAGEN	1418
Diat_CoxF	ATGATTTTTTATGGTGATGCC	23	563	51	Iwatani et al. 2005	Mitochondriell	Algenkulturen	QIAGEN	231
Diat_CoxR	CCAAACCAGGTAAATTAATAAT	23	563	51	Iwatani et al. 2005	Mitochondriell	Algenkulturen	QIAGEN	231
Diat_COI-F	ATGATHGGDCCWGGAYATG	17	422	57	Guo et al. 2015	Mitochondriell	Algenkulturen	QIAGEN	231
Diat_COI-R	CCWCCHCGDGGRTC	20	422	57	Guo et al. 2015	Mitochondriell	Algenkulturen	QIAGEN	231
Diat_ITS-F	CSMACAACGATGAAGRRRCAG C	23	527	58	Guo et al. 2015	Kerngenom	Algenkulturen	QIAGEN	146513
Diat_ITS-R	TCCDSTTCRBTCCGCVTTACT	22	527	58	Guo et al. 2015	Kerngenom	Algenkulturen	QIAGEN	146513
Diat_18S-F	TCYAAGGAAGGACGAGGCGC	21	709-730	59	Guo et al. 2015	Kerngenom	Algenkulturen	QIAGEN	5641
Diat_18S-R	GTTTCAGHCTTCCGACCATACTC C	24	709-730	59	Guo et al. 2015	Kerngenom	Algenkulturen	QIAGEN	5641
Diat_P026_F	TCCAGCTCCAATAGCGTA	20	146-196	51	Bowler, Taberlet (mündliche Kommunikation)	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641
Diat_P026_R	AACACTCTAATTTTTTACAGTA	20	146-196	51	Bowler, Taberlet (mündliche Kommunikation)	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641
Diat_V9_1380F	CCCTGCCHTTTGTACACAC	18	172-174	57	Amaral Zettler et al. 2009	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641
Diat_V9_1510R	CCITCYGCAGTTTACCTAC	18	172-174	57	Amaral Zettler et al. 2009	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641
Diat_V4_F	CCAGCASCYGGGTAATCC	20	396-425	64	Stoeck et al. 2010	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641
Diat_V4_R	ACTTTCGTTCTTGATYRA	18	396-425	49	Stoeck et al. 2010	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641
D512for	ATTCCAGCTCCAATAGCG	18	429-440	50-52	/	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641
D978rev	GACTACGATGGTATCTAATC	20	429-440	50-52	/	Kerngenom	Sedimente	Hifi	5641

Tab. 2.2: Liste der neu entwickelten Primer

Name	Sequenz	Primerlänge	Fragmentlänge (bp)	Annealing Temperatur	Referenz	Genom	Material	Polymerase	Anzahl Referenzen
Diat_16sF_new_1	CACTGGAAGTGGACACGGT	20	216-217	59,61	eigene Studie	ribosom. Chloropl. Genom	/	/	1418
Diat_16sR_new_2	ACACTTGCATCCYCCGTTMT	20	216-217	59,31	eigene Studie	ribosom. Chloropl. Genom	/	/	1418
Diat_UPA-F*_new	ABTTGGCAGBATAGGTGGR	20	153	58,03	eigene Studie	Chloroplastengenom	/	/	81
Diat_UPA-R*_new	GACCGCCCCAGTCAAAC	17	153	57,88	eigene Studie	Chloroplastengenom	/	/	81
Diat_psbC_F_new	TGCGTYTCTGGGATCTACGK	20	169	59,83	eigene Studie	Chloroplastengenom	Sedimente	Hifi	548
Diat_psbC_R_new	GTTGCTACACCACCACCCYACWGA	20	169	59,89	eigene Studie	Chloroplastengenom	Sedimente	Hifi	548
Diat_UPA_f_2_new	TTGGCCAGBATAGGTGGGAG	20	185	59,59	eigene Studie	Chloroplastengenom	/	/	81
Diat_UPA_r_2_new	AACCTTTGTRCGCCTCCGTT	20	185	59,89	eigene Studie	Chloroplastengenom	/	/	81
Diat_psbC_F_new_2	CCCATTCTCGGTTATGAYTGGM	23	225	60	eigene Studie	Chloroplastengenom	Sedimente	Hifi	548
Diat_psbC_R_new_2	CCAAATGGWGAACCGAAHAYR	21	225	60,27	eigene Studie	Chloroplastengenom	Sedimente	Hifi	548

3.2.2.1. PCR Algenkulturen

Die meisten der, in dieser Studie durchgeführten PCR's wurden mit dem Qiagen Taq-PCR-Mastermix-Kit durchgeführt. Es beinhaltet Wasser, sowie den Mastermix, der bereits alle notwendigen Bestandteile einer PCR wie beispielsweise dNTPs, Puffer und die (Taq)-Polymerase vereint, mit Ausnahme der Primer und der DNA. Tabelle 3 zeigt den Ablauf eines typischen PCR Programms: Denaturierung bei 94°C für 5 Minuten. Anschließend folgen 35 Zyklen mit jeweils 94°C (30 Sekunden Denaturierung), 52°C (30 Sekunden Annealing) und 72°C (60 Sekunden Elongation). Der Letzte Schritt der PCR wird mit 10 Minuten bei 72°C abgeschlossen. Anschließend wird der Ansatz bei 15°C so lange „gelagert“, bis er für weiterführende Tests entnommen bzw. eingefroren wird. Für die PCR mit dem Qiagen Kit wurde zunächst ein weiterer Mastermix pro Primerpaar angesetzt; die entsprechenden Mengen an Wasser, Mastermix und Primern (ohne DNA) wurden hierfür zusammenpipettiert. Die Menge der eingesetzten Chemikalien richtete sich nach der zu untersuchenden Probenanzahl. Hierbei wurden die Chemikalien angeschnippt und kurz runterzentrifugiert. Anschließend wurde der neue Mastermix auf Stripes verteilt. Zumeist wurden Ansätze mit 13 beziehungsweise 23 μl Mastermix angesetzt, um ein Gesamtvolumen von 15 μl beziehungsweise 25 μl mit DNA zu erhalten. Die DNA wurde unter einer UV-Hood zum Ansatz hinzupipettiert. Hierbei war darauf zu achten, nach jeder einzelnen Probe den Handschuh, der die Eppis berührt hatte, zu wechseln, um eine Kontamination der nächsten Probe mit der DNA der vorherigen zu verhindern. Die PCR wurde in einem icycler der Firma Biorad angesetzt (Tab. 3).

Tab. 3: Beispiel eines PCR Protokolls mit Qiagen-Kit

		Cycler	Programm
Temperatur °C	Zeit	Biorad	Clon52
94	5 Min		
94	30 Sek		
52	30 Sek	35 Zyklen	
72	60 Sek		
72	10 Min		
15	∞		

3.2.2.2. PCR Sediment-Proben

Eine PCR mit Hifi-Polymerase verläuft prinzipiell wie eine PCR mit dem Qiagen-Kit. Im Unterschied dazu befinden sich die eingesetzten Chemikalien nicht in einem Mastermix, und das PCR-Protokoll weicht geringfügig ab (Tab. 4). Die Sedimentäre DNA liegt in einer geringen Ausgangskonzentration vor. Deshalb werden beim Hifi-Ansatz die Zyklen um 15 auf 50 Zyklen erhöht, um eine ausreichende Amplifizierung der kurzen, fragmentierten Sediment-DNA zu gewährleisten.

Tab. 4: PCR-Protokoll eines Hifi-Ansatzes

Master Mix	1x	4
H₂O	7,35	29,4
10x	1,5	6
dNTPs (2,5 mM)	1,5	6
BSA (20mg/ml)	0,75	3
MgSO (50mM)	0,75	3
Primer For	0,5	2
Primer Rev	0,5	2
HiFi (5U/μl)	0,15	0,6
<i>Total</i>	<i>13</i>	
+ DNA	2	

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Visualisierung der amplifizierten DNA. Die PCR-Produkte werden in Taschen eines zuvor gegossenen Agarose-Gels pipettiert und wandern nach Anlegen einer Spannung je nach Größe langsamer (große Fragmente) oder schneller (kleinere Fragmente) durch die poröse Gel-Matrix, die in einem Laufpuffer liegt. Nach dem Auftrennen der Produkte nach Größe (Wanderungsstrecke) kann die DNA mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ermöglicht wird dies, durch die dem Gel beigefügte Substanz „GelRed“, das in die DNA interkaliert und Strahlung reflektiert. Die abgegebene Strahlung kann im Transilluminator sichtbar

gemacht werden. Im Gerät werden die Gele fotografiert, beschriftet und gespeichert. Die Basenpaarlänge der einzelnen PCR-Produkte ist anhand eines Ladders (Banden definierter Größe) abzulesen, der ebenfalls auf das Gel aufgetragen wird (Abb. 4 u. 5). Verwendet wurden zumeist 1,5%ige Gele, die aus 4g Agarose, so wie 300ml TAE-Puffer gegossen, und mit 9µl GelRed versetzt wurden.

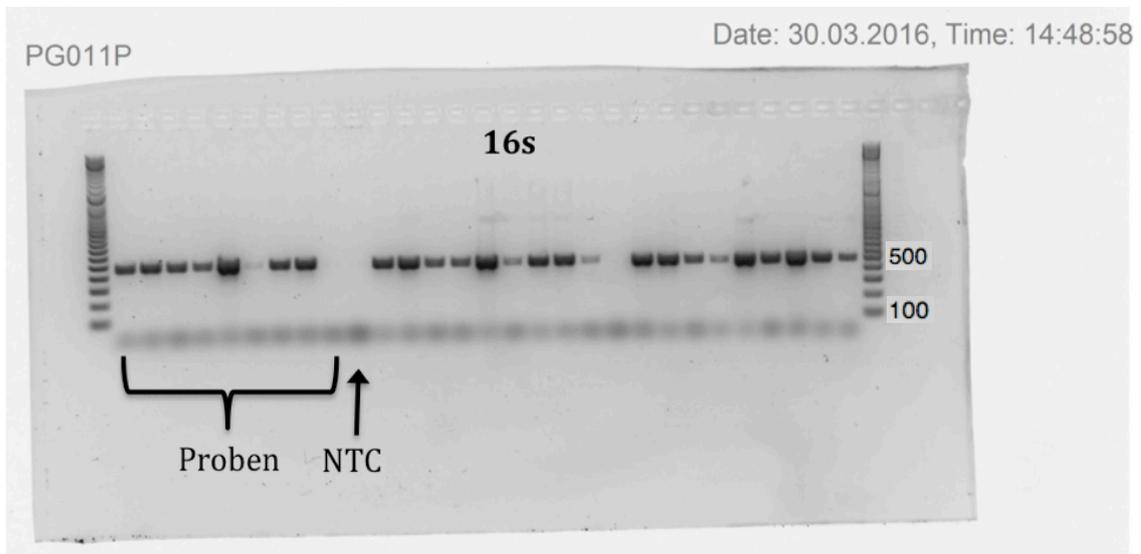


Abb. 3: Gelelektrophoresebild eines Gels mit 16s-Primer (9 Proben, 1 NTC)

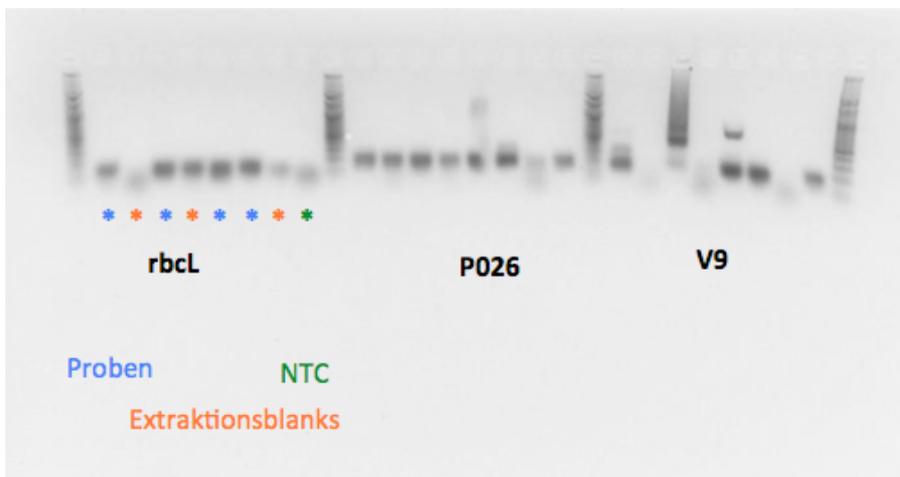


Abb. 4: Gelelektrophoresebild eines Gels mit HiFi Polymerase und den Primern rbcL, P026 und V9 (4 Proben, 3 Extraktionsblanks, 1 NTC)

3.2.4 Klonierung und Reamplifikation der Klone

Die eingesetzten Primer sind diatomeen-spezifisch, jedoch nicht art-spezifisch. Daher liegen nach der PCR zwar aufgereinigte Amplikons vor, die jedoch (ausgenommen Monokulturen) unterschiedlichen Arten zuzuordnen sind. Das Verfahren der Klonierung dient der Trennung von PCR Produkten aus Mischamplifikaten, die beispielsweise bei der Amplifikation von Umwelt-DNA entstehen. Die einzelnen DNA-Fragmente werden in kompetente Bakterienzellen (*Escherichia coli*) eingeschleust und durch Zellteilung kloniert.

Die Klonierung erfolgt mittels Transformation: Hierzu werden sogenannte Vektoren (Plasmide) genutzt, ringförmige DNA-Moleküle, die jeweils nur ein Amplikon (PCR-Produkt) aufnehmen können und anschließend mittels Elektroporation in die Bakterienzelle eingeführt werden. Auf dem Plasmid sitzt ebenfalls ein Gen für Kanamycinresistenz, das gewährleistet, dass nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, auf dem mit Kanamycin versetzten Nährmedium wachsen können. Nach Aufnahme des Plasmids, werden die Bakterien für eine Stunde in SOC-Medium geschüttelt um die Expression der Kanamycin-Resistenz zu gewährleisten. Anschließend werden die Bakterien in Petrischalen auf dem Nährmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag können die Klone gepickt werden. Jede der entstandenen Kolonien repräsentiert nun ein aufgenommenes Amplikon. Nachdem alle Klone gepickt sind, werden die Zellen denaturiert und die DNA in einer PCR nochmals vervielfältigt. Nach der Amplifizierung wird eine weitere Gelelektrophorese gestartet, und die Produkte werden hinsichtlich der Qualität ihrer Aufreinigung (Visibilität, Verunreinigungen etc.) zur Sequenzierung ausgewählt.

Die angewandte Klonierung wird im Folgenden detailliert beschrieben: Die Diatomeen-DNA wurde mithilfe eines TOPO[®] TA[®] Cloning Kit for Sequencing kloniert. Hierfür wurde zuvor eine 10 minütige Taq-Inkubation (Elongationsschritt für A-Anhang) bei 72°C durchgeführt um eine Integrierung des PCR Produkts im Vektor sicherzustellen. Es wurden je 1 µl Mastermix (0,9 µl dNTPs, 0,1 µl Sigma Taq) auf die PCR-Produkte gegeben. Die mit Kanamycin versetzten Nährböden waren zuvor in Petrischalen gegossen und anschließend im Inkubator erwärmt worden. Für die TOPO[®]-Klonierungsreaktion (Ligation) wurde ein Mastermix angesetzt (2 µl PCR-Produkt, 0,5 µl Salz-Lösung, 0,5 µl TOPO[®]-Vektor). Die kompetenten *Escherichia coli*-Zellen (25 µl Tube) wurden unter Eiskühlung gelagert und auf je zwei Tubes aufgeteilt (2x ~ 12,5 µl

Bakterien). Nachdem die Bakterien mit 1,5 μl der Ligationsreaktion versetzt wurden, pipettiert man sie in eine GenePulser-Küvette und öffnet die Zellen für den Vektor im Micropulser mittels eines elektrischen Impulses. Unmittelbar anschließend wird 125 μl SOC-Kulturmedium hinzugegeben und die Bakteriensuspension zurück in das 2ml Eppi pipettiert. Nachdem alle Proben transformiert waren, wurden sie wie beschrieben für 60 Minuten bei 200 rpm und einer Temperatur von 37°C im Inkubator geschüttelt. Nach der Inkubation im Schüttler wurden 50 μl der Bakterien auf dem Nährmedium ausgestrichen. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Bakterien von den Platten gepickt und in eine 96er-Well Platte mit 30 μl Wasser pipettiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen für 10 Minuten bei 94°C im Thermocycler (icycler, Biorad) denaturiert. Der Ansatz für die folgende Klon-PCR enthielt 700 μl Wasser, 1000 μl Mastermix so wie je 100 μl T3- und T7-Primer. Die Gelelektrophorese wurde nach dem bereits beschriebenen Verfahren durchgeführt (s. 3.2.3.).

3.2.5 Sequenzierung nach Sanger

Die verwendete Methode der Sanger-Sequenzierung ähnelt einer Polymerasekettenreaktion. Bei der Sanger-Sequenzierung handelt es sich um eine sog. Kettenabbruchsynthese. Die zu untersuchende DNA wird wie bei einer PCR amplifiziert. Im Ansatz liegt jede der vier Basen teils als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) vor. Diese ddNTPs besitzen keine Hydroxylgruppe am 3^l-Ende so dass keine Verknüpfung mit dem nachfolgenden Nukleotid möglich ist. So entsteht eine Vielzahl von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, welche zusätzlich mit vier verschiedenen Farbstoffen markiert sind. Nach der Sequenzierung laufen die Fragmente in Kapillaren durch ein Gel. Die Fragmente werden von einem Laser abgelichtet und geben unterschiedliche Fluoreszenzsignale ab. So wird nach und nach die DNA-Sequenz rekonstruiert. Die Sangersequenzierungen wurden von LGC Genomics in Berlin durchgeführt und die DNA-Sequenzen wurden bereitgestellt.

3.2.6 DNA Sequenzanalysen

Dank heutiger Methoden ist es möglich, analysierte Sequenzen unmittelbar mit einer Referenz-Datenbank wie der „Genbank“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI) abzugleichen, um die zu untersuchenden Arten bestimmen zu können. Hier finden sich gesammelte DNA-Sequenzen unterschiedlichster Arten aus der ganzen Welt, die mit den eigenen Probensequenzen abgeglichen werden können. Das hierfür zuständige Programm trägt den Namen

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST generiert über einen Algorithmus ein lokales Alignment und vergleicht die vorliegenden Sequenzen mit publizierten Referenzsequenzen (Cock *et al.*, 2015). Es erstellt eine Rangliste der verschiedenen Treffer, welche die größte Übereinstimmung zu den eingegebenen Probensequenzen zeigen. Die Ergebnisse können anschließend nach verschiedenen Kriterien wie der prozentualen Übereinstimmung („Ident“) geordnet werden. Anhand dieser Kriterien wurde eine Rangliste erstellt zwecks Auswahl des sog. „Best-Hit“. Wenn mehrere Sequenzen die gleiche prozentuale „Ident“ aufwiesen, wurde zusätzlich nach der „query coverage“ geurteilt und ausgewählt; die query coverage stellt die prozentuale Abdeckung des vom Primer amplifizierten Fragments am Gesamtfragment dar. Von einigen Sequenzen wurden sog. Konsensussequenzen erstellt, ein Zusammenschluss mehrerer Sequenzen, welcher den zu vergleichenden Sequenzen aus der Datenbank am nächsten kommt.

3.2.7 Primerdesign

Ein Primerdesign dient der Entwicklung neuer DNA-Barcoding-Primer. Für die vorliegende Studie war das Ziel, ein neues Primerpaar für die Analyse sedimentärer Diatomeen-DNA zu entwickeln.

Das Primerdesign wurde mithilfe von Geneious und PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) erarbeitet. Es galt, die aus der vorliegenden Studie hervorgegangenen Referenzen mit öffentlich zugänglichen Referenzen der NCBI Datenbank zu verflechten. Die nun vorliegenden Sequenzen wurden anschließend aligniert und auf eine Länge gebracht. Mithilfe der Anzeigeeinstellungen von Geneious konnten kurze Regionen identifiziert werden, innerhalb derer sich die Sequenzen nicht bzw. kaum unterschieden. Diese stellten günstige Angriffspunkte für die neu zu entwickelnden Primer dar. Des Weiteren musste darauf geachtet werden, dass die Bindestellen für Forward- und Reverseprimer möglichst dicht beieinander lagen (meist 100-300 bp), um eine Amplifizierung von sehr kurzen Fragmenten zu gewährleisten. Die genannten Abschnitte wurden anschließend in Primer-BLAST eingegeben. Das Programm stellt alternative Möglichkeiten zur Verfügung, wie Primer für die betreffenden Regionen aussehen können. Die Primer mit der günstigsten Passung für die gewählten Regionen, wurden als Basis für die weiterführenden Tests ausgewählt.

3.2.8 EcoPCR

EcoPCR ist ein von Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) entwickeltes Computerprogramm, das die Barcodingqualität von Primern ebenfalls mit einem Algorithmus berechnet. In Verbindung mit OBITools können EcoPCR Ergebnisse nachbearbeitet werden, um beispielsweise die Barcoding-Spezifität zu berechnen. Die Gesamtzahl aller gefundenen Taxa, die Zahl der davon identifizierten Diatomeen so wie die prozentuale Identifizierung nach Familie, Gattung und Art werden ausgegeben. Die verwendeten Ergebnisse der EcoPCR wurden von Dr. K. Stoof-Leichsenring zur Verfügung gestellt und mit den Ergebnissen aus einer Sedimentprobe in Bezug auf Diatomeenspezifität und Diatomeendiversität der verwendeten Primer verglichen.

3.2.9 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM)

Zur Slide-Vorbereitung für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden 150 μl der verwendeten Probe in ein 15 ml Falcon-Tube pipettiert und für etwa 3-4 Stunden mit 1000 μl H_2O_2 versetzt. Durch die Zugabe des Wasserstoffperoxids wurde das organische Material aus den Diatomeenzellen herausgelöst. Anschließend wurden die Proben mindestens 4 mal gewaschen, und mit 10 ml Wasser aufgefüllt. Nach jedem Waschschrift wurden sie für 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert und abdekantiert. 150 μl der fertigen Lösungen wurden in einem letzten Schritt wiederum in neue Tubes gefüllt. Von dieser fertigen Lösung wurden 1-2 Tropfen auf Objektträger pipettiert und anschließend getrocknet.

Das Rasterelektronenmikroskop ist in der Lage, eine Vergrößerung von bis zu 0,1 Nanometer zu erzeugen. Dies entspricht einer annähernd 1000-fachen Vergrößerung des Objekts gegenüber der des Lichtmikroskops. Im Unterschied zu einem LM wird bei einem REM das Bild des Objekts durch Elektronenstrahlung erzeugt. Die zu untersuchende Probe wird zuvor mit einer sehr dünnen Gold-Paladium Schicht bespartert, um ungewollte negative Einflüsse (beispielsweise Beschädigung der Probe durch Vakuum oder durch zu hohe bzw. niedrige Energieeinwirkung) zu vermeiden. Die in dieser Studie verwendeten Bilder (s. Anhang) wurden im Beisein von Frau Ilona Schäpan erstellt. Zur morphologischen Bestimmung wurden das Buch „The Diatoms, Biology and Morphology of the Genera“ herangezogen, sowie die Datenbank der Website „Diatoms of the United States“ (D. Lubinski et al.).

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Diatomeenarten in Monokulturen

4.1.1 Genetisch

Die genetische Analyse der durch die verschiedenen Primer erzeugten Sequenzen ergab bei den meisten Primern keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich der taxonomischen Zuordnung (Tab. 5).

Tab. 5: Taxonomische Zuordnung der Monokulturen nach genetischen Untersuchungen mit den Primern rbcL, UPA, 16s, ITS, 18s, V9 und D512/D978

Probe	rbcL	UPA	16s	ITS	18s	P026	V9	D512/D978
EPG001	<i>Pinnularia viridiformis</i> 99% KM084981.1	k.D.	<i>Pinnularia</i> sp. 98%, KT952293.1	/	<i>Pinnularia</i> sp. 97%, JN418595.1	/	/	<i>Pinnularia</i> sp. 98%, KM998985.1
EPG002	<i>Neidium</i> sp. 99% KM078663.1	k.D.	k.D.	/	/	/	/	<i>N. productum</i> 100%, HQ912582.1
EPG008	<i>Craticula cuspidata</i> strain 99%, HQ912445.1	/	k.D.	/	/	/	/	/
EPG009	/	/	k.D.	/	/	/	/	/
EPD090	<i>Neidium</i> sp. 99% KM078663.1	k.D.	k.D.	k.D.	<i>Neidium</i> 99%, AM501955.1	<i>Neidium</i> 99%, AM501955.1	<i>Neidium</i> 100%, AM501955.1	<i>N. productum</i> 99%, HQ912582.1
EPD094	/	<i>Bacillariophyceae</i> sp. 100%, KM676732.1	k.D.	<i>Tabularia</i> 97%, EU883364.1	<i>Fragilaria</i> 99%, AM497739.1	<i>Fragilaria</i> 100%, AM497739.1	<i>Fragilaria</i> 100%, AM497739.1	<i>Tabularia</i> sp. 100%, KT860991.1
EPD096	<i>Fragilaria famelica</i> 96%, HQ912452.1	<i>Synedra acus</i> 99%, JQ088178.1	k.D.	<i>Tabularia</i> 97%, EU883364.1	<i>Fragilaria</i> 99%, KT959654.1	<i>Fragilaria</i> 99%, AM497739.1	<i>Fragilaria</i> 100%, AB430599.1	<i>T. crotonensis</i> 100%, KT860991.1
EPD098	/	/	<i>Cyclotella</i> sp. 99%, KJ958481.1	/	/	/	/	<i>C. meneghiniana</i> 99%, KT072987.1
EPD099	<i>Pinnularia termitina</i> 97%, HQ912465.1	/	<i>Pinnularia</i> sp. 99%, KT952293.1	/	/	/	/	<i>P. microstauron</i> 100%, AM501981.1/EF15 1977.1

Die Kultur EPG001 wurde von den Markern rbcL, 16s, 18s und D512/D978 einheitlich der Gattung *Pinnularia* zugeordnet. Kultur EPG002 wurde vom rbcL Marker der Gattung *Neidium* zugewiesen, konnte jedoch vom UPA und 16s Marker nicht genau identifiziert werden. Der D512/D978 Marker zeigte ebenfalls ein Ergebnis und identifizierte die Gattung *Neidium* mit einer Übereinstimmung von 100%. Bei der dritten Kultur (EPG008) lieferten nur der rbcL und der 16s Marker Ergebnisse: rbcL identifizierte die Gattung *Craticula*, wohingegen das Ergebnis des 16s Markers wiederum nicht verwertbar war („*uncultured bacterium*“). Kultur EPG009 fiel bei rbcL aus, und konnte vom 16s Marker ebenfalls nicht identifiziert werden. Die fünfte Kultur (EPD090) wurde von den Markern rbcL, 18s, P026, V9 und D512/D978 ebenfalls als der Gattung *Neidium* zugehörig identifiziert. Weder durch die Marker UPA, noch 16s oder ITS wurde eine eindeutige Identifizierung erreicht. Die Probe aus Kultur EPD094 wurde von drei der sieben Marker (18s, P026, V9) als *Fragilaria* identifiziert. Der Marker UPA identifizierte *Bacilariophyceae* sp., wohingegen 16s kein identifizierbares Ergebnis lieferte. Sowohl ITS als auch der Marker D512/978 identifizierten die Gattung *Tabularia*. Für die Kultur EPD096 wurde viermal die Gattung *Fragilaria* identifiziert (rbcL, 18s, P026 u. V9), einmal die Gattung *Synedra* (UPA) und zweimal die Gattung *Tabularia* (ITS, D512/D978). Der 16s Marker lieferte auch hier erneut kein eindeutiges Ergebnis. Die Kultur EPD098 konnte allein vom 16s Marker sowie dem D512/D978 Marker mit vergleichbaren Ergebnissen identifiziert werden (16s: *Cyclotella* sp.; D512/D978: *Cyclotella meneghiniana*). Die letzte Algenkultur (Probe EPD099) wurde von drei Markern identifiziert, in allen Fällen als Gattung *Pinnularia*, sowohl bei rbcL als auch bei 16s und D512/D978.

Weder die mitochondriellen Marker Cox/CoI – vom gleichen Gen stammend, jedoch etwas andere Bereiche des COI Gens amplifizierend - noch der der V4 Region (18s) entstammende Marker aus dem Kerngenom, lieferten Ergebnisse. Sie wurden für die Primerentwicklung verworfen. Der aus dem Chloroplastengenom stammende Marker psbC, ließ nur schwache Banden im Gelelektrophoresebild erkennen, sollte aber, wie sich später herausstellte, trotz allem den Ansatzpunkt für neu zu entwickelnde Primer darstellen. Bisher war nur rbcL als Marker für Diatomeen auf Sediment-DNA verwendet worden. Da es zu erforschen galt, wie gut Primer unterschiedlicher Genome auf

Sediment-DNA anwendbar sind, wurde die Studie um einen weiteren Chloroplastenmarker (psbC) und zwei nukleäre Marker (P026 und V9) erweitert.

4.1.2 Morphologisch

Zwei Versuche, geeignete rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Diatomeenarten in den Monokulturen anzufertigen, erzeugten keine hundertprozentig aussagekräftigen Bilder in Bezug auf die taxonomische Einordnung. Dennoch konnten alle Kulturen bis zum Gattungslevel bestimmt werden (Abb. 5).

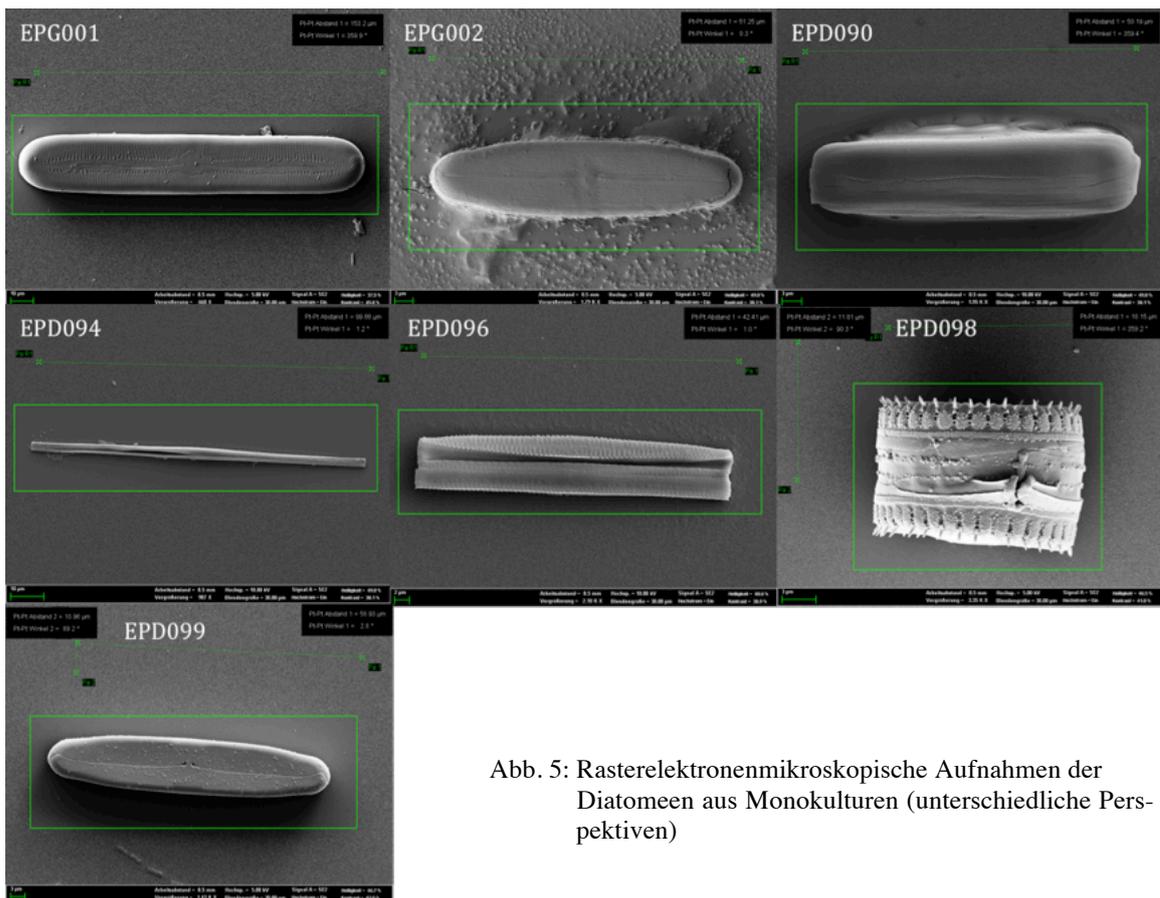


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Diatomeen aus Monokulturen (unterschiedliche Perspektiven)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen lieferten folgende Ergebnisse: Für die Kultur EPG001 wurde die Gattung *Pinnularia* identifiziert. Kultur EPG002 war unter dem Rasterelektronenmikroskop der Gattung *Neidium* als zugehörig zu identifizieren. Die Kultur EPD090 wurde sowohl im REM als auch unter dem LM ebenfalls als der Gattung *Neidium* zugehörig identifiziert. Die Kultur EPD094, wurde als Gattung *Fragilaria* identifiziert, hier waren besonders viele Individuen in der Probe sichtbar. Kultur EPD096 wurde ebenfalls der Gattung *Fragilaria* zugeordnet, mit dem Unterschied, dass diese Art etwas gestaucht wirkte im Vergleich zur Probe aus Kultur

EPD094. Kultur EPD098 wurde in beiden REM-Anläufen eindeutig als Gattung *Cyclotella* identifiziert, deutlich erkennbar an den zentrischen Valven und den spitzen Auswölbungen am Valvenrand. Die letzte unter dem Rasterelektronenmikroskop untersuchte Kultur, EPD099 wurde abermals als der Gattung *Pinnularia* zugehörig identifiziert. In dieser Probe fanden sich in beiden Anläufen Verunreinigungen durch Bakterien (s. EPD099, Abb. 5).

Wegen der wenig präzisen Abbildungen bzw. dem Mangel an Diatomeen in den Proben EPG008 und EPG009 konnten diese nicht zur morphologischen Bestimmung im Rasterelektronenmikroskop herangezogen werden.

4.2 Auswahl der neuen Primer

In den, mit den bekannten Primern (rbcL, P026 und V9) in EcoPCR durchgeführten Vortests, die als Vergleich zu den neu zu entwickelnden Primern gelten sollten, ließ sich feststellen, dass die vom rbcL Marker amplifizierten DNA-Sequenzen zu 90,4% Diatomeen zuzuordnen sind. Demgegenüber ergab der Diatomeenanteil beim V9 Marker 2,3% und beim P026 Marker 3,99%.

Von den Markern, die als Basis für die Entwicklung potentieller Primer für sedimentäre Diatomeen-DNA in Betracht gezogen wurden, sollten 16s und UPA als Ansatzpunkt für die Erstellung neuer Primer fungieren. Auf deren Basis wurden drei neue Primer konstruiert: 16s_new, UPA_new und UPA_new_2. Auch für die psbC Region, die auf den Algenkulturen keine guten PCR-Produkte lieferte (s. 4.1.1.), wurden über NCBI mögliche Referenzen heruntergeladen und so die zwei neuen Primer psbC_new und psbC_new_2 entwickelt, da sich herausstellte, dass die Region - EcoPCR-Tests nach zu urteilen - nutzbringende Ergebnisse liefern konnte (Tab. 6).

So wurden jeweils über das beschriebene Verfahren (s. 3.2.7) insgesamt fünf neue Primer entwickelt. Diese Primer wurden anschließend wiederum im EcoPCR Programm getestet (Tab. 7).

Tab. 6: Mittels Geneious und PrimerBLAST entwickelte Primer

Primer	Sequenz (3-5)	Primerlänge	Fragmentlänge bp (primer Blast)	Annealing Temp. (primer blast)
Diat_16sF_new	CACTGGAACTGAGAC ACGGT	20	216-217	59.61
Diat_16sR_new	ACACTTGCATCCYCCG TMTT	20	216-217	59.31
Diat_UPA-F*_new	ABTTGCGCAGBATAGG TGGR	20	153	58.03
Diat_UPA-R*_new	GACCGCCCCAGTCAA AC	17	153	57.88
Diat_psbc_F_new	TGCGTYTCTGGGATCT ACGK	20	169	59,83
Diat_psbc_R_new	GTWGCTACACCACCY ACWGA	20	169	59,89
Diat_UPA_f_new_2	TTGCGCAGBATAGGTG GGAG	20	185	59,59
Diat_UPA_r_new_2	AACCTTTGTRCGCCTC CGTT	20	185	59,89
Diat_psbc_F_new_2	CCCATTCTTCGGTTAT GAYTGGM	23	225	60
Diat_psbc_R_new_2	CCAAATGGWGAACGG AAHAYR	21	225	60.27

Tab. 7: EcoPCR Ergebnisse der fünf neuen Primer 16s_new, UPA_new, UPA_new_2, psbC_new und psbC_new_2

Name	Sequenz	total	Bacillariophyta	Familie	Gattung	Art	Familie	Gattung	Art
Diat_16sF_new_1	CACTGGAAGT AGACACGGT	5291	193	9	13	25	27,27	20,97	18,38
Diat_16sR_new_2	ACACTTGCCATCC YCCGTMTT								
Diat_UPA-F*_new	ABTTGCGCAGB ATAGGTGGR	3545	193	14	23	48	56	58,97	42,48
Diat_UPA-R*_new	GACCGCCCCAG TCAAAC								
Diat_psbC-F_new	TGCGTYTCTGGG ATCTACGK	485	309	43	107	184	87,76	89,92	74,21
Diat_psbC-R_new	GTWGCTACACC ACCYACWGA								
Diat_UPA-f_new_2	TTGCGCAGBAT AGGTGGGAG	3773	176	17	25	53	68	65,79	47,32
Diat_UPA-r_new_2	AACCTTTGTRCG CCTCCGTT								
Diat_psbC-F_new_2	CCCATTCTTCGG TTATGAYTGGM	501	475	52	139	289	86,67	89,68	80,73
Diat_psbC-R_new_2	CCAAATGGWGA ACGGAAHAYR								

Für den 16s Primer wurden insgesamt 5291 Sequenzen gefunden, von denen 193 zum Taxon *Bacillariophyta* gehörten. Es konnten 9 Familien, 13 Gattungen und insgesamt 25 verschiedene Arten identifiziert werden. 27,27% der 193 Treffer für Diatomeen waren einer Familie zuzuordnen und 20,97% einer Gattung. Insgesamt 18,38% der Sequenzen konnten bis auf Spezies-Level zugeordnet werden.

Für den Marker UPA_new wurden insgesamt 3545 Sequenzen gefunden, von denen ebenfalls 193 den *Bacillariophyta* zuzuordnen waren. Es wurden 14 verschiedene Familien identifiziert, sowie 23 Gattungen und 48 Arten. 56% der Sequenzen konnten bis zur Familie bestimmt werden, 58,97% bis zur Gattung und 42,48% bis zur Art.

Von den insgesamt 3773 gefundenen Sequenzen des UPA_new_2 Markers, wurden 176 den *Bacillariophyta* zugeordnet. 68 % wurden bis zur Familie bestimmt, 65,79 % bis

zur Gattung und 47,32 % bis zur Art. Die Einordnung fand in 17 Familien, 25 Gattungen und 53 Arten statt.

Der neu entwickelte psbC_new Marker lieferte eine geringere Zahl von Sequenzen (485), von denen 309 als den *Bacillariophyta* zugehörig bestimmt wurden. 87,79% konnten bis zur Familie bestimmt werden, 89,92% bis zur Gattung und 74,21% bis zur Art. Hier gliederte sich die Aufteilung der Sequenzen in 48 Familien, 107 Gattungen und insgesamt 184 Arten.

Der letzte getestete Marker psbC_new_2 lieferte ein Gesamtergebnis von 501 Sequenzen, von denen 475 Sequenzen (94,81%) als den *Bacillariophyta* zugehörig identifiziert wurden. 86,67% dieser 475 Sequenzen konnten einer der insgesamt 52 Familien zugeordnet werden, 89,68% bis auf Gattungs-Niveau (139 Gattungen), und 80,73% der Sequenzen konnten bis aufs Art-Niveau bestimmt werden (289 Arten innerhalb der 475 Sequenzen).

Angesichts der Wertung dieser Ergebnisse wurden die beiden Primer psbC_new und psbC_new_2 für Labor-Tests auf sedimentärer DNA ausgewählt.

4.3 Testung der neuen Primer auf Sedimentärer DNA

Für die Tests der neu entwickelten Primer und den Vergleich mit den drei bereits existierenden Primern rbcL, P026 und V9 wurden zwei Sedimentproben ausgewählt, die Probe EPD010 sowie die Probe EPD013, die beide ebenfalls aus Seesediment bzw. dem Übergangsbereich zwischen Wasser und Sediment des großen Chabyda Sees stammen.

Der rbcL Marker zeigte eine klare Auflösung der PCR-Produkte im Gelelektrophorese-Bild, wohingegen bei den Markern P026 und V9 unterschiedlich lange Fragmente und somit Doppelbanden sichtbar waren (Abb. 6). Beide neu entwickelten Primer psbC_new und psbC_new_2 wiesen bei Probe EPD010 eine leichte zweite (Primer-)Bande im untersten Bereich auf. Probe EPD013 zeigte eine klare Bande im Basenpaar-Bereich zwischen 100 und 250 bp (Abb. 6). Die Negativ-Kontrolle blieb wie gewünscht frei von Verunreinigungen und zeigte ebenfalls nur die übliche leichte Bande, die durch die Verbindung der Primer (Primerdimer) entsteht.

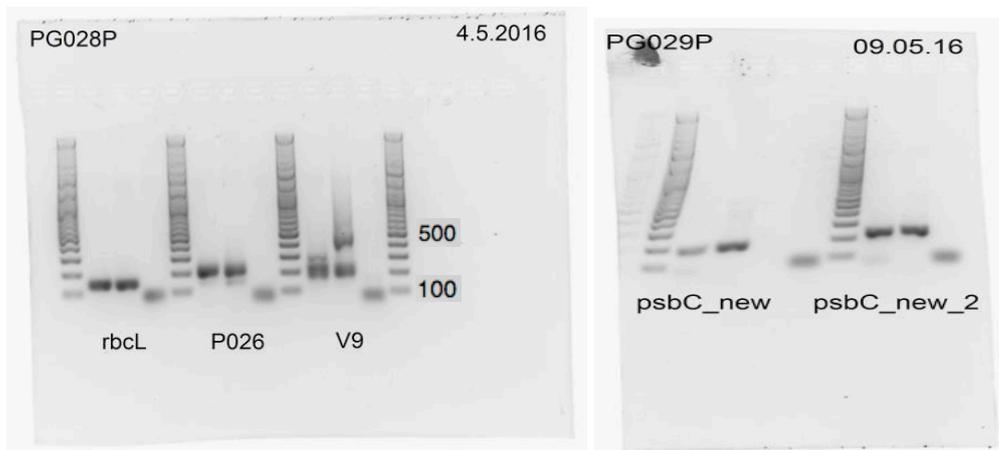
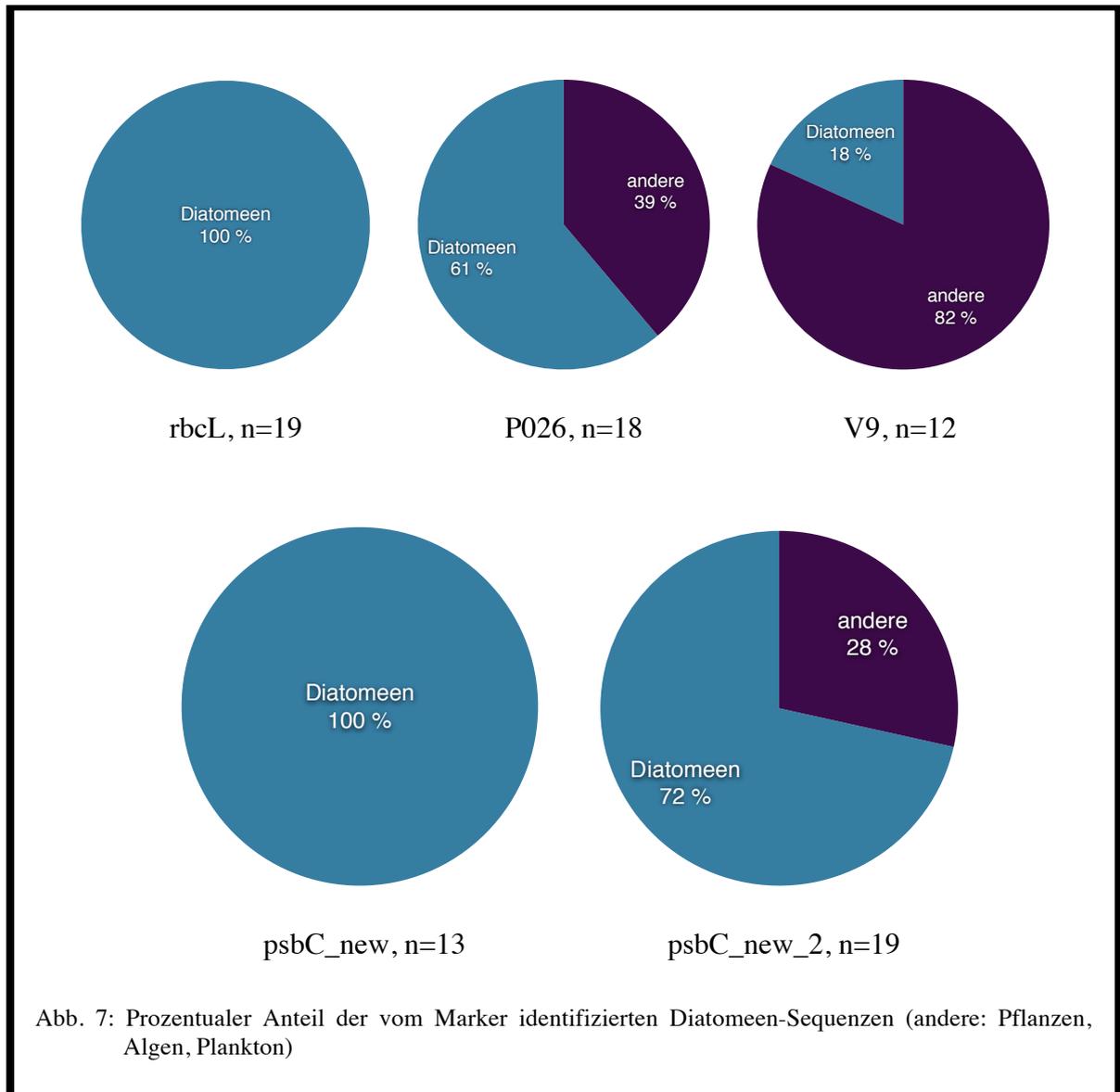


Abb. 6: Gelelektrophoresebild der Sedimentproben EPD010 und EPD013 mit den Primern rbcl, P026, V9, psbC_new und psbC_new_2

4.4 Diversität der Diatomeenarten in Sedimentproben

Die auf die PCR der Primer rbcl, P026, V9, psbC_new und psbC_new_2 folgende Klonierung lieferte die Sequenzdaten für die genetische Analyse der Sedimentproben mit Geneious und BLAST. Die Sequenzen wurden in Geneious analysiert und die Ergebnisse der Spezifität und Diversität der Primer wurden mit den Ergebnissen der EcoPCR verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass es innerhalb der verschiedenen Marker identische Sequenzen gab. Diese wurden zu einer Sequenz zusammengefasst. Die übrig gebliebenen Sequenzen wurden mit dem Namen „*unique sequences*“ (einzigartige Sequenzen) betitelt. Aus den insgesamt 19 eingespeisten rbcl-Sequenzen wurden 13 unique sequences isoliert. Die 19 Sequenzen wurden zu hundert Prozent als Diatomeensequenzen identifiziert (Abb. 7). Innerhalb der 18 Klonierungssequenzen des P026 Markers wurde ein identisches Paar gefunden. Von diesen 18 Sequenzen waren 61% als von Diatomeen stammend zu identifizieren. Beim V9 Marker lag dieser Anteil nur bei 18%, innerhalb der 12 Sequenzen wurden keine identischen identifiziert. Der neu entwickelte psbC Marker, psbC_new erzeugte ebenfalls ein Ergebnis, das 100% Diatomeen auswies. Von den 13 untersuchten Sequenzen wurde ein Paar vom Programm als identisch erkannt. Der zweite, neu entwickelte Primer psbC_new_2 wurde mit 18 Sequenzen in Geneious untersucht. Das Programm gab hier eine Zahl von 13 unique sequences aus. Von den insgesamt 18 Sequenzen wurden etwa 72% als Diatomeen indentifiziert.

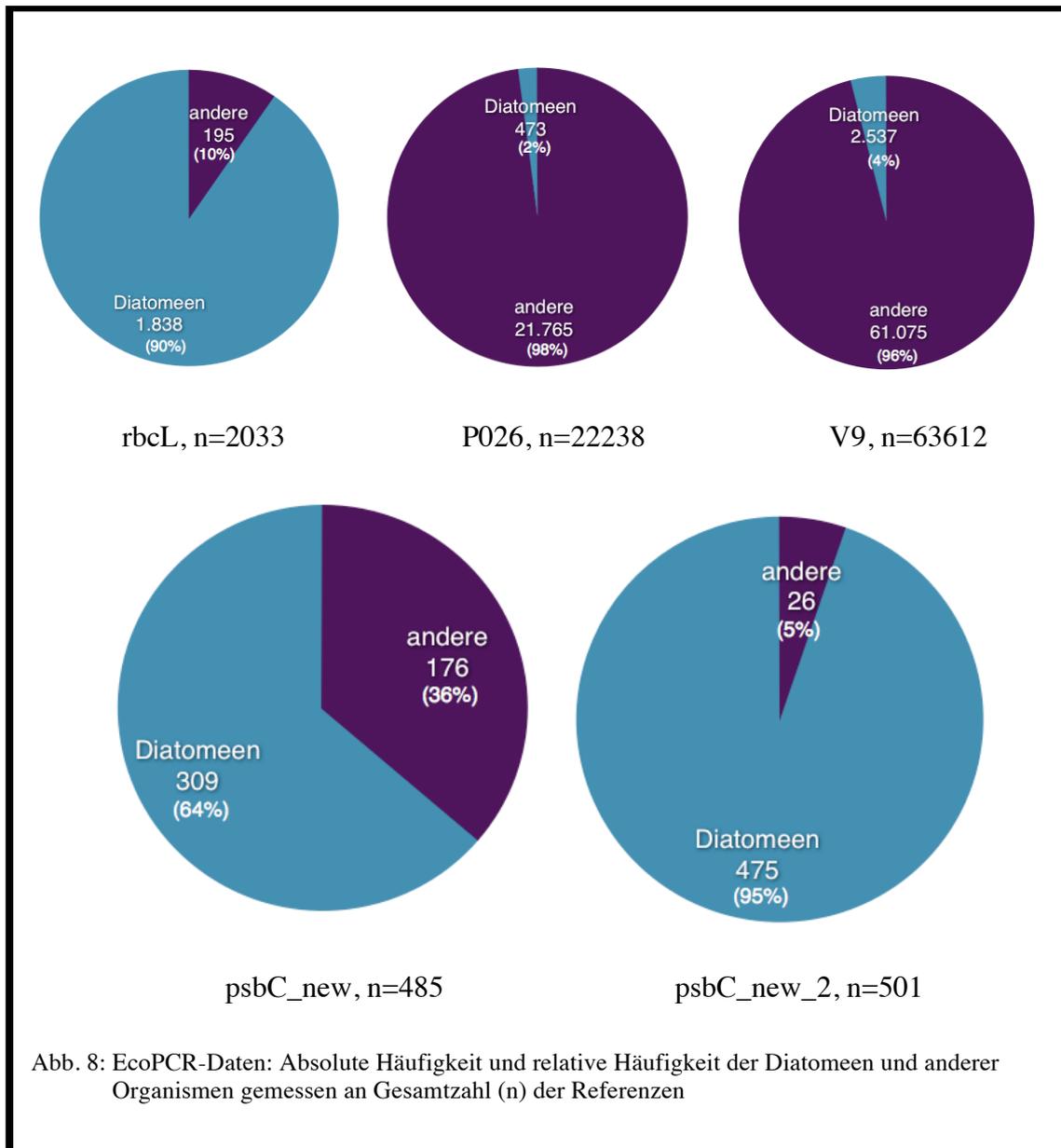


In einem nächsten Schritt wurden die prozentualen Anteile der genetisch bestimmten Taxa entsprechend der drei morphologischen Gruppen „zentrisch“, „raphid“ und „araphid“ gegliedert und an dem gesamten Ertrag der Diatomeen-Sequenzen gemessen (Abb. 9). Sowohl der rbcL Marker, als auch der psbC_new_2 Marker konnten alle drei morphologischen Gruppen identifizieren. Die Marker P026, V9 und psbC_new identifizierten Sequenztypen, die den zentrischen und raphiden Diatomeen zugeordnet sind. Jedoch wurden in diesem Ansatz keine Sequenztypen von araphiden Diatomeen identifiziert.

4.5 Vergleich der unterschiedlichen Primer

4.5.1 Gegenüberstellung von Primer- und EcoPCR-Daten

Die computertechnischen Tests zur Primerspezifität mithilfe einer online zusammengestellten Referenzdatenbank für den rbcL Marker wiesen eine Diatomeenerkennungsrate von 90,41% aus. Die praktischen Tests mit diesem Primer auf der Sedimentprobe ergaben eine Spezifität von 100%. Für den Primer P026 wurde ein Anteil von 2,13% Diatomeen ausgegeben, bei der praktischen Analyse der Sediment-DNA mit diesem Primer konnte ein Anteil von 61% festgestellt werden. Der Marker V9 wurde von EcoPCR mit einer Diatomeenspezifität von 3,99% erkannt, in der Praxis konnten 18% der Sequenzen als den Diatomeen zugehörig identifiziert werden. Der neu entwickelte Primer psbC_new ergab im Test mit EcoPCR ein Ergebnis von 64% erkannter Diatomeensequenzen. Der direkte Test mit diesem Marker auf dem Sediment ergab ein Ergebnis von 100%. Der zweite auf dem sibirischen Sediment getestete psbC Marker (psbC_new_2) wies bezüglich der online zusammengestellten Referenzdatenbank eine Spezifität für Diatomeen von 95% auf (Abb. 8). Bei den durchgeführten Analysen mit der Sedimentprobe EPD010 sank dieser Wert auf 72% (Abb. 7).



4.5.2 Vergleich der Primer untereinander

Für die abschließende Analyse der Diversität der in den Sedimenten des Großen Chabyda Sees befindlichen Diatomeen wurde die Probe EPD010 ausgewählt. Die genetischen Analysen dieser Sediment-DNA-Probe wiesen für die getesteten Marker unterschiedliche Spezifität aus (Abb. 9).

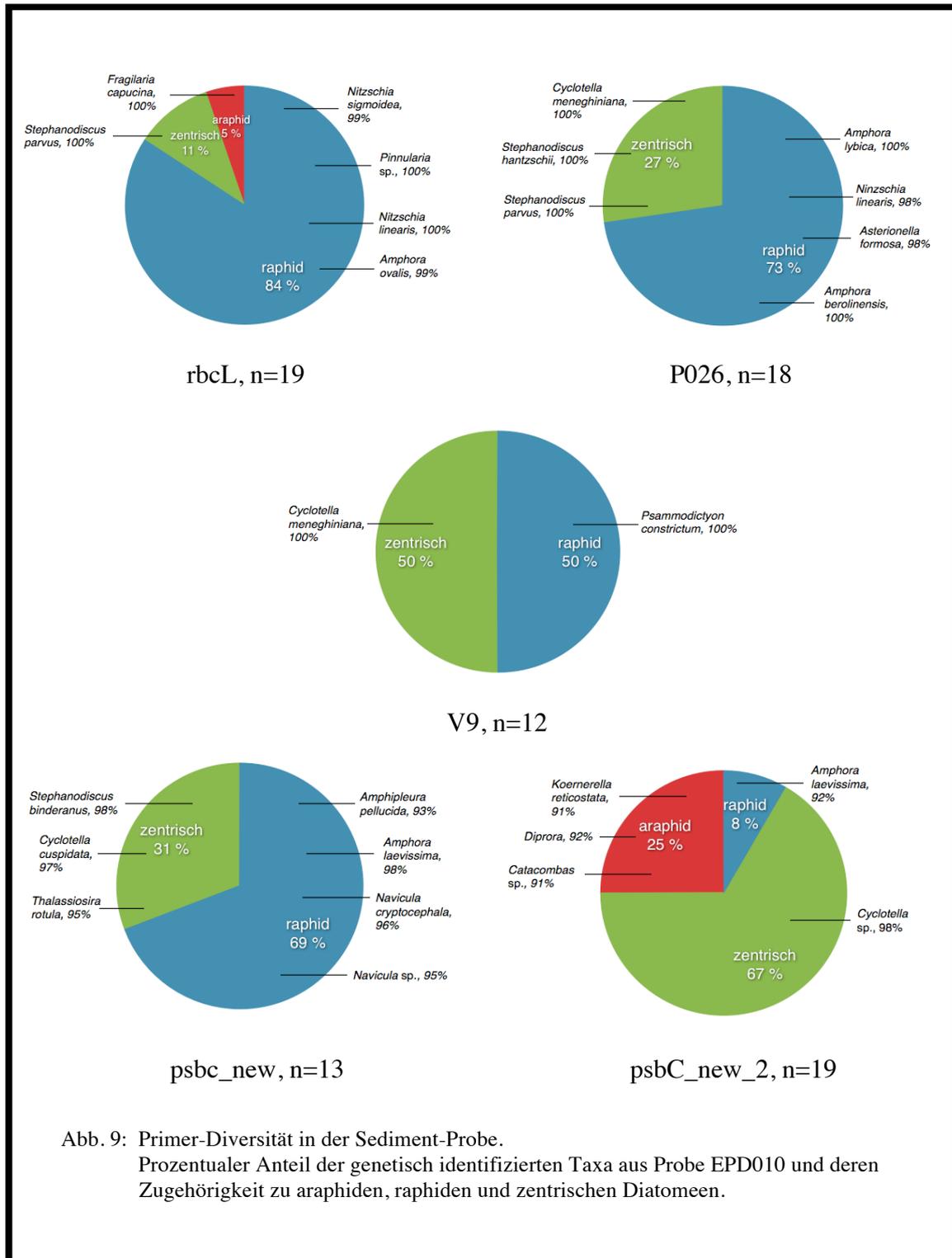


Abb. 9: Primer-Diversität in der Sediment-Probe. Prozentualer Anteil der genetisch identifizierten Taxa aus Probe EPD010 und deren Zugehörigkeit zu araphiden, raphiden und zentrischen Diatomeen.

rbcL konnte sechs unterschiedliche Arten identifizieren, darunter neunmal die Art *Nitzschia linearis*, zweimal die Art *Nitzschia sigmoidea*, zweimal *Pinnularia sp.* und einmal *Amphora ovalis* (raphide Arten). *Stephanodiscus parvus* (zentrisch) wurde

einmal identifiziert, ebenso *Fragilaria capucina* (araphid). Dem Marker P026 war es möglich, zwischen sieben verschiedenen Diatomeenarten zu unterscheiden. Fünfmal fand sich die Art *Nitzschia linearis*, je einmal die Arten *Amphora lybica*, *Amphora berlinensis* und *Asterionella formosa* (raphide Arten). Ebenso wurden je einmal *Stephanodiscus parvus*, *Cyclotella meneghiniana*, und *Stephanodiscus hanzschii* (zentrische Arten) nachgewiesen. Der dritte Marker V9 unterschied zwischen zwei verschiedenen Taxa, die im gleichen Verhältnis (50/50) auftraten, die Taxa *Cyclotella* (zentrisch) und *Psammodictyon constrictum* (raphid). Unter den drei zentrischen, vom neuen Marker psbC_new identifizierten Arten, fand sich zweimal die Art *Cyclotella cuspidata* und je einmal *Stephanodiscus binderanus* sowie *Thalassiosira rotula*. Zu den identifizierten, raphiden Arten zählten *Navicula cryptocephala* (6), *Navicula* sp. (1), *Amphora laevisissima* (1) und *Amphora pellucida* (1). Zu guter Letzt konnte der Marker psbC_new_2 fünf verschiedene Arten identifizieren, von denen drei araphid, eine raphid und eine zentrisch waren. Die araphiden Arten waren *Diprora* (1), *Koernerella reticostata* (1) und *Catacombas* sp. (1). Den raphiden Teil der Arten bildete *Amphora laevisissima* (1) und den zentrischen Teil *Cyclotella* sp. (8).

5. Auswertung, Interpretation, Diskussion

In dieser Studie wurden genetische Referenzen von Diatomeenarten, isoliert aus Sedimenten des Großen Chabyda Sees, mittels diverser genetischer Marker erstellt. Das Ziel war es, die bestehende Gendatenbank für Diatomeen sibirischer Seen durch diese Referenzen zu erweitern. Für die genetischen Analysen wurden verschiedene, in der Literatur bekannte genetische Marker von unterschiedlichen Genomen verwendet. Des Weiteren wurden rasterelektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um in Monokulturen befindliche Arten identifizieren und mit den Ergebnissen der genetischen Analysen vergleichen zu können. Obwohl die mikroskopischen Aufnahmen dabei eine taxonomisch weniger sichere Auflösung der Ergebnisse lieferten als die genetischen, können sie dennoch zur Überprüfung und Bestätigung der genetischen Ergebnisse Verwendung finden. Die Entwicklung eines neuen Primers sollte einen Vergleich zwischen verschiedenen Markern in Bezug auf ihre Spezifität und Diversität auf Sediment-DNA ermöglichen. Dazu wurden fünf neue Primer entwickelt, von denen schlussendlich zwei auf einer Sedimentprobe getestet wurden. Beide Primer lieferten zufriedenstellende Ergebnisse, sodass sie zur Unter-

suchung der Diversität der in der Sedimentprobe befindlichen Diatomeenarten herangezogen wurden. Es zeigte sich, dass unterschiedliche Marker, angewendet auf derselben Probe, das Ergebnis der ausgewiesenen Diversität stark beeinflussten, so fielen die Ergebnisse der Identifikation der Diatomeenarten unerwartet aus: Bei gleicher Ausgangs-DNA führten verschiedene genetische Marker zu unterschiedlichen Taxa. Diversitätsforschungen auf Basis eines einzelnen Markers sind demnach unter Vorbehalt zu betrachten.

Aufgrund der relativ geringen Anzahl verwendeter Sequenzen sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht statistisch verifizierbar und müssten in weiteren Studien ergänzt werden.

Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden untereinander verglichen und unter Verwendung von Fachliteratur diskutiert.

5.1 Genetische vs. morphologische Analyse

Die laut der genetischen Analyse bestimmten Taxa für die einzelnen Proben waren:

Genetische Analysen:

EPG001: *Pinnularia sp.*

EPG002: *Neidium sp.*

EPG008: *Craticula cuspidata*

EPG009: *Neidium productum*

EPD090: *Neidium sp.*

EPD094: *Fragilaria*

EPD096: *Fragilaria famelica*

EPD098: *Cyclotella sp.*

EPD099: *Pinnularia sp.*

Morphologische Analysen:

Pinnularia

Neidium

k.D.

k.D.

Neidium

Fragilaria

Fragilaria

Cyclotella

Pinnularia

Den Ergebnissen liegt die Annahme zugrunde, dass die von den unterschiedlichen Markern am häufigsten identifizierten Taxa den tatsächlichen Taxa entsprechen. Diese Ergebnisse deckten sich mit den angefertigten rasterelektronenmikroskopischen und lichtmikroskopischen Aufnahmen (morphologische Analysen). Eine genauere Bestimmung der monospezifischen Algenkulturen in den Stichproben - über das Gattungsniveau bis hin zur Art - war aufgrund der Qualität der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und mangelnder Fachkenntnis in der morphologischen Bestimmung nicht möglich. Zudem lassen zahlreiche, teils filigrane Unterschiede der Valvenformen

verschiedener Arten derselben Gattung (Round, Crawford & Mann, 1990) darauf schließen, dass die Diversität der Diatomeen im großen Chabyda See noch wesentlich größer ist, als sich durch die angewandten Methoden und auf Basis der eigenen Kenntnis über die Morphologie feststellen ließ (D. Mann, S. Droop, 1996).

5.2 Effektivität der verschiedenen Primer im Vergleich

Wie beschrieben, zeigten die Primer (Tab. 2), die zur Bestimmung der in den Monokulturen enthaltenen Arten herangezogen wurden, unterschiedlich aussagekräftige Ergebnisse. Die Kulturen enthielten vermutlich Bestandteile von Pilzen oder auch anderen Algen, die ebenfalls von den Markern amplifiziert wurden. So konnte für die Marker aus dem Chloroplastengenom, bei denen davon auszugehen war, dass nur Diatomeen-DNA amplifiziert worden war, größtenteils eine Sofortsequenzierung erfolgen. Andere Produkte hingegen mussten zunächst kloniert werden.

Mitochondrielle Primer wie Cox/COI konnten aufgrund mehrerer Ausfälle in der vorliegenden Studie keine weitere Verwendung finden, wenngleich diese in anderen Studien bereits als Barcodingmarker fungiert hatten (Tan *et al.*, 2015). Auch in diesen Fällen jedoch konnten mit beiden Markern keine besseren Ergebnisse in Bezug auf z.B. die Diversitätserkennung gegenüber *rbcL* erzielt werden (Evans, Wortley & Mann, 2007; Trobajo *et al.*, in press). Ein möglicher Grund, liegt darin, dass die Anzahl an Amplifikaten aus dem Mitochondriengenom von Diatomeen im Vergleich zu jenen aus dem Chloroplastengenom geringer ausfällt (J. Prihoda, A. Tanaka, W. De Paula *et al.*, 2012). Aus diesen Kompartimenten liegt nicht so viel DNA vor wie aus den Chloroplasten, die mit teilweise mehreren Kompartimenten pro Zelle und mehreren Genomen pro Kompartiment vorliegen.

Wie Zimmermann *et al.* 2014 herausstellten, ist die V4 Region (18s) des Kerngenoms besonders für die Untersuchung von Umweltproben geeignet. Für die vorliegende Studie wurde, sowohl im Vortest zur Erweiterung der Referenzdatenbank mithilfe der Monokulturen, als auch in einem späteren Test auf dem Sediment diese Region ebenfalls verwendet. Zimmermanns Beobachtungen ließen sich in der vorliegenden Arbeit auch nach mehreren PCRs nicht bestätigen. Allerdings bezieht sich Zimmermann in seiner Veröffentlichung auf Wasserproben, die aufgrund einer höheren Konzentration an (lebenden) Organismen nur bedingt mit einer Sedimentprobe vergleichbar sind. Die ebenfalls getestete V9 Region des Kerngenoms brachte bessere Ergebnisse, langte jedoch nicht an die Spezifität der *psbC* Marker heran. Betrachtet man die Ergebnisse

der letzten Tests auf sedimentärer DNA mit den Primern rbcL, P026, V9, psbc_new und psbc_new_2, fällt folgendes auf: Der Primer P026 wies im praktischen Test eine befriedigende Spezifitätsrate von 62% auf. Der Marker V9 eine Rate von nur 18%. Beide Primer stammen aus dem Kerngenom (Bowler, Taberlet; Amaral-Zettler *et al.* 2009). Dies könnte ein Grund für die geringe Rate bzw. die geringe Spezifität der beiden Primer sein, da sich die Gene des Kerngenoms auch in anderen Organismen finden. Die Sequenzierung irrelevanter Klonfragmente, aber auch die sekundäre Endosymbiose (Falkowski *et al.*, 2004) können als Erklärung für die große Anzahl der als „uncultured organism/bacterium/protist“ ausgegebenen Sequenzen vermutet werden.

Auch die Primer, die für die Amplifikation des Chloroplasten-Gen psbC getestet wurden, das als Grundlage für die neu entwickelten Primer fungierte, waren bei der Identifizierung der in den Monokulturen befindlichen Arten und der Ergänzung der Referenzdatenbank nicht von Nutzen. Dies mag daran liegen, dass die Qualität der amplifizierten DNA des psbC im Unterschied zu den Fragmenten der neu entwickelten Primer psbC_new und psbC_new_2, oder auch die eingesetzte Menge des DNA Extrakts in der PCR nicht ausreichend war. Des Weiteren kann die Passfähigkeit der Primer bei dem langen, vom normalen psbC Marker amplifizierten Fragment unzureichend gewesen sein. Der bisher als effektivster bewertete Marker für sedimentäre Diatomeen-DNA, rbcL_705F/rbcL_808R (Stoof-Leichsenring, 2012) weist im praktischen Test eine Spezifität von 100% auf. Der Primer psbC_new weist gleichfalls diese Rate aus, wohingegen der Marker psbC_new_2 eine Spezifität von nur 72% vorweisen kann. In die Beurteilung der Eignung muss jedoch mit einbezogen werden, dass die Primer rbcL und psbC_new_2 alle genetisch bestimmten Sequenzen in die drei morphologischen Gruppen raphid, araphid und zentrisch zu unterteilen wussten, wohingegen der Primer psbC_new nur zentrisch und raphid unterscheiden konnte. Da die Auswahl der Arten aus der Ursprungsprobe dem Zufallsprinzip unterliegt (P. Bodén, 1991), lässt sich schwer bestimmen, welcher der beiden neu entwickelten Primer der geeignetere für sedimentäre Diatomeen-DNA ist. Falls sich die Ergebnisse bei weiteren Tests ähnlich verhalten, kann dem Marker psbC_new eine größere Spezifität zugeschrieben werden, da es ihm möglich war, ebenso wie rbcL, 100% Diatomeen zu identifizieren. Werden die von EcoPCR ausgegebenen Daten mit in Betracht gezogen, ist davon auszugehen, dass weitere Tests mit dem psbC_new_2 Marker ein verbessertes Ergebnis zeigen (>80%). Laut EcoPCR wurden theoretisch 501 von psbC_new_2 identifizierte Sequenzen gefunden, von denen ganze 475 (94,81%) Diatomeen-DNA

darstellten. Bei psbC_new waren dies nur 309 von 485 (63,71%) Sequenzen; im Hinblick auf dieses Kriterium ist der Marker psbC_new_2 gegenüber dem psbC_new Marker als effektiver zu werten.

Es ist festzustellen, dass die beiden aus psbC entwickelten Primer bezüglich der drei genannten Kriterien (Spezifität, Diversität, morphologische Unterscheidung), nicht gänzlich an die Spezifität des rbcL Markers (Stoof-Leichsenring 2012) heranreichen. psbC_new wies zwar ebenfalls - wie rbcL - eine Diatomeenerkennungsrate von 100% auf (Spezifität), konnte jedoch nicht alle genetisch identifizierten Taxa den drei morphologischen Gruppen zuordnen, wohingegen psbC_new_2 bei geringerer Erkennungsrate sowohl zentrische, als auch raphide und araphide Arten zu unterscheiden wusste. In Bezug auf die Diversität zeigte der Marker psbC_new mit sieben identifizierten Arten sogar eine größere Bandbreite als rbcL, der sechs verschiedene Arten identifizieren konnte. Demgegenüber war es psbC_new_2 möglich, nur fünf verschiedene Arten zu identifizieren. Der Marker psbC_new steht dem rbcL Marker bezüglich der Spezifität somit in nichts nach und konnte bezüglich der Diversität in den vorliegenden Tests sogar eine Spezies mehr identifizieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Primer, die dem Chloroplastengenom entstammen, wesentlich bessere Ergebnisse liefern als jene aus dem Mitochondriengenom oder dem Kerngenom. Interessant zu untersuchen wäre, inwieweit ergänzende Tests zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Die Möglichkeit, mehrere Primer gleichzeitig auf einer Probe längerer Fragmente laufen zu lassen, bietet sich bei Sedimenten nicht an. Demzufolge wäre es beispielsweise sinnvoll, für vergleichbare Tests mit mehreren Primern, verschiedene Ansätze der gleichen Probe parallel laufen zu lassen und anschließend die Diversität zu bestimmen.

Im direkten Vergleich der drei Marker rbcL, V9 und psbC lässt sich erkennen, dass der Umfang der Referenzdatenbank eine große Rolle spielt: psbC ist ein spezifischer Marker, hat aber mit nur 553 relativ wenige Diatomeen-Referenzen. Dies erschwert die Identifizierung der einzelnen Taxa. Im Vergleich zu psbC besitzt rbcL in der NCBI-Datenbank derzeit 3833 Einträge für Diatomeensequenzen. rbcL ist ein sehr spezifischer Marker, der aber immer noch weniger Referenzen besitzt als 18s. Für 18s befinden sich derzeit 5649 Einträge in der Datenbank. 18s ist jedoch weniger spezifisch als rbcL, was zur Schlussfolgerung führt, dass rbcL derzeit der am besten geeignete Marker für sedimentäre Diatomeen-DNA ist.

5.3 Vergleich von Primern und EcoPCR

Die Gegenüberstellung von genetischen Analysen an der Sedimentprobe und EcoPCR Ergebnissen zeigte deutliche Differenzen:

Die computertechnischen Analysen des rbcL Primers mit EcoPCR ergaben eine Spezifität von 90,41%; in der Praxis zeigte sich hingegen, dass alle vorliegenden Sequenzen als Diatomeen identifiziert wurden. Dieses Ergebnis überrascht, dennoch kann man davon ausgehen, dass weitere Tests mit diesem Primer das vorliegende Ergebnis relativieren und der Wert somit näher an 90% heranrückt. Für P026 gab EcoPCR nur eine Spezifität von 2,13% aus. Dieser Wert wurde im praktischen Test im Labor bei weitem überschritten; hier wurden 61% festgestellt. Diesbezüglich ist zu vermuten, dass der Anteil an Diatomeen in der Sedimentprobe relativ hoch war. V9 erhielt im Programm einen Wert von 3,99%, wohingegen der Wert in der genetischen Analyse auf 18 % anstieg. Der Marker psbC_new, dem in EcoPCR auf Artniveau eine Spezifität von 74,21 % zugeordnet wurde, ergab im genetischen Test ebenfalls eine unerwartete Rate von 100%. psbC_new_2 erhielt durch EcoPCR eine Spezifität von 80,73%, praktisch 72%.

Mit Blick auf die Anzahl der aus den Sedimentproben erhaltenen Klone lässt sich diskutieren, wie aussagekräftig bzw. wie vergleichbar die Daten der Primer und der EcoPCR sind. Wie in Abb. 7 u. 9 zu erkennen, schwankten die Zahlen der Stichproben zwischen n=12 und n=19. Es empfiehlt sich, die Versuche nochmals mit gleicher Stichprobenzahl für jeden Primer zu wiederholen, um die Ergebnisse abzusichern.

Bei der Analyse mit EcoPCR, die der artifiziellen Amplifizierung sowie dem Test der Primerspezifität diene, wurden Prokaryoten und Pilze sowie alle Säuger, einschließlich dem Menschen präanalytisch von der verwendeten Referenzdatenbank ausgeschlossen. Demnach lässt sich sagen, dass sowohl der rbcL Marker, als auch der neue Marker psbC_new aus einer Vielzahl von Pflanzen, Algen und anderen planktonischen Organismen sehr spezifisch nur Kieselalgen amplifiziert.

Trotz dieser Spezifität wurden teils große Unterschiede zwischen den in den Experimenten ermittelten Werten und den EcoPCR Werten errechnet. Eine mögliche Erklärung ist, dass die erstellte NCBI-Datenbank nicht eins zu eins der DNA-Mixtur einer sibirischen Seesedimentprobe entspricht; zum anderen aber reichen die wenigen durchgeführten Tests auf dem Sediment alleine nicht aus um statistisch relevante Aussagen treffen zu können.

Die Nutzung des aus der Untereinheit der *ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase* hervorgegangenen *rbcL* Markers zur Amplifizierung sedimentärer Diatomeen-DNA hat sich in der Methode des Metabarcodings bewährt. Zwischen den in dieser Arbeit untersuchten sedimentären DNA-Sequenzen zeigten sich teils große Unterschiede sowohl in der Länge, als auch bezüglich der identifizierten Arten. Die zudem teils fragmentierte, in den Sedimentproben befindliche DNA (D. Mitchell, Willerslev & Hansen, 2005) macht es gegenwärtigen Markern schwer (*rbcL* ausgeschlossen) spezifische Amplifikate zu erzeugen. Wie sich herausstellte, decken die hier entwickelten Barcoding-Marker *psbC_new* und *psbC_new_2* einen Großteil der in den Proben befindlichen Diatomeenarten ab und zeigen somit eine gute Spezifität und auch Diversitätserkennung. Folglich könnten die entwickelten Marker einen Beitrag zur weiteren Forschung an sedimentärer Diatomeen-DNA leisten.

6. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde mithilfe verschiedener Primer ein Beitrag geleistet zur Erstellung einer Referenzdatenbank für Kieselalgen des Großen Chabyda Sees in Zentral-Jakutien. Die Gegenüberstellung der angewandten Methoden der genetischen und morphologischen Analyse ließen eine Bestimmung der Taxa bis zum Gattungslevel zu. Es wurden verschiedene Primer entwickelt, von denen die beiden Primer *psbC_new* & *psbC_new_2* erfolgreich auf einer Sedimentprobe getestet und zur Identifizierung der vorhandenen Diatomeenarten herangezogen wurden. Die Primer wiesen geeignete Spezifitäts- und Diversitätsraten aus, mit Hilfe derer sich Aussagen über die Vielfalt der in Umweltproben befindlichen Taxa präzisieren lassen. Die Primer stellen somit einen Beitrag zur Forschung an Diatomeen dar und können für zukünftige Studien im Forschungsbereich der Paläoökologie Verwendung finden.

7. Ausblick

Die im Rahmen der Studie erhaltenen Daten führten aufgrund organisatorischer und methodischer Möglichkeiten nur bedingt zu Ergebnissen erhoffter Präzision. So wurden im Verlauf der Studie verschiedene Ansatzpunkte in den Methoden als verbesserungswürdig identifiziert.

Da beide Anläufe zur Erstellung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen der Algenkulturen unbefriedigende Ergebnisse lieferten - sie wiesen Verunreinigungen, nicht ausreichende Aufreinigung und Überzüge aus nicht identifizierbaren Substanzen

auf - sind zur genauen Bestimmung der Arten weitere Aufnahmen im REM anzufertigen. Hierzu liegen verschiedene Empfehlungen und Protokolle vor, die von der Diatomeen-Community bereitgestellt werden und für zukünftige Slide-Anfertigung Verwendung finden, bzw. erprobt werden sollten (z.B. R. Grethe *et al.*, 1970).

Da es nicht gelang, mit publizierten psbC Markern gute PCR-Produkte zu erhalten, sollten nachfolgend die neu entwickelten Primer psbC_new und psbC_new_2 ebenfalls auf den Algenkulturen getestet werden. Da von den Extrakten schlussendlich kaum noch DNA vorhanden war, müssten hierfür allerdings erst neue Extraktionen durchgeführt werden.

Durch die teils großen Unterschiede in Identifizierung und Sequenzzahl der einzelnen Primer, durch die die Ergebnisse angreifbar sind, bietet es sich an, die Referenzdatenbanken für die einzelnen Primer zunächst umfangreicher zu gestalten, bevor weitere Tests durchgeführt werden. Zudem könnten in die mit EcoPCR durchgeführten Analysen weitere Referenzen wie z.B. Pilze mit einbezogen werden. So könnte die Spezifität der eingesetzten Primer verifiziert oder falsifiziert werden.

Durch den parallelen Einsatz der in dieser Studie designten Primer und dem bereits vorhandenen rbcL Primer für Sediment-DNA werden sich zukünftige Studien in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Diatomeendiversität verbessern lassen. So werden neue Ergebnisse erzielt und genauere Rückschlüsse auf rezente und vergangene Umweltbedingungen gezogen werden können.

Zukünftige Studien an Diatomeen sollten durch den Einsatz verschiedenster Marker optimiert werden, um die vorliegenden Ergebnisse abzusichern und die Diversität der Taxa vergleichbar zu machen. Zudem ist die Forschung im Bereich der Entwicklung neuer Marker voranzutreiben.

8. Quellen

Aletsee, L., & Jahnke, J. (1992). Growth and productivity of the psychrophilic marine diatoms *Thalassiosira antarctica* Comber and *Nitzschia frigida* Grunow in batch cultures at temperatures below the freezing point of sea water. *Polar Biology*, 643–647. Retrieved from

Alverson, A. (2008). Molecular systematics and the diatom species. *Protist*, 159(3), 339–353.

Alverson, A. J., Jansen, R. K., & Theriot, E. C. (2007). Bridging the Rubicon : Phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms, 45, 193–210.

Amaral-zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., & Huse, S. M. (2009). A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes, 4(7), 1–9.

Bodén, P. (2016). Reproducibility in the Random Settling Method for Quantitative Diatom Analysis Author (s): Per Bodén Stable, Reproducibility in the random settling method for quantitative diatom analysis, 37(3), 313–319.

Bowler & Taberlet, mündliche Kommunikation

Campbell, Neil A., Reece, Jane B.: Biologie . 8. Aufl., München, 2009 by Pearson Deutschland GmbH

Cock, P. J. A., Chilton, J. M., Grüning, B., Johnson, J. E., & Soranzo, N. (2015). N. B. I. I. G. bioRxiv. C. S. H. L. J. D. 1101/014043Ete. J. a., Chilton, J. M., Grüning, B., Johnson, J. E., & Soranzo, N. (2015). NCBI BLAST+ integrated into Galaxy. *bioRxiv*, 014043.

Collins, R. a., & Cruickshank, R. H. (2013). The seven deadly sins of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 969–975.

Diekmann, A. B., & Herzsuh, U. (2005). Seesedimente als Archive des Klima- und Umweltwandels.

Evans, K. M., Wortley, A. H., & Mann, D. G. (2007). An Assessment of Potential Diatom “Barcode” Genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their Effectiveness in Determining Relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist*, 158(3), 349–364.

Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. a, Schofield, O., & Taylor, F. J. R. (2004). The Evolution of Modern Eukaryotic. *Science*, 305(July), 354–360.

Frost, G. V., Epstein, E. (2014). Tall shrub and tree expansion in Siberian tundra ecotones since the 1960s, 1264–1277.

- Garden, R. B., & Kingdom, U. (1993). Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Society*, 11–20.
- Ganßauge, R. (2001), Diatomeen, kleine Algen, große Wirkung, KGS Drawehn-Schule Clenze
- Godhe, A., Kremp, A., & Montresor, M. (2014). Genetic and microscopic evidence for sexual reproduction in the centric diatom *Skeletonema marinoi*. *Protist*, 165(4), 401–416.
- Goodwin TW (1974) Carotenoids and biliproteins. In: Algal Physiology and Biochemistry. Botanical
- Grethe R. Hasle and Greta A. Fryxell (1970). Diatoms: Cleaning and Mounting for Light and Electron Microscopy, Anniversary, S. (2015). American Microscopical Society, 57(1), 1–5.
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, Y., & Liu, Y. (2015). Comparison of potential diatom “barcode” genes (The 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2015), 1369–1380.
- Haeckel’s Protista Kingdom, American Naturalist, 1878, Vol.12(8), p.549 [Peer Reviewed Journal]
- Hamsher, S. E., Evans, K. M., Mann, D. G., Poul????kov??, A., & Saunders, G. W. (2011). Barcoding diatoms: Exploring alternatives to COI-5P. *Protist*, 162(3), 405–422.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–21.
- Iuncker, Steeve (April 10, 2013). "Yakutsk: The Coldest City on Earth". *LightBox (blog)*. Time. Retrieved April 10, 2013.
- Iwatani, N., Murakami, S., & Suzuki, Y. (2005). A sequencing protocol of some DNA regions in nuclear, chloroplastic and mitochondrial genomes with an individual colony of. *Polar Biosc.*, 18, 35–45.
- Kadereit, J. W., Körner, C., Kost, B., & Sonnewald, U. (2014). *Strasburger Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*.
- Kahlert, M., Kelly, M., Albert, R. L., Almeida, S. F. P., Bešta, T., Blanco, S., ... Vogel, A. (2012). Identification versus counting protocols as sources of uncertainty in diatom-based ecological status assessments. *Hydrobiologia*, 695(1), 109–124.
- Kaitaniemi, P., & Lintunen, A. (2010). Neighbor identity and competition influence tree growth in Scots pine, Siberian larch, and silver birch. *Annals of Forest Science*, 67(6), 604–604.
- Lubinski, D. et al., Diatoms of the United States, <https://westerndiatoms.colorado.edu>

Mann DG, Droop SJM (1996) 3. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia* **336**, 19-32.

Mann DG, Vanormelingen P (2013) An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **60**, 414-420.

Matveev, I. A. "Agricultural Atlas of the Republic Sakha (Yakutia)." (1989).

Monographs No. 10 (ed. Stuart, W. D. P.). Oxford, UK, Blackwells. 176-205. + zi

Mitchell, D., Willerslev, E., & Hansen, a. (2005). Damage and repair of ancient DNA. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1-2), 265–276.

National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S. S., Ermini, L., Sarkissian, C. Der, Haile, J., Hellstrom, M., ... Willerslev, E. (2014). Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 370(1660), 20130383–20130383.

Pestryakova, L. a., Herzschuh, U., Wetterich, S., & Ulrich, M. (2012). Present-day variability and Holocene dynamics of permafrost-affected lakes in central Yakutia (Eastern Siberia) inferred from diatom records. *Quaternary Science Reviews*, 51, 56–70.

Prihoda, J., Tanaka, A., De Paula, W. B. M., Allen, J. F., Tirichine, L., & Bowler, C. (2012). Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1543–1557.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BARCODING, BOLD : The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7(April 2016), 355–364.

River diatoms: a multiaccess key: <http://craticula.ncl.ac.uk/EADiatomKey/html/introduction.html>

Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990) The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. Cambridge University Press.

Shepashenko, D., Shvidenko, a., & Nilsson, S. (1998). Phytomass (live biomass) and carbon of Siberian forests. *Biomass and Bioenergy*, 14(1), 21–31.

Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., & Meredith, D. (2010). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water, *19*, 21–31.

Stoof-leichsenring, K. R., Epp, L. S., & Trauth, M. H. (2012). Hidden diversity in diatoms of Kenyan Lake Naivasha : a genetic approach detects temporal variation.

Tan, S. N., Lim, H. C., Teng, S. T., Lim, P. T., & Leaw, C. P. (2015). Pseudo-nitzschia species (Bacillariophyceae) identification and delineation using mitochondrial cox1 gene sequences as compared to LSU rDNA. *Fisheries Science*, *81*(5), 831–838.

Trobajo, R., Mann, D. G., Clavero, E., Evans, K. M., Mcgregor, R. C., Trobajo, R., ... Evans, K. M. (2010). The use of partial cox1 , rbcL and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the Nitzschia palea species complex (Bacillariophyceae) The use of partial cox 1 , rbc L and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the Nitzschia palea species complex (Bacillariophyceae), 0262(June 2016).

Van Baalen, C., & O'Donnell, R. (1983). Isolation and Growth of Psychrophilic Diatoms from the Ice-edge in the Bering Sea. *Microbiology*, *129*(4), 1019–1023.

Van De Vijver, B., Gremmen, N. J. M., & Beyens, L. (2005). The genus Stauroneis (Bacillariophyceae) in the Antarctic region. *Journal of Biogeography*, *32*(10), 1791–1798.

Zhang, W., Miller, P. A., Smith, B., Wania, R., Koenigk, T., & Ralf, D. (n.d.). Tundra shrubification and tree-line advance amplify arctic climate warming : results from an individual-based dynamic vegetation model, 034023.

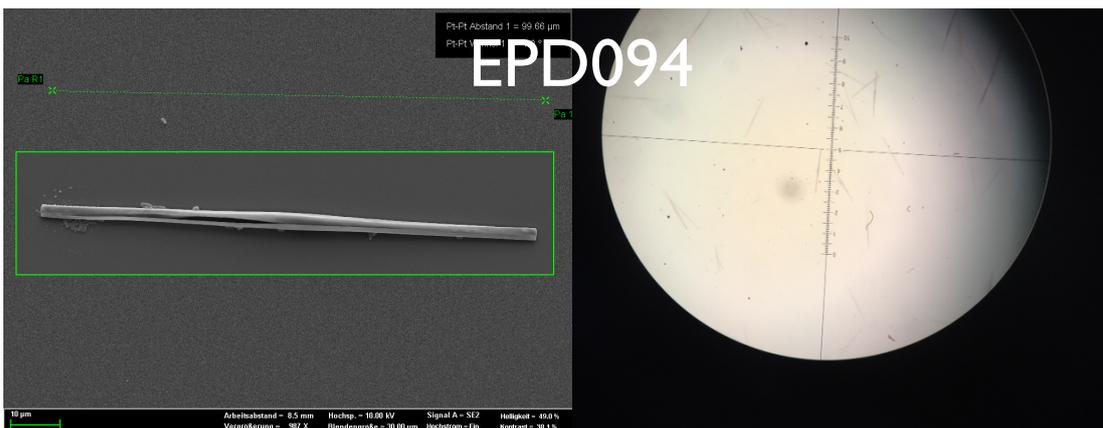
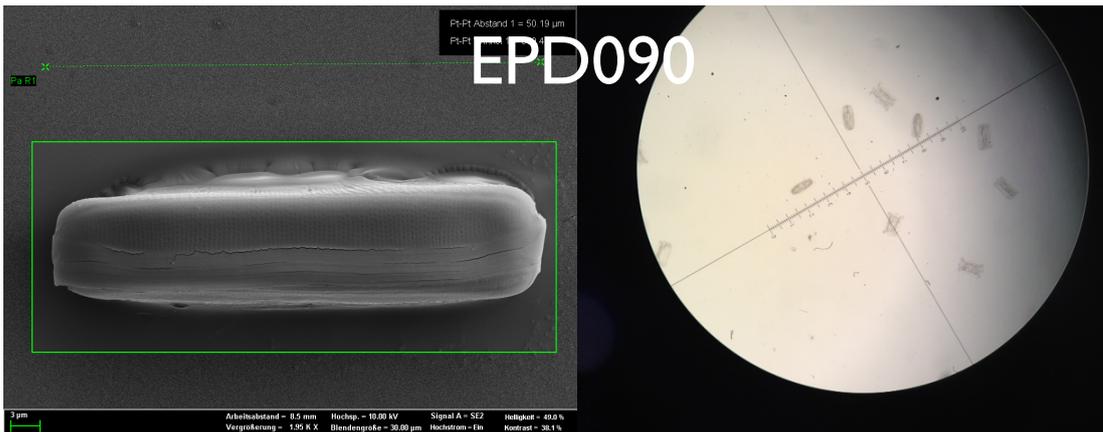
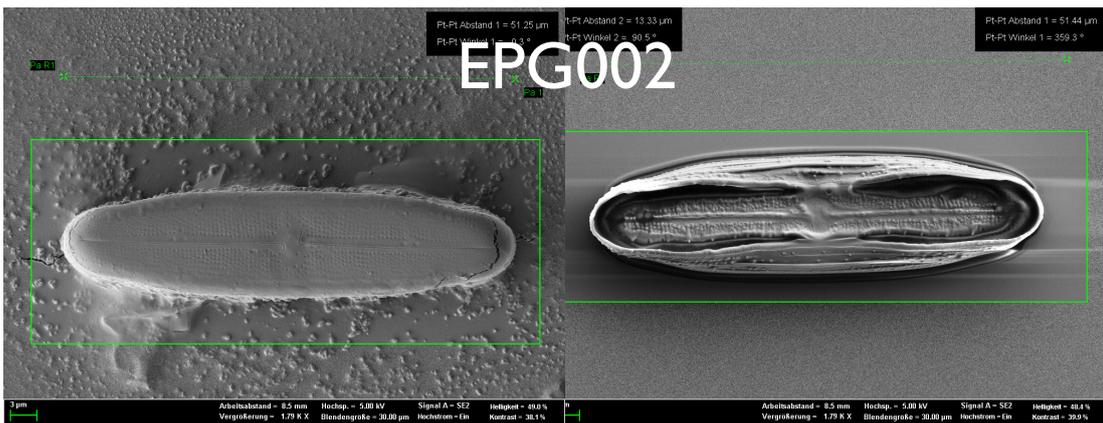
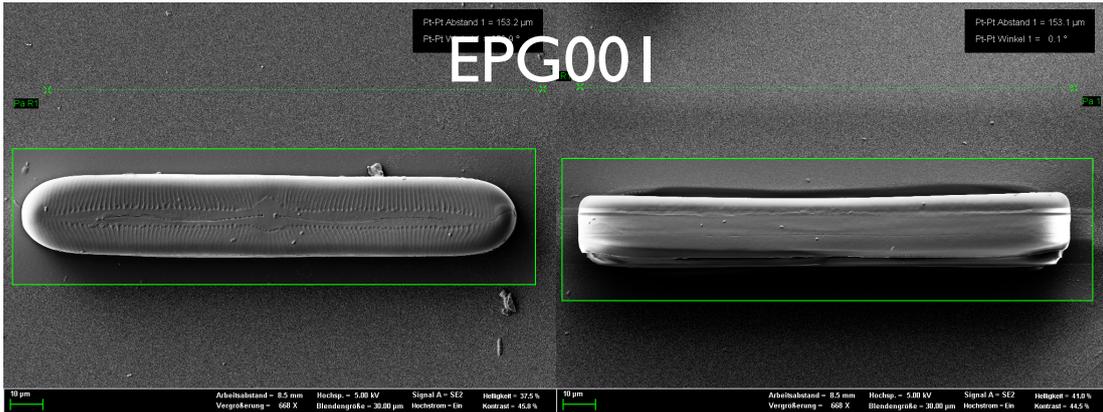
Zimmermann, J. (2014). DNA Barcoding and eDNA Barcoding in Diatoms, (November), 134.

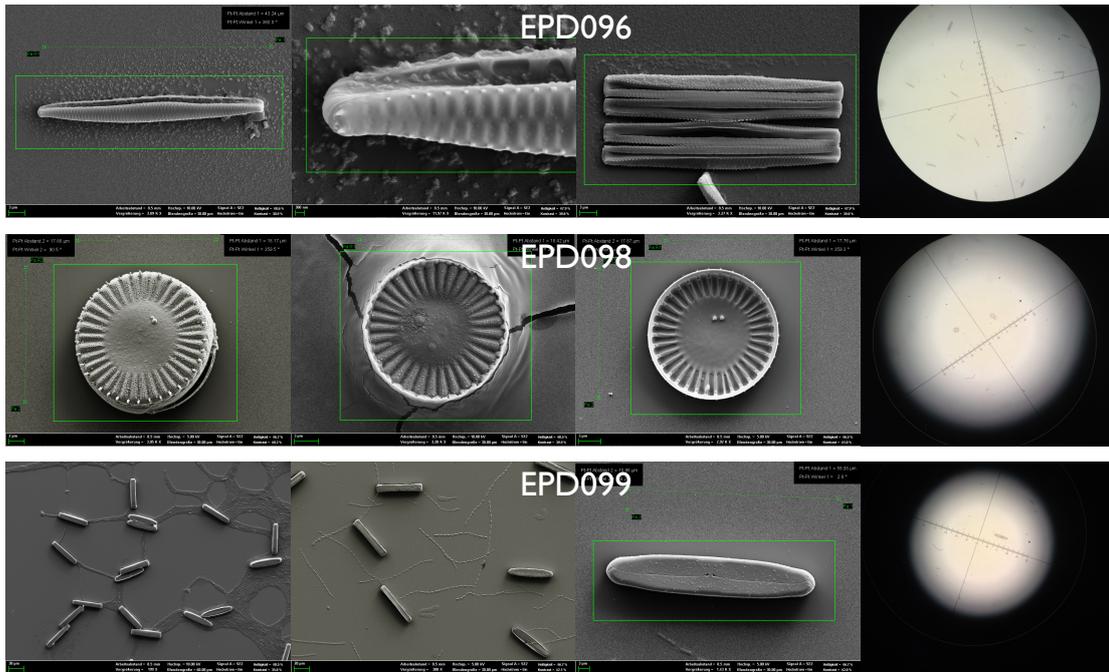
Zimmermann, J., Jahn, R., & Gemeinholzer, B. (2011). Barcoding diatoms: Evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols. *Organisms Diversity and Evolution*, *11*(3), 173–192.

Zimmermann, J., Jahn, R., Enke, N., Gemeinholzer, B., Garden, B., Berlin-dahlem, B. M., ... Fisheries, I. (2014). Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies.

Quelle Satellitenbilder: Programm „Karten“ (Copyright © 2012–2013 Apple Inc.)

9. Anhang





Rasterelektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Aufnahmen der Diatomeen aus den Monokulturen EPG001, EPG002, EPD090, EPD094, EPD096, EPD098 und EPD099 (keine Aufnahmen für Proben EPG008 und EPG009)