

Sexuelle Reproduktion und klonales Wachstum in kleinen Populationen von *Antennaria dioica* (L.) GAERTNER

Christoph ROSCHE, Karin SCHRIEBER, Heidi HIRSCH, Thomas BLACHNIK, Sabrina TRÄGER, Frank RICHTER, Gunnar SEIDLER und Isabell HENSEN

8 Abbildungen und 9 Tabellen

Abstract

ROSCHÉ, C., SCHRIEBER, K., HIRSCH, H., BLACHNIK, T., TRÄGER, S., RICHTER, F., SEIDLER, G., HENSEN, I.: Sexual reproduction and clonal growth in small populations of *Antennaria dioica* (L.) GAERTNER. - Hercynia N. F. 47 (2014): 59 – 86.

Ongoing habitat fragmentation and land use changes pose major threats leading to reduced plant fitness in small and isolated populations. For plant species that can propagate either sexually or asexually, this is assumed to cause a shift towards the vegetative reproduction. Plant populations that exhibit prolonged clonal growth have been referred to as remnant populations, since the loss of genets and consequently the reduction of effective population size induce mechanisms which accelerate further declining of populations. Hence, for clonally reproducing species, it was frequently shown that declining populations exhibit so-called sexual extinction which may be particularly pronounced in dioecious species due to skewed sex ratios.

Antennaria dioica is a dioecious species that reproduces mainly clonally. In Central European grasslands, *A. dioica* is a rapidly decreasing species which is associated to semi-natural plant communities. In our study, we examined the effect of decreasing population size on the clonal structure and the sex ratio which both inherently determine the effective population size. In consequence, we asked whether sexual reproduction is derogated in small populations with skewed sex ratios.

Based on field surveys, we estimated population size and sex ratio of 32 populations. Furthermore, we acquired data on plant fitness and habitat conditions (soil profundity, height of surrounding vegetation, nitrogen content in the soil). In order to evaluate the clonal structure of the populations, we collected leaf samples for subsequent AFLP analysis. In addition, we estimated the seed set and the germination of 17 populations.

The majority of the examined populations were rather small consisting of less than ten patches. Our results demonstrated that increasing height of the surrounding vegetation leads to considerable loss of plant fitness. In the AFLP analysis, we found striking evidence that the small populations consists of only a few genets. Our analyses revealed that stochasticity in sex ratio increased with decreasing population size while fruit set increased with the size of the sampled stands.

We reasoned that the loss of clonal diversity and reduced sexual reproduction contribute to the recently observed declines of population sizes. Hence, we argue that prolonged and almost exclusive clonal growth may ultimately result in sexual extinction which implies fundamental consequences for population viability. Furthermore, we hypothesise that successful sexual reproduction is crucial to balance stochastic losses of genets. Without appropriate conservation activities, the vast majority of our examined *A. dioica*-populations are subjected to face an extremely high risk of extinction in the near future.

Key words: clonal diversity, oligoclinality, dioecy, sex ratio, sexual extinction

1 Einleitung

Anthropogen verursachte Umweltveränderungen verschlechtern die Habitatqualität für viele bedrohte Pflanzenarten. Solche Umweltveränderungen stellen beispielsweise Eutrophierung (BOBBINK et al. 2010),

die Veränderungen traditioneller Landnutzungsformen (POSCHOLD et al. 2005) oder die Einführung invasiver Arten (SHAH et al. 2014) dar. Des Weiteren tritt Habitatfragmentierung als Folge der anhaltenden Urbanisierung auf (YOUNG et al. 1996), wodurch es zu einer permanenten Umstrukturierung und Zerstörung von Lebensräumen kommt (FISCHER & LINDENMAYER 2007). Die Geschwindigkeit dieser Prozesse hat ein erdgeschichtlich unvergleichbar hohes Ausmaß erreicht, wodurch es zu starken Populationsrückgängen vieler Arten kommt (CHAPIN III et al. 2000). Die Populationen sind meist räumlich isoliert und weisen häufig nur noch wenige Individuen auf. Die Reduktion der Populationsgröße kann zur Verminderung der Fitness, d. h. der Fähigkeit eines Individuums im Raum präsent zu bleiben und vermehrungsfähige Nachkommen zu erzeugen (BRESINKY et al. 2008), durch Allee-Effekte führen (ALLEE et al. 1949), die durch nicht-genetische Faktoren (z. B. demografische und umweltbedingte Zufallserscheinungen) als auch durch genetisch-stochastische Faktoren ausgelöst werden (SHAFFER 1987).

Bei Pflanzen, die sowohl zu sexueller als auch zu klonaler Reproduktion befähigt sind, kann dies zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den beiden Fortpflanzungsformen zu Gunsten der klonalen Reproduktion führen (ECKERT 2002). Durch die asexuelle Bildung von Ramets (d. h. vegetativ entstandenen und physiologisch eigenständigen Einheiten eines Klons) können viele Pflanzenarten ungünstige Standortbedingungen überdauern, bis durch Verbesserung der Habitatqualität die ressourcen-aufwändigere sexuelle Vermehrung wieder ermöglicht ist. Solche überdauernden Populationen sind jedoch im Sinne der "route to extinction"-Theorie besonders stark vom Aussterben bedroht (HONNAY & BOSSUYT 2005). Ausschlaggebend für das erhöhte Aussterberisiko ist häufig ihre überalterte demografische Struktur. Während die asexuell propagierenden, klonalen Linien altern, findet kaum Keimlingsetablierung statt und somit auch keine Verjüngung mittels neuer Genets (d. h. genetisch eigenständigen Individuen, die durch sexuelle Reproduktion entstanden sind). Durch intraspezifische Konkurrenz zwischen den Genets (HARTNETT & BAZZAZ 1985) sowie durch Akkumulation von Mutationen im Genom überalterter klonaler Linien (KLEKOWSKI 1988) verlieren betroffene Populationen sukzessive weitere Genets, wodurch in den Populationen Oligoklonalität (d. h. wenige Genets in einer Population) entsteht. So können auch großflächige Populationen infolge einer oligoklonalen Struktur sehr kleine effektive Populationsgrößen (d. h. die für die sexuelle Fortpflanzung relevante genetische Diversität; FRANKHAM 1995) besitzen. Populationen, die aus wenigen Genets bestehen, können sich also bereits in einem Aussterbeprozess befinden, welcher jedoch von der Langlebigkeit der Individuen überdeckt wird. Dabei könnte insbesondere eine durch Oligoklonalität bedingte Reduktion der sexuellen Reproduktion eine zentrale Rolle spielen (HONNAY & BOSSUYT 2005).

Die kausalen Zusammenhänge zwischen anthropogenen Habitatveränderungen, der daraus resultierenden Reduktion der Populationsgröße und einer folglich verringerten generativen Reproduktion müssen für bedrohte Arten unter Einbezug der Besonderheiten ihrer Reproduktionssysteme betrachtet werden. Insbesondere diözische Arten sind massiv von sinkenden oder fluktuierenden Populationsgrößen betroffen und haben daher ein vergleichsweise hohes Aussterberisiko (VAMOSI & VAMOSI 2005). Mit abnehmender Populationsgröße nimmt das Risiko für stochastische Schwankungen im Geschlechterverhältnis zu (SCHRIEBER 2011). Je nach Richtung der Unausgewogenheit kann es dabei zu Diasporen- oder Pollenlimitation kommen (ÖSTER & ERIKSSON 2007, KAPLAN 1972). Dies kann wiederum zu einer bedeutenden Reduktion der effektiven Populationsgröße und im Extremfall zum vollständigen Verlust der sexuellen Reproduktionsfähigkeit führen.

Um die beschriebenen Zusammenhänge zu untersuchen, wurde *Antennaria dioica* (L.) GAERTNER 1791 (Gewöhnliches Katzenpfötchen, Asteraceae) als Modellart gewählt. Die diözische Art ist zur klonalen Vermehrung befähigt. Das Gewöhnliche Katzenpfötchen wird auf der Roten Liste Deutschlands als „deutschlandweit gefährdet mit regional stärkerer Bedrohung“ geführt (KORNECK et al. 1996) und steht seit 1998 nach dem Bundesnaturschutzgesetz unter besonderem Schutz. In vielen Teilen Deutschlands (v. a. in den Tiefländern und Mittelgebirgen) befindet sich die Art in einem sehr starken Rückgang (vgl. u. a. SCHWABE 1990, 1991, ZIMMERMANN 1996, FRANK & NEUMANN 1999, GATTERER & NEZADAL 2003, FUKAREK & HENKER 2006, FELDT 2008, ROMAHN 2009, BLACHNIK 2012).

Anliegen dieser Arbeit ist es, den Rückgang von *A. dioica* im Untersuchungsgebiet unter Betrachtung der Habitatbedingungen und reproduktionsökologischen Aspekte zu analysieren. In diesem Kontext wurde

der Fokus auf den Einfluss der klonalen Diversität und des Geschlechterverhältnisses auf den Erfolg der sexuellen Reproduktion gelegt. Unsere Studie verfolgte folgende Ziele:

- 1) Bestimmung der Populationsgröße der untersuchten *A. dioica*-Populationen,
- 2) Untersuchung des Einflusses der Habitategenschaften auf die Fitness von *A. dioica*,
- 3) Kennzeichnung der klonalen Struktur der untersuchten *A. dioica*-Populationen,
- 4) Untersuchung des Einflusses der Populationsgröße auf das Geschlechterverhältnis und des daraus resultierenden Erfolges der sexuellen Reproduktion.

2 Methoden

2.1 Studienobjekt: Das Gewöhnliche Katzenpfötchen

Antennaria dioica (L.) GAERTNER ist ein immergrüner, plurienn-pollakanther Hemikryptophyt. Die oberirdisch gebildeten, zwei bis fünf Zentimeter langen Ausläufer können Wurzeln hervorbringen und vegetativ neue Klone generieren (KUTSCHERA & LICHTENEGGER 1992, JÄGER 1957). Dadurch entstehen kohärente Bestände orthotroper Halbrosettengeflechte, die zum Teil dichte Matten eng stehender Ramets bilden („Phalanx-Typ“ nach STÖCKLIN 1992, HENSEN 1997). Diese Matten oder Flecken werden im Folgenden als Patches bezeichnet. Ein Patch wurde in unserer Studie als ein zusammenhängender Fleck von Rosetten, an dessen Peripherie im Abstand von mindestens 20 cm keine weitere Rosette existiert, definiert. Dabei ist es nicht möglich, morphologisch zu bestimmen, wie viele genetische Individuen sich in den Halbrosettengeflechten befinden, da sich die Stolone zwischen den Rosetten meist nach Ende der Vegetationsperiode auflösen (SCHWABE 1990). Die Lebensfähigkeit der Rosetten ist auf ein Jahr bis wenige Jahre begrenzt (FELDT 2008). Wie alt ein Genet werden kann, ist nicht bekannt.

Antennaria dioica weist ein diözisches Reproduktionssystem mit eindeutigen Sexualdimorphismen auf, welche eine optische Geschlechterbestimmung im Feld ermöglichen (vgl. HEGI 1979). Weibliche Individuen bilden längliche, schmale Körbchen mit langen und schmalen Involucralblättern aus, während männliche Individuen breite, rundliche Körbchen mit breiten und runden Involucralblättern entwickeln. Die Art ist entomophil und wird von verschiedenen Apoiden, Syrphiden, Formiciden, Coleopteren und Lepidopteren bestäubt (KNUTH 1898). Im Gegensatz zu dem Großteil der über 40 *Antennaria*-Spezies, die fakultativ agamosperm sind, werden die anemochoren Achänen von *A. dioica* obligat sexuell gebildet (URBANSKA 1985). Die Art bildet keine persistente Diasporenbank aus, da die Samen maximal zwei bis drei Jahre lebensfähig bleiben können (VOGLER 1901, SCHÜTZ 1989).

In den mitteleuropäischen Tiefländern besiedelt *A. dioica* halbnatürliche Trocken- und Halbtrockenrasen. Die Art gilt als Flachwurzler, da sie laut FELDT (2008) „nur noch dort wächst, wo die Bodentiefe zwischen 8 – 11 cm liegt“. *Antennaria dioica* ist sehr lichtliebend (Lichtzeigerwert 8, ELLENBERG et al. 2001) und dadurch an magere und kurzrasige Bedingungen gebunden (FELDT 2008). PARTZSCH (2011) konnte zeigen, dass das Gewöhnliche Katzenpfötchen als eine Zeigerart historisch alter Xerothermrasen zu betrachten ist, deren Artenzusammensetzung sich als Folge der Aufgabe traditioneller Nutzungsformen in den vergangenen Jahrzehnten stark verändert hat. Da *A. dioica* innerhalb der von ihr besiedelten Phytozönosen eine besonders hohe Sensibilität für Landnutzungsveränderungen aufweist (BRAUN-BLANQUET 1949), verweist SCHWABE (1990) auf die besondere Bedeutung der Art als Indikator für die durch Brachlegung und Düngung verursachten Veränderungen in nährstoffarmen, halbnatürlichen Graslandschaften: „*Antennaria* vermag sich in höher wüchsigen Brachen nicht zu halten...sie reagiert sehr viel rascher auf Düngungseinflüsse als die restliche Phytocoenose (*Festuco-Genistetum saggitalis*)“. Laut SCHWABE (1991) kann somit das Verschwinden von *A. dioica* anzeigen, dass sich die Zusammensetzung der Pflanzengesellschaft am Standort in den darauffolgenden Jahren verändern wird. Dies unterstreicht die Bedeutung, die dem Rückgang von *A. dioica* im Untersuchungsgebiet beigemessen werden sollte.

2.2 Untersuchungsgebiet

Im Untersuchungsgebiet (Westtschechische Republik, Nord-, Ost- und Mitteldeutschland, Abb. 1) wurden im Sommer 2010 32 Populationen beprobt (Tab. 1, vgl. ROSCHÉ 2011). Für viele Teile des Untersuchungsgebiets wie Schleswig-Holstein (vgl. ROMAHN 2009) oder das Bayerische Vogtland (vgl. BLACHNIK 2012) wurde bereits berichtet, dass viele ehemalige Vorkommen innerhalb der letzten Jahrzehnte erloschen sind.

Standorteigenschaften

Die Standorte der untersuchten Populationen waren sehr vielfältig. Sie umfassten einen Höhengradienten von 2 m (FM, Abk. s. Tab. 1) bis 973 m ü. NN (RV), mittlere Jahresniederschläge von 490 mm (LH) bis 926 mm (BD) und Jahresmitteltemperaturen von 4,4 °C (BD) bis 9,2 °C (LN) (HIJMANs et al. 2005). *Antennaria dioica* war im Untersuchungsgebiet auf sandigen bis lehmigen Böden anzutreffen, deren pH-Werte sich vom extrem sauren (RN, pH = 4,16, SCHRIEBER 2011) bis in den alkalischen (MR, pH = 7,58, SCHRIEBER 2011) Bereich erstreckten. Die Böden waren Torfmoor-, Serpentin- und Lössböden, Rendzinen, Ranker und Lehmmergel. In 24 der 32 untersuchten Populationen wurden Pflegemaßnahmen durchgeführt (Tab. 1). Die Vielfältigkeit der Standorte spiegelte sich in 13 verschiedenen Pflanzengesellschaften wider, in denen die *A. dioica*-Populationen angesiedelt waren (Ergebnisse hier nicht dargestellt, vgl. dazu SCHRIEBER 2011).

2.3 Untersuchungen artbezogener Merkmale

2.3.1 Bestimmung der Populationsgröße der untersuchten *A. dioica*-Populationen

Die Patches der Populationen wurden im Gelände gesucht und markiert. Anschließend wurde die Populationsgröße als Anzahl an Patches sowie als kumulative Patchfläche beschrieben. Die kumulative Patchfläche stellt ein Maß der Fläche dar, die *A. dioica* in der untersuchten Population insgesamt einnimmt, wenn alle Patches zu einer Gesamtfläche addiert würden. Zur Bestimmung der kumulativen Patchfläche wurden 20 zufällig gewählte Patches mit Stöcken umgrenzt und senkrecht von oben in einer Höhe von 1 m fotografiert (vgl. Abb. 3). In das umgrenzte Patch wurde ein Maßstab gelegt und die Deckung von *A. dioica* geschätzt (vgl. Abb. 3). Mit der Software ArcMap v. 8.1 (ESRI, New Redlands, USA) konnten mithilfe der Fotos unter Verwendung der Lineal-Referenzen die Flächen der *A. dioica*-Patches ermittelt werden. Die Flächen wurden mit den geschätzten Deckungen verrechnet, um daraus eine Gesamtdeckungsfläche jedes einzelnen Patches, bzw. kumulativ über die gesamte Population abzuleiten. Waren mehr als 20 Patches in einer Population auffindbar, wurde aus den ermittelten 20 Einzelpatchflächen ein Mittelwert gebildet und mit der Anzahl aller Patches der Population multipliziert.

2.3.2 Untersuchung des Einflusses der Habitateigenschaften auf die Fitness von *A. dioica*

Um zu untersuchen, ob *A. dioica* mit ansteigender Tiefgründigkeit des Bodens schlechtere Möglichkeiten hat sich im Habitat zu behaupten, wurde die Tiefgründigkeit des Bodens in der Peripherie mit der im Zentrum der Patches verglichen. Mit Hilfe eines Metallstabes erfolgte dazu an 20 zufällig gewählten Patches pro Population ein Einstich im Zentrum des jeweiligen Patches und vier an seiner Peripherie.

Des Weiteren wurde an zehn Patches die mittlere Vegetationshöhe an der Peripherie der Patches erfasst. Zudem wurde je Population eine Mischprobe des Bodens genommen, deren Gesamtstickstoffgehalt mit einem C/N-Analyser Vario EL (Elementaranalysesysteme GmbH, Hanau, GER) nach der Methodik von BRUELHEIDE (2007) bestimmt wurde.

Um die Fitness von *A. dioica* einzuschätzen, wurden Daten zur Blühfähigkeit und zur vegetativen Fortpflanzung an zehn Patches erfasst. Innerhalb eines 50 x 50 cm-Holzrahmens wurde dafür die Anzahl der juvenilen Rosetten sowie der blühenden und nicht blühenden adulten Rosetten aufgenommen. Der Rahmen wurde in das Zentrum des Patch gelegt. Als juvenil wurden Rosetten, deren Durchmesser kleiner als 1,5 cm waren, und Ausläufer, die noch deutlich mit der Mutterpflanze in Verbindung standen, klassifiziert.

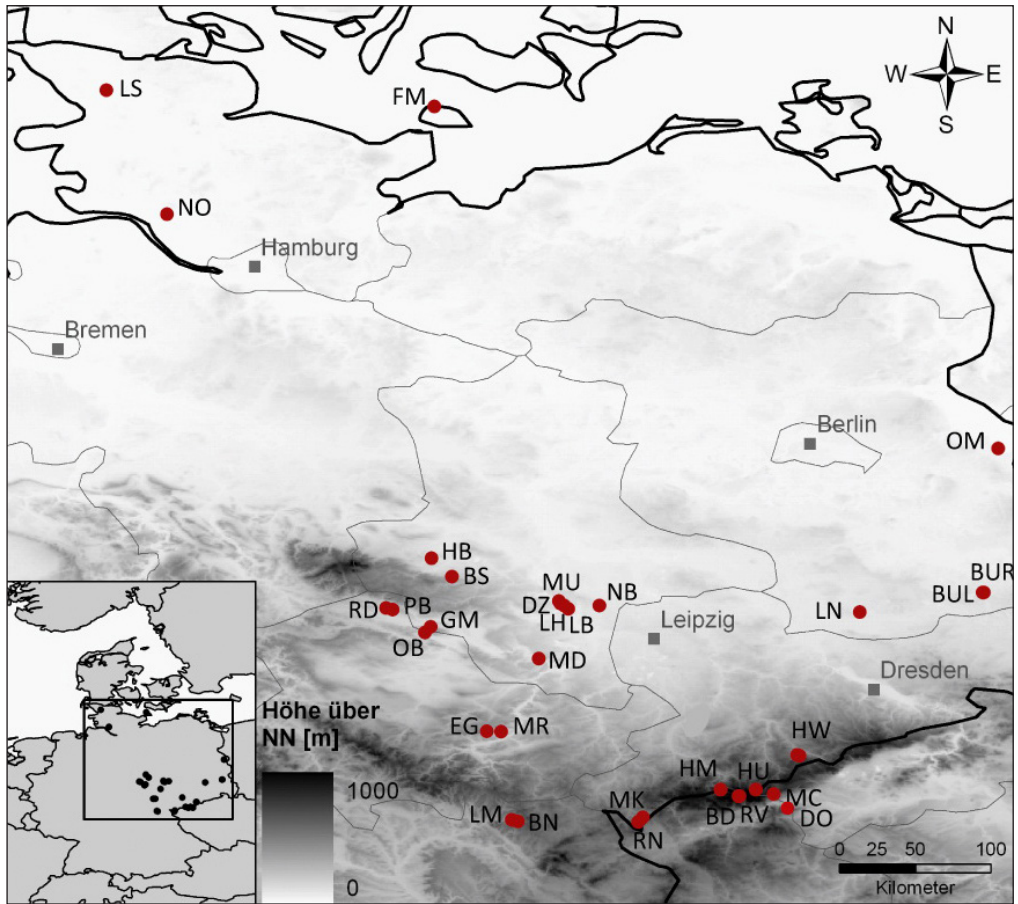


Abb. 1 Geografische Lage der untersuchten Populationen. Die Abkürzungen der Populationen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Fig. 1 Map with the locations of the investigated populations. Abbreviations correspond to the population IDs in Table 1.

Als adult galten alle Rosetten mit größerem Durchmesser. Die Blühfähigkeit ergab sich aus dem Verhältnis von blühenden zu nicht blühenden adulten Rosetten. Die vegetative Reproduktion wurde aus dem Verhältnis von adulten zu juvenilen Rosetten bestimmt.

2.3.3 Kennzeichnung der klonalen Struktur der untersuchten *A. dioica*-Populationen

Pro Population wurde aus den zehn ausgewählten Patches jeweils eine Blattprobe eines Ramet für die genotypischen Untersuchungen entnommen. Die Proben wurden über den größtmöglichen Abstand in den Populationen verteilt, um möglichst viele Genets zu erfassen. Bei Populationen, die aus weniger als zehn Patches bestanden (insgesamt in 22 der 32 Populationen; Tab. 1), wurden mehrere Proben aus einem Patch genommen. Bei sehr kleinen Populationen, die zum Teil nur noch aus einem Patch bestanden, sollte zusätzlich abgeschätzt werden, wie viele Genets in oligoklonalen Populationen bzw. innerhalb eines einzelnen Patches zu erwarten sind. Die Extraktion der DNA aus den Blattproben erfolgte nach dem ATMAB-Verfahren (DOYLE & DOYLE 1987) mit Änderungen nach ZIEGENHAGEN (1990). Die Ge-

Tab. 1 Übersicht über die untersuchten Populationen und ihrer Charakteristika.

ID = Populationsabkürzung; Region = Region, in dem die Population lokalisiert ist; kum. Patchfl. [m²] = kumulative Patchfläche; Hammerunterw. = Hammerunterwiesenthal; Zö, Halde Wind. = Zöblitz Halde an der Windmühle; SA = Sachsen-Anhalt; SN = Sachsen; FR = Franken; TH = Thüringen; BB = Brandenburg; CZ = Tschechische Republik; SH = Schleswig-Holstein. NSG = Naturschutzgebiet; VSG = Vogelschutzgebiet; FND = Flächenmaturdenkmal; FFH = Flora Fauna Habitat; LSG = Landschaftsschutzgebiet. Die Koordinatangaben von MK und RN werden auf Wunsch der UNB Sächsisches Vogtland nicht veröffentlicht und sind nur auf Anfrage bei dieser Institution einsehbar. Die Angaben zur Landschaftspflege wurden bei den Unteren Naturschutzbehörden oder direkt bei den Schäfereien erfragt. Beweidungsregime: S = Schafe; Z = Ziegen; R = Rinder; Hw = Huteweide; Sw = Standweide; Sfw = Staffälweide; Uw = Umtriebsweide. Die darauffolgenden Buchstaben geben an, ob an den Standorten eine Nachmahd (M), die Entfernung von Gehölzen (G), eine mechanische Bodenverwundung (V), Plaggen (P) oder Brennen (B) als Pflegemaßnahmen erfolgen.

Tab. 1 Characteristics of the investigated populations.

ID = abbreviation of the population; Region = region of the populations' locality; kum. Patchfl. [m²] = cumulative patch size; Hammerunterw. = Hammerunterwiesenthal; Zö, Halde Wind. = Zöblitz Halde an der Windmühle; SA = Saxony-Anhalt; SN = Saxony; FR = Franconia; TH = Thuringia; BB = Brandenburg; CZ = Czech Republic; SH = Schleswig-Holstein. NSG = integral nature reserve; VSG = bird sanctuary; FND = nature memorial area; FFH = flora fauna habitat; LSG = landscape conservation area. In respect to desire of the UNB Sächsisches Vogtland, the coordinates of the populations MK and RN are not published. These coordinates are only available after personal request to this institution. Information for the land use management was provided by nature conservation authorities or the sheep farms. Grazing regime: S = sheep; Z = goats; R = cattle; Hw = common pasture; Sw = stand grazing; Sfw = season grazing; Uw = rotational grazing. Subsequent letters corresponds to further management regimes; M = subsequent mowing; G = removal of bosk; V = mechanical soil treatment, P = sod plugging; B = burning.

ID	Populationsname	Region	Anzahl Patches	kum. Patchfl. [m ²]	Höhe über NN [m]	Breitengrad	Längengrad	Schutzstatus	Landschaftspflege
BD	Boží Dar	SN	4	0,21	966	50°24'40.86"	12°54'30.08"	NSG	-
BN	Bernstein	FR	3	Na	658	50°16'12.68"	11°33'17.91"	-	-
BS	Ballenstedt	SA	1	0,49	283	51°43'15.74"	11°11'57.54"	-	-
BUL	Bühlow links	BB	173	60,72	101	51°37'35.36"	14°21'39.25"	VSG	P G
BUR	Bühlow rechts	BB	47	12,68	101	51°37'41.54"	14°21'15.24"	VSG	P G
DO	Dobový vrch	CZ	3	Na	690	50°19'21.96"	13°12'34.49"	-	-
DZ	Döblitz	SA	48	10,6	88	51°33'40.34"	11°50'36.28"	NSG	S/Z (Hw)
EG	Engerda	TH	7	2,01	461	50°47'56.04"	11°24'18.75"	-	-
FM	Fehmarn	SH	1	0,73	2	54°31'47.54"	11°05'38.77"	-	-
GM	Goldener Mann	TH	36	5,08	164	51°25'22.16"	11°04'20.70"	-	-
HB	Harsleben	SA	1	0,27	283	51°49'52.06"	11°04'34.13"	NSG	S (Hw)

Fortsetzung Tab. 1

ID	Populationsname	Region	Anzahl Patches	kum. Patchfl. [m ²]	Höhe über NN [m]	Breitengrad	Längengrad	Schutzstatus	Landschaftspflege
HM	Halbemeil	SN	1	5,66	881	50°27'04.07"	12°47'48.31"	NSG	M
HU	Hammerunterw.	SN	4	6,55	865	50°27'02.02"	13°00'22.04"	FND	G
HW	Zö. Halde Wind.	SN	3	6,71	690	50°39'13.26"	13°15'58.87"	NSG	G
LB	Lunzberge	SA	1	0,54	83	51°31'50.33"	11°53'26.23"	NSG	S (Hw)
LH	Lerchenhügel	SA	8	2,06	147	51°32'53.01"	11°51'56.73"	NSG	S (Hw)
LM	Löhmar	FR	1	Na	554	50°15'42.30"	11°35'25.97"	-	M V
LN	Loben	BB	1	1,69	94	51°30'38.59"	13°37'27.83"	NSG	S (Hw) M
LS	Löwenstedt	SH	8	2,48	16	54°37'33.08"	9°08'51.58"	NSG	(Uw) M P B
MC	Médinéc	CZ	12	6,76	888	50°25'28.06"	13°06'42.18"	-	-
MD	Müncheroda	SA	1	Na	208	51°13'56.45"	11°42'55.15"	NSG	-
MK	Marktneukirchen	SN	2	0,89	538	50°17'xx.xx"	12°20'xx.xx"	FFH	G
MR	Martinsroda	TH	64	34,36	382	50°47'47.27"	11°29'29.32"	-	-
MU	Mücheln	SA	3	0,32	117	51°34'30.54"	11°50'02.74"	NSG	S (Hw)
NB	Niemberg	SA	1	0,36	118	51°32'59.61"	12°04'32.86"	FFH	S (Hw)
NO	Nordoer Heide	SH	7	0,86	23	53°53'11.09"	9°30'25.99"	FFH	R (Sw, Sfw)
OB	Ochsenburg	TH	2	0,18	216	51°23'20.61"	11°02'15.82"	NSG	S (Hw) R (Sw) M G
OM	Mallnow	BB	12	2,14	332	52°29'20.62"	14°26'46.26"	NSG	S/Z (Uw) G
PB	Pfaffenberg	TH	30	18,08	285	51°31'30.15"	10°50'57.42"	LSG	S (Hw) G V
RD	Rüdigsdorf	TH	39	19,55	269	51°32'04.82"	10°48'36.92"	NSG	S/Z (Hw)
RN	Raun	SN	1	0,09	590	50°15'xx.xx"	12°18'xx.xx"	-	G
RV	Ryznová	SN	1	0,95	973	50°24'45.25"	12°54'10.94"	NSG	-

notypisierung wurde mit AFLP-Markern vorgenommen (Vos et al. 1995). Die detaillierte Darstellung der DNA-Extraktion sowie des angewandten AFLP-Protokolls sind dem Anhang zu entnehmen. Die AFLP-Fragmentlängen wurden mit Hilfe des MegaBace-Sequencers (Amersham Bioscience, Amersham, UK) bestimmt. Zur Validierung der ermittelten Peaks wurden 47 Wiederholungen der insgesamt 254 analysierten Proben verwendet. Insgesamt konnten 168 polymorphe Loci genutzt werden. Bezüglich der 168 polymorphen Loci wurde innerhalb der 47 Wiederholungspaare eine Fehlerquote von 2,79 % errechnet (typische Fehlerquote bei AFLP-Analysen: 2 – 5 %, HANSEN et al. 1999). Die binäre Matrix wurde manuell aus den Profilen im Programm Fragment Profiler (Amersham Bioscience, Amersham, UK) erarbeitet. Die Identifikation von Klonen wurde nach dem Protokoll aus STEIN et al. 2014 durchgeführt. Pro Population und Patch wurde die Anzahl an Genets bestimmt. Proben, die den gleichen Genotyp aufwiesen, wurden als Ramets eines Klons notiert. Als Maß für die klonale Diversität der Populationen wurde der nach DORKEN & ECKERT (2001) modifizierte Index für klonale Diversität ($R = (G-1)/(N-1)$) berechnet, wobei G die Anzahl der determinierten Genets und N die Anzahl der analysierten Proben wiedergibt.

Um exemplarisch die klonale Struktur einer Population möglichst detailliert darzustellen, wurden im Zuge einer Vorstudie (TRÄGER 2010) in der Population LH (Lerchenhügel bei Brachwitz, Saalekreis) 43 Proben genommen. Je nach Größe der Patches wurden in größtmöglichem Abstand drei bis fünf Proben innerhalb eines Patches genommen, um möglichst viele Genets zu determinieren. Die Lage der Patches wurde schematisch kartiert.

2.3.4 Untersuchung des Einflusses der Populationsgröße auf das Geschlechterverhältnis und des daraus resultierenden Erfolges der sexuellen Reproduktion

Da es nicht möglich war, zu bestimmen, wie viele männliche und weibliche Individuen (Genets) in den Populationen vorhanden waren, wurde das Geschlechterverhältnis näherungsweise auf Patchebene abgeschätzt. In jedem Patch wurde dazu geprüft ob es männliche und/oder weibliche Blühtriebe enthielt. Patches ohne Blühtriebe wurden als nicht blühende Patches gezählt. Patches, die sowohl weibliche als auch männliche Blühtriebe enthielten, wurden für beide Geschlechter jeweils einmal gezählt.

In 17 Populationen wurden von Mitte Juli bis Ende August 2010 Achänen geerntet. Die Früchte wurden in drei Kategorien eingeteilt: Achänen, die prall, glatt, mäßig dunkel gefärbt und verhältnismäßig groß waren, galten als fertil. Achänen, die kleiner, faltig und schwärzlich gefärbt waren, wurden der Kategorie steril 1 und Achänen mit heller, häutiger, leerer Hülle wurden der Kategorie steril 2 zugeordnet (Abb. 2). Die sterilen Achänen der Kategorie 2 sind vermutlich unbefruchtete, leere Blütenhüllen, während die sterilen Achänen der Kategorie 1 mutmaßlich aus befruchteten Ovarien hervorgegangen sind, wobei es aber zu keiner vollständigen Fruchtentwicklung gekommen ist.



Abb. 2 Achänenkategorien mit einem Lichtmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung aufgenommen (Foto: SCHRIEBER 2011).

Fig. 2 Categories of achenes. Pictures were taken by using a light-optical microscope with tenfold magnification (Photo: SCHRIEBER 2011).

Die fertilen Achänen wurden auf Keimfähigkeit in einem Zeitraum von September bis Oktober 2010 getestet. Je Population wurden drei Wiederholungen á 50 Diasporen angesetzt. Waren mehr fertile Achänen vorhanden, wurde auf fünf Wiederholungen erweitert. Für den Keimversuch wurden Glaspetrischalen

nach standardisierten Methoden der internationalen Vorschriften für die Prüfung von Saatgut der ISTA (2008) verwendet. In die Petrischalen wurde ein PE-Gitter gelegt und darauf jeweils 50 Achänen auf einem Filterpapier platziert. Die Filter wurden anschließend mit demineralisiertem Wasser befeuchtet. Die Petrischalen wurden randomisiert in Lichtthermostate Typ 1301 (RU | MED, Laaten, GER) mit einem Temperatur- und Lichtwechsel von 10 °C bei Dunkelheit und 20 °C bei Licht in einem 12 h-Rhythmus platziert. Die Kontrolle auf gekeimte Achänen erfolgte dreimal wöchentlich über 45 Tage. Eine Achäne galt als gekeimt, wenn die Radicula oder die ergrünten Cotyledonen die Testa und die Fruchtwand durchstoßen hatten (BASKIN & BASKIN 1998). Die gekeimten Achänen wurden ausgezählt und anschließend entnommen.

2.4 Datenanalyse

Alle statistischen Analysen und deren grafische Visualisierung wurde mit dem Programm R (Ver. 2.15.1, R DEVELOPMENT CORE TEAM 2012) unter Verwendung der R-packages “nlme“ (PINHEIRO et al. 2010), “MASS“ (VENABLES & RIPLEY 2002), “lme4“ (BATES et al. 2011), “plotrix“ (LEMON 2006) und “WGCNA“ (LANGFELDER et al. 2011) durchgeführt. Alle Daten wurden AIC-basierten (Akaike Information Criterion, AKAIKE 1973) Transformationstests unterzogen und entsprechend transformiert. Nach CRAWLEY (2009) wurden die Daten, die auf Populationsebene erhoben wurden, mit linearen Modellen bzw. generalisierten linearen Modellen analysiert. Daten, deren Aufnahme wiederholt innerhalb einer Population aufgenommen wurde, wurden mit linearen gemischten Modellen bzw. generalisierten linearen gemischten Modellen analysiert, indem die Populationsidentität als Zufallseffekt einbezogen wurde (BOLKER et al. 2009). Aus den vollen Modellen wurde mittels schrittweiser Rückwärtsvereinfachung das minimal adäquate Modell ermittelt. Die statistischen Modelle der einzelnen Analysen sind im Anhang erläutert.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Populationsgröße der *A. dioica*-Populationen

23 von 32 Populationen bestanden aus weniger als zehn Patches (Tab.1). Die Anzahl an Patches schwankte zwischen einem Patch (BS, FM, HB, HM, LB, LM, LN, MD, NB, RN, RV) und 173 Patches (BUL). Die kumulative Patchfläche der Populationen schwankte zwischen 0,09 m² (RN) und 60,72 m² (BUL), wobei 11 der untersuchten Populationen eine kumulative Patchfläche von weniger als einem Quadratmeter aufwiesen (Tab. 1). Bemerkenswert ist, dass im Rahmen einer Vorstudie 2009 in der Population LH 11 Patches aufgefunden wurden (Abb. 4, TRÄGER 2010), während im Zuge der Untersuchungen für diese Studie im Jahr 2010 nur noch acht Patches wieder aufgefunden wurden (Tab. 1).

3.2 Einfluss der Habitateigenschaften auf die Fitness von *A. dioica*

Die Tiefgründigkeit des Bodens war an der Peripherie der Patches höher als in ihrem Zentrum (Median = 13 vs. 14 cm, Parameterschätzer = -0,16, $\chi^2_{(1)} = 8,01$, $p < 0,01$). Der prozentuale Anteil blühender Rosetten nahm mit zunehmender Höhe der Umgebungsvegetation ab (Parameterschätzer = -0,07, $\chi^2_{(1)} = 58,97$, $p < 0,001$). Auch der Anteil juveniler Rosetten sank mit steigender Vegetationshöhe (Parameterschätzer = -0,03, $\chi^2_{(1)} = 28,22$, $p < 0,001$). Der Stickstoffgehalt des Bodens ($0,32 \pm 0,25 \mu\text{mol/g}$ Trockenboden, vgl. SCHRIEBER 2011) hatte keinen signifikanten Einfluss, weder auf den Anteil blühender Rosetten noch auf den Anteil juveniler Rosetten.

3.3 Kennzeichnung der klonalen Struktur der *A. dioica*-Populationen

Aus den 254 analysierten Proben wurden 173 verschiedene Genotypen ermittelt. Der Vergleich von Proben, die innerhalb eines Patches genommen wurden, ergab, dass Patches nicht grundsätzlich nur aus einem Genet bestanden (Tab. 2). So wurden zum Beispiel für die sechs Proben des einzigen Patches der Population FM zwei Genets determiniert (Abb. 3a), wohingegen für die fünf Proben in der Population NB nur ein Genet determiniert wurde (Abb. 3b). In den Populationen BS, DO, HB, LB, OB und RN, die alle aus nur einem Patch bestanden, wurde nur ein Genotyp gefunden ($R = 0$, Tab. 3). Auffällig niedrige Werte des klonalen Diversitätsparameters wiesen zudem die Populationen MD ($R = 0,11$) sowie FM ($R = 0,2$) auf. In zehn Fällen konnten innerhalb der Populationen Klone determiniert werden, die nicht mehr zu einem gemeinsamen Patch gehörten. Auch die Kartierung der Population LH zeigte, dass Patches nicht immer aus nur einem Genet bestehen, und dass ein Genotyp auch auf mehrere Patches fragmentiert vorliegen kann (Abb. 4).

Tab. 2 Klonverteilung der Proben, die innerhalb eines Patches gesammelt wurden. N = Anzahl untersuchter Proben aus einem Patch; G = Anzahl identifizierter Genotypen. Die Abkürzungen für die Populationen sind Tab. 1 zu entnehmen. Bei Populationen, die zweimal aufgeführt sind, wurden in zwei Patches mehrere Proben gesammelt. In Klammern sind die Standardabweichungen (SD) für die Mittelwerte angegeben.

Tab. 2 Genet distribution of the samples which were collected within single patches. N = number of samples collected within a single patch; G = number of determined genets. Abbreviations correspond to the population IDs in Table 1. For populations which are listed twice, in two patches multiple samples were drawn. Standard derivations (SD) are given in parentheses

Population	N	G
BS	5	1
BUR	5	4
EG	3	2
FM	6	2
HM	5	5
HU	5	2
HU	4	2
HW	2	2
HW	10	7
LB	3	1
LH	2	1
LH	2	2
LN	6	3
LS	3	3
LS	2	1
MD	10	2
NB	5	1
NO	2	2
NO	3	1
OB	3	1
RN	2	1
Mittelwert	4,19 (2,37)	2,19 (1,54)

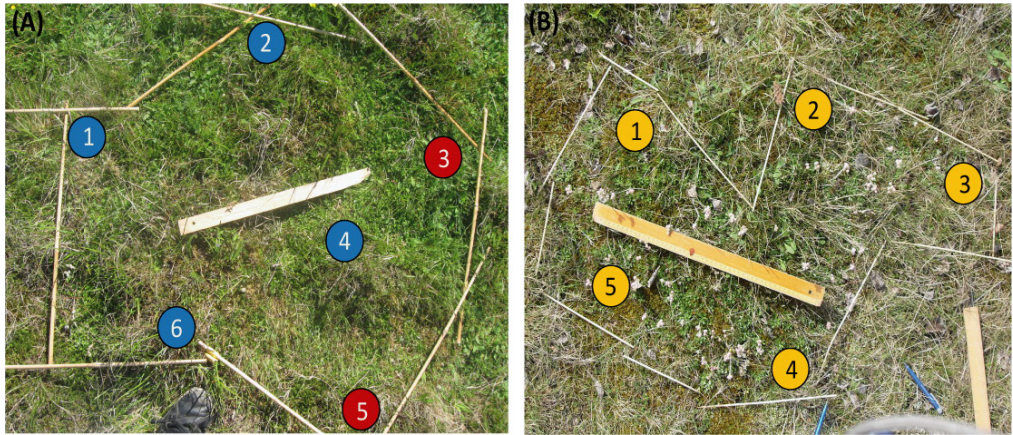


Abb. 3 Beispiele der Verteilung der gefundenen Genotypen innerhalb eines Patches in den Populationen FM (A) und NB (B). Die Kreise lokalisieren den Ursprungsort der Probe, die Farben stellen die determinierten Genotypen dar. Die Zahlen entsprechen den Original-Nummern der Proben der jeweiligen Population.

Fig. 3 Distribution of the determined genotypes within one patch, exemplarily showed for the populations FM (A) and NB (B). Dots represent the location of the sample and the numbers refer to the original number of the collected sample. Each colour corresponds to a distinct determined genotype.

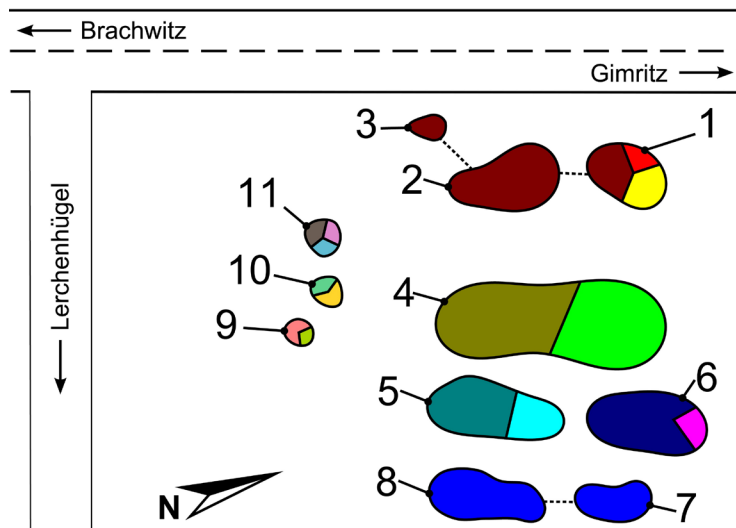


Abb. 4 Kartierung der *A. dioica*-Population LH im Jahr 2009. Die Farben geben die 17 verschiedenen Genets wieder. Der prozentuale Anteil der Fläche der jeweiligen Farben entspricht dem prozentualen Anteil des jeweiligen Genet an der Menge an Proben, die insgesamt in dem Patch genommen wurden. Die Patches 1, 2, 4, 5, 6 bestanden aus fünf beprobten Individuen und die Patches 3, 7, 8, 9, 10, 11 enthielten je drei beprobte Individuen.

Fig. 4 Distribution map of the patches in the population LH in 2009. Each colour corresponds to a distinct determined genotype. Area of the colour corresponds to the portion of the respective genotype within the samples in the patch. The patches 1, 2, 4, 5 and 6 consisted of five samples whereas the patches 3, 7, 8, 9, 10 and 11 consisted of three samples.

Tab. 3 Klonale Diversität der Populationen. N = Anzahl untersuchter Proben; G = Anzahl identifizierter Genotypen; R = modifizierter Index für klonale Diversität. Die Abkürzungen für die Populationen sind Tab. 1 zu entnehmen. In Klammern sind die Standardabweichungen (SD) für die Mittelwerte angegeben.

Tab. 3 Clonal diversity of the populations. N = number of samples; G = number of determined genets; R = modified index of clonal diversity. Abbreviations correspond to the population IDs in Table 1. Standard derivations (SD) are given in parentheses.

Population	N	G	R
BD	3	2	0,5
BN	3	3	1
BS	5	1	0
BUL	10	10	1
BUR	14	13	0,92
CB	6	2	0,2
DO	3	1	0
DZ	10	10	1
EG	10	9	0,89
FM	6	2	0,2
GM	11	9	0,8
HB	4	1	0
HM	5	5	1
HU	11	6	0,5
HW	13	9	0,67
LB	3	1	0
LH	11	10	0,9
LM	1	1	nd
LN	6	3	0,4
LS	11	9	0,8
MC	10	10	1
MD	10	2	0,11
MK	2	2	1
MR	12	11	0,91
MU	3	3	1
NB	5	1	0
NO	11	9	0,8
OB	3	1	0
OM	10	9	0,89
PB	10	10	1
RD	10	10	1
RN	2	1	0
RV	2	2	1
Mittelwert	7,15 (3,92)	5,39 (4,09)	0,61 (0,5)

3.4 Einfluss der Populationsgröße auf das Geschlechterverhältnis und der daraus resultierende Erfolg der sexuellen Reproduktion

Die Patches beinhalteten in 89% der Fälle nur ein Geschlecht. Das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patches war in vielen der beprobten Populationen von *A. dioica* mäßig bis stark unausgeglich (Abb. 5). Sieben Populationen beinhalteten einen höheren Anteil an männlichen Patches, während

19 Populationen einen höheren Anteil an weiblichen Patches aufwiesen. Unter den untersuchten Populationen befanden sich vier rein männliche und neun rein weibliche Bestände.

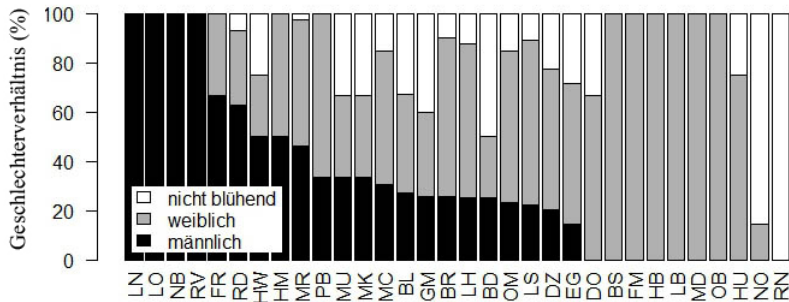


Abb. 5 Prozentuale Verteilung der Geschlechter innerhalb der Populationen. Zweigeschlechtliche Patches wurden für die Berechnung des Geschlechterverhältnisses als zwei verschiedene Patches mit unterschiedlichen Geschlechtern betrachtet. Die Abkürzungen der Populationen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Fig. 5 Proportion of male, female and non-flowering patches within the populations. In patches containing males and females, both sexes were considered as two distinct patches, and thus, included twice for the calculation of the sex ratio. Abbreviations correspond to the population IDs in Table 1.

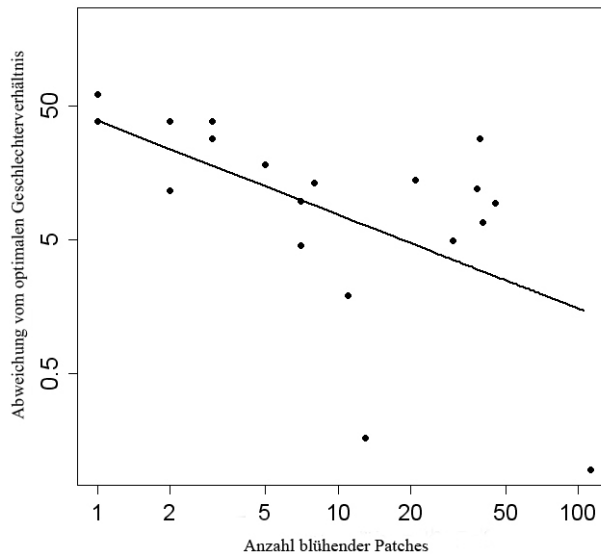


Abb. 6 Prozentuale Abweichung vom optimalen Geschlechterverhältnis (66 %) in Abhängigkeit von der Populationsgröße (y-Achse logarithmiert). Die Linie zeigt die Vorhersage des linearen Modells.

Fig. 6 Percental derivation from the optimum sex ratio (66 %) in dependence on the population size. The line represents the prediction of the linear model (y-axis logarithmised).

Der prozentuale Anteil weiblicher Patches in kleinen Populationen (ein bis 15 Patches) schwankte zwischen 0 und 100 %. In den mittelgroßen Populationen (16 bis 40 Patches) lag der Anteil der weiblichen

Patches zwischen 32 und 66 %, während dieser sich in den großen Populationen (> 40 Patches) zwischen 52 und 73 % bewegte. Die Schwankungen des prozentualen Anteils männlicher und weiblicher Patches nahmen mit zunehmender Populationsgröße ab (Parameterschätzer = $-0,7$, $F_{(1)} = 23,67$, $p < 0,001$, Abb. 6).

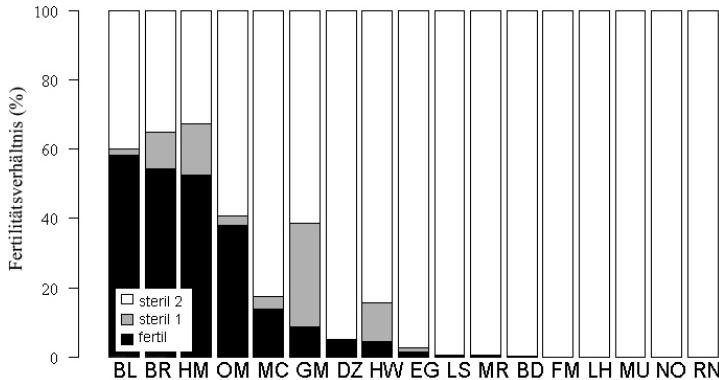


Abb. 7 Prozentuales Verhältnis von fertilen zu sterilen Früchten der Kategorie 1 und Kategorie 2. Die Abkürzungen der Populationen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Fig. 7 Proportion of fertile vs. sterile achenes of the category 1 and category 2. Abbreviations correspond to population IDs in Table 1.

Die Anteile an fertilen Achänen waren in den Populationen mäßig hoch bis sehr gering (Abb. 7), wobei er in den vier Populationen BUL, BUR, HM, OM vergleichsweise hoch war (38 bis 58 %). In acht Beständen (MC, GM, DZ, HW, EG, LS, MR, BD) wurden nur sehr wenige fertile Früchte (1 bis 17 %) und in fünf Populationen (FM, LH, MU, NO, RN) gar keine produziert. Die Anteile an sterilen Achänen der Kategorie 1 waren verhältnismäßig gering und schwankten in den Populationen zwischen 0 und 30 %. Die Anteile an sterilen Achänen der Kategorie 2 schwankten in den beprobten Beständen zwischen 33 und 100 %. Insgesamt waren nur in sieben der 17 Populationen mehr als 5 % der gesammelten Achänen fertil (Tab. 4). Der Anteil fertiler Achänen nahm mit der Anzahl der Patches in den Populationen signifikant zu (Parameterschätzer = $0,004$, $F(1) = 7,132$, $p < 0,05$), während der Anteil steriler Achänen der Kategorie 2 mit zunehmender Bestandsgröße abnahm (Parameterschätzer = $-0,004$, $F(1) = 5,166$, $p < 0,05$). Der prozentuale Anteil der weiblichen Patches hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Fertilität der Achänen in den Populationen.

Aufgrund des geringen Anteils fertiler Achänen (vgl. Abb. 7) waren in nur sieben von 17 Populationen genügend fertile Achänen für einen Keimversuch vorhanden. Die Keimfähigkeit der fertilen Achänen unterschied sich zwischen den Populationen sehr stark (Abb. 8). Die höchste Keimung wiesen die Populationen BUR (92,8 %) und BUL (80,8 %) auf. Die Populationen MC, OM, und HM zeigten sehr ähnliche Keimverläufe mit einer Keimung von 52 bis 55,2 %. Das geringste Keimvermögen wiesen die Populationen DZ (19,6 %) und GM (6,8 %) auf. Die meisten Diasporen keimten zwischen dem siebten und 13. Tag. Danach liefen kontinuierlich weniger Achänen bis zum Ende der 45tägigen Beobachtungszeit auf. Weder die Populationsgröße noch der Anteil der weiblichen Patches hatten einen signifikanten Einfluss auf die Keimfähigkeit.

Tab. 4 Geschlechterverhältnis und Anteil keimfähiger Achänen in den Populationen. ♀: Anzahl weiblicher Patches; ♂: Anzahl männlicher Patches; ♀♂: Anzahl an Patches, in denen beide Geschlechter gefunden wurden; n. b. = Anzahl nicht blühender Patches; steril 1 = Anteil steriler Achänen der Kategorie 1; steril 2 = Anteil steriler Achänen der Kategorie 2; fertil = Anteil steriler Achänen; n. u. = nicht untersucht.

Tab. 4 Sex ratio and proportion of fertile achenes of the investigated populations. ♀: number of female patches; ♂: number of male patches; ♀♂: number of patches including both sexes; n. b. = non-flowering patches; steril 1 = proportion of sterile achenes of the category 1; steril 2 = proportion of sterile achenes of the category 2; fertil = proportion of fertile achenes; n. u. = not analysed.

Population	Anzahl Patches	♀	♂	♀♂	n. b.	fertil	steril 1	steril 2
BD	4	1	1	0	2	2	4	3755
BS	1	1	0	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
BUL	176	65	40	10	61	1948	66	1335
BUR	47	29	9	4	5	1542	293	993
DZ	48	27	9	1	11	132	10	2642
EG	7	4	1	0	2	11	8	756
FM	1	1	0	0	0	0	0	214
FR	3	1	2	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
GM	36	12	9	0	14	473	1646	3350
HB	1	1	0	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
HM	1	0	0	1	0	787	220	488
HU	4	3	0	0	1	n. u.	n. u.	n. u.
HW	3	0	1	1	1	59	145	1108
LB	1	1	0	0	0	0	0	321
LH	7	4	1	1	1	0	0	1956
LN	1	0	1	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
LO	1	0	1	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
LS	8	5	1	1	1	1	0	210
MC	12	6	3	1	2	375	2350	97
MD	1	1	0	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
MK	2	0	0	1	1	n. u.	n. u.	n. u.
MR	64	22	18	20	2	5	5	2012
MU	3	1	1	0	1	0	0	335
NB	1	0	1	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
NO	7	1	0	0	6	0	0	225
OB	2	2	0	0	0	n. u.	n. u.	n. u.
OM	12	7	2	1	2	1045	76	1634
PB	30	18	8	2	0	n. u.	n. u.	n. u.
RD	39	10	24	3	3	n. u.	n. u.	n. u.
RN	1	0	0	0	1	0	0	4760
RV	1	0	1	0	0	n. u.	n. u.	n. u.

4 Diskussion

4.1 Bestimmung der Populationsgröße der untersuchten *A. dioica*-Populationen

Im Untersuchungsgebiet kommt *A. dioica* heute nur noch in wenigen und meist sehr kleinen Populationen vor. 23 von 32 Populationen bestanden aus weniger als zehn Patches. In elf Populationen konnte nur ein Patch gefunden werden. Ebenso war die kumulative Patchfläche der Populationen meist gering: elf der Vorkommen wiesen eine kumulative Fläche von weniger als einem Quadratmeter auf. Wir können keine validierten Aussagen bezüglich der Bestandsentwicklungen machen, da wir bis auf eine Population (LH) ausschließlich Daten zu den Populationsgrößen in 2010 aufnehmen konnten. Der Rückgang an Patches, der exemplarisch in der Population LH zwischen 2009 und 2010 zu beobachten war, sowie die meist sehr kleinen Populationsgrößen legen jedoch die Vermutung nahe, dass sich die Art im Untersuchungsgebiet im Rückgang befindet. Diese stützt sich auf Literaturangaben, die beschreiben, dass die Vorkommen der Art im Untersuchungsgebiet rapide zurückgehen (FRANK & NEUMANN 1999, FUKAREK & HENKER 2006, ROMAHN 2009, BLACHNIK 2009, 2012, RICHTER & BLACHNIK 2013). Auch in vergleichbaren Tiefland-

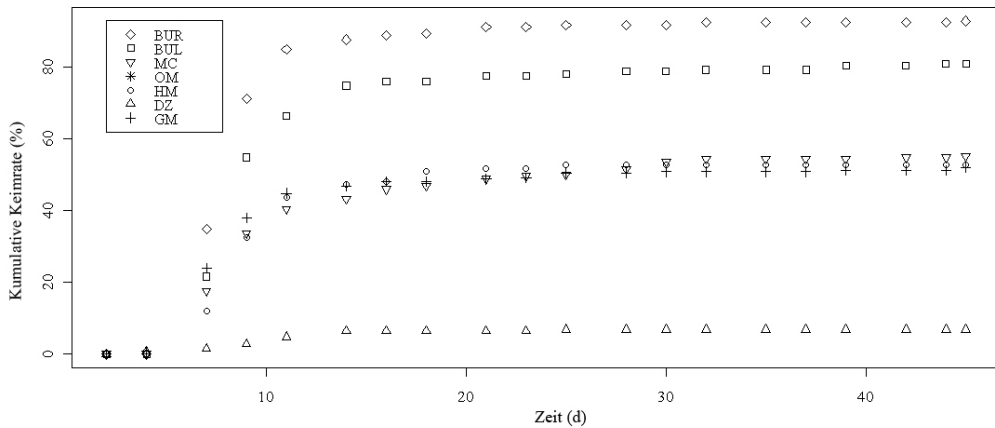


Abb. 8 Kumulativer Keimungsverlauf in den untersuchten Populationen von *A. dioica* in Abhängigkeit von der Zeit. Die Abkürzungen der Populationen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Fig. 8 Cumulative germination of the investigated *A. dioica*-populations. Dots represent the means of the cumulative germination ratio in dependence on the time of the germination experiment. Abbreviations correspond to the population IDs in Table 1.

gebieten Mitteleuropas wurden schon seit Längerem starke Rückgänge der Bestände beobachtet (z. B. in den Niederlanden: KOWARIK & SUKOPP 1984, in Süddeutschland: ZIMMERMANN 1996, SCHWABE 1990, FELDT 2008 oder in Großbritannien: PEERING & WALTERS 1982).

4.2 Einfluss der Habitateigenschaften auf die Fitness von *A. dioica*

Ebenso wie FELDT (2008) konnten wir in unseren Beobachtungen feststellen, dass die flachwurzelnde Art *A. dioica* Habitats mit niedriger Bodentieftiefe besiedelt (Median im Zentrum = 13 cm). Die Bodentieftiefe war im Zentrum der untersuchten Patches signifikant geringer als an der Peripherie. Dies zeigt, dass sich *A. dioica* mit zunehmender Tieftiefe des Bodens schlechter im Habitat behaupten kann. FELDT (2008) interpretierte das als Effekt zunehmender Konkurrenz von Arten, die bei größerer Tieftiefe des Bodens vorkommen, da sie höhere Ansprüche an die Substratverhältnisse haben als *A. dioica*. Steigt die Tieftiefe des Bodens, sind eine bessere Wasserversorgung und eine weitreichende Durchwurzelung des Bodens für die Sorption verschiedenster Nährstoffe gewährleistet, wodurch die oberirdische pflanzliche Biomasse zunimmt (BELCHER et al. 1995).

Eutrophierung und die Aufgabe traditioneller Landnutzung führen zur Veränderung der Artenzusammensetzung halbnatürlicher Trocken- und Halbtrockenrasen, wobei vor allem Magerkeitszeiger durch produktivere Arten ersetzt werden (BOBBINK et al. 2010, POSCHOLD et al. 2005). *Antennaria dioica* wird für diese Prozesse als Modellorganismus betrachtet, da sie besonders sensitiv auf solche Habitatveränderungen reagiert (SCHWABE 1990). So wurde die Art als „Magerkeitszeiger per excellence“ (SCHROETER 1926) bzw. als „charakteristisch düngerfliehende Art“ (BRAUN-BLANQUET 1949) beschrieben. Der Stickstoffgehalt des Bodens war dementsprechend sehr niedrig, zeigte allerdings keinen direkten Einfluss auf die Fitness von *A. dioica*. Die Höhe der Umgebungsvegetation hing signifikant vom Stickstoffgehalt des Bodens ab. Ein positiver Einfluss des Stickstoffgehaltes auf die Vegetationshöhe und somit die Produktivität einer Pflanzengesellschaft wurde bereits von BOBBINK et al. (1998) dokumentiert. Mit dem verwendeten Protokoll konnten wir jedoch nur den Gesamtstickstoffgehalt messen, nicht die für die Pflanzen wichtigeren

frei-verfügbaren Ionen (vgl. KAYE & HART 1997). Zukünftige Untersuchungen sollten daher versuchen, die Bodenverhältnisse genauer zu differenzieren.

Mit zunehmender Höhe der Umgebungsvegetation wurde eine Abnahme der Reproduktionsfähigkeit von *A. dioica* nachgewiesen, was sich sowohl in der vegetativen Reproduktion (hier als Verhältnis von juvenilen zu adulten Rosetten) als auch in der sexuellen Reproduktion (hier als Verhältnis von blühenden zu nicht blühenden Rosetten) zeigte. Der Zusammenhang zwischen der Höhe der Umgebungsvegetation und der Fitness lässt vermuten, dass die Reproduktionsfähigkeit der Art unter gesteigertem interspezifischem Konkurrenzdruck leidet. ONIPCHENKO et al. (2009) führten in diesem Zusammenhang ein „Neighbour-Removal“-Experiment im Kaukasus durch. Im Gegensatz zur Mehrzahl der untersuchten Arten reagierte *A. dioica* auf die Entfernung der umliegenden Vegetation mit einer Erhöhung der Biomasse.

Im mitteleuropäischen Tiefland besiedelt die Art kurzrasige Trocken- und Halbtrockenrasen. Die Entstehung solcher Xerothermrasen wurde durch Nährstoffentzug und Konkurrenzminderung infolge anthropogener Nutzungsformen wie Beweidung begünstigt (ELLENBERG et al. 2001). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass in 22 der 32 untersuchten Populationen verschiedenste Pflegemaßnahmen durchgeführt wurden (vgl. Tab. 1). PARTZSCH (2001) stellte dementsprechend dar, dass die Art eine Zeigerart historisch alter, traditionell beweideter Xerothermrasen ist. Für einen dauerhaften Erhalt der heute noch vorhandenen *A. dioica*-Populationen im Untersuchungsgebiet sollte deshalb vor allem die Beweidung als Pflegemaßnahme durchgeführt werden.

4.3 Kennzeichnung der klonalen Struktur der *A. dioica*-Populationen

In 89 % der blühenden Patches wurde nur ein Geschlecht gefunden. Dies stellt ein Indiz dafür dar, dass generell nur eine geringe Anzahl an Genotypen in einem Patch zu erwarten ist. Dementsprechend wurden in den genotypischen Untersuchungen dieser Studie meist nur sehr wenige oder nur ein Genet innerhalb der Patches vorgefunden. Entgegen der Annahmen von VARGA & KYTÖVIITA (2011) waren die untersuchten Patches aber nicht immer monoklonal, denn durch sexuelle Reproduktion innerhalb des Patch oder das Zusammenwachsen unterschiedlicher Patches können mehrere Genotypen in einem Patch vorhanden sein (URBANSKA 1985). Insbesondere in größeren Populationen, in denen es noch ausreichend sexuelle Reproduktion gibt (z. B. BUR mit 47 Patches, über 50 % Anteil fertiler Achänen, die zu 92,8 % keimfähig waren), ist es sehr wahrscheinlich, dass Achänen innerhalb eines Patch auskeimen und dort einen neuen Genet etablieren (z. B. in BUR wurden fünf Proben aus einem Patch analysiert und dabei vier Genets detektiert). Im Gegensatz dazu können durch klonale Fragmentierung eines Patch auch zwei Patches entstehen, die aus einem genetisch identischen Individuum bestehen (URBANSKA 1992, PFEIFFER 2005). So wurden für zehn paarweise verglichene Proben Klonpaare gefunden, die nicht aus einem gemeinsamen Patch stammten. Die klonale Strukturierung erwies sich somit als komplex und variierte von Population zu Population und innerhalb der Populationen von Patch zu Patch. Besonders deutlich wurde dies bei Betrachtung der detaillierten Untersuchung der Population LH (Abb. 4). Ähnliche Ergebnisse, die darstellten, dass man die Verteilung der Genets nicht mit der Verteilung von Patches gleichsetzen kann, konnten zum Beispiel PORNON et al. (2000) zu *Rhododendron ferrugineum* und ALBERT et al. (2003) zu *Vaccinium myrtillus* darlegen, beide ebenfalls polykarpe Hemikryptophyten. Dies unterstreicht, dass im Zuge wissenschaftlicher Arbeiten an Patch bildenden Hemikryptophyten etablierte Markersysteme genutzt werden sollten, um sich einen Überblick über die klonale Strukturierung der Population zu erarbeiten. Erst mit Hilfe genotypischer Analysen lassen sich überhaupt die effektiven Populationsgrößen abschätzen. *Antennaria dioica*-Patches bestehen aus bis zu hunderten von Rosetten, deren sichtbare Verknüpfungen (Stolone) innerhalb einer Vegetationsperiode verschwinden (SCHWABE 1990). Daher kann der Probenumfang nicht als ein absolut robustes Maß fungieren, sondern nur als Abschätzung der Anzahl an Genets in den untersuchten Populationen bzw. Patches. Um exakt bestimmen zu können, wie viele Genets in einer Population vorhanden sind, müsste ein Vielfaches an Proben analysiert werden.

Anhand unser Genet-Analysen lässt sich annehmen, dass etwa die Hälfte der betrachteten Populationen des Untersuchungsgebietes aus sehr wenigen Genets besteht (14 von 32, vgl. Tab. 3). Diese 14 Popula-

tionen können als oligoklonal angesehen werden. In sechs der Populationen wurde sogar nur ein Klon nachgewiesen. Die sechs gleichmäßig über das gesamte Patch gesammelten Proben der Population NB (Abb. 3b) deuten stark darauf hin, dass diese Population nur noch aus einem genetischen Individuum besteht. Als Ursache für die gefundene Oligoklonalität ist höchstwahrscheinlich die mangelnde Verjüngung durch ausbleibende Keimlingsetablierung anzusehen (vgl. HONNAY & BOSSUYT 2005).

4.4 Einfluss der Populationsgröße auf das Geschlechterverhältnis und die sexuelle Reproduktion

In einem Großteil der untersuchten Populationen wurde ein weiblich dominiertes Geschlechterverhältnis vorgefunden. Vorangegangene Arbeiten von VON UBISCH (1930), ERIKSSON (1996), ÖSTER & ERIKSSON (2007) und VARGA & KYTÖVITA (2011) legten dar, dass das optimale Geschlechterverhältnis in den Populationen von *A. dioica* zwischen 2 : 1 und 2,5 : 1 (♀ : ♂) liegt. Der hohe Anteil weiblicher Individuen wirkt sich positiv auf die Gesamtmenge der produzierten Früchte aus (KAPLAN 1972), da die zoophile Art nur bei extrem weiblich dominierten Geschlechterverhältnissen unter Pollenlimitation leidet (ÖSTER & ERIKSSON 2007). Unsere Studie bestätigte dieses Optimum, da in den großen Populationen (> 40 Patches) der Anteil weiblicher Patches zwischen 52 % und 73 % schwankte. Kleine Populationen hatten hingegen häufig ein von diesem Optimum abweichendes Geschlechterverhältnis, sowohl zugunsten des Anteils der männlichen Patches als auch zugunsten des Anteils der weiblichen Patches. Die effektive Populationsgröße kleiner Populationen wird also zusätzlich durch demografische Stochastizität in der Geschlechterverteilung gesenkt. In kleinen Populationen kann es daher zu Pollen- und Fruchtsatzlimitation oder sogar zum vollständigen Verlust der sexuellen Reproduktionsfähigkeit kommen (BLACHNIK 2010, 2012). In unseren Untersuchungen wurde in fast der Hälfte der Populationen (14 von 32) nur ein Geschlecht nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine aktuelle Untersuchung im Auftrag des Bayerischen Landesamtes für Umwelt, in der nur 4 von 15 Populationen beide Geschlechter enthielten (RICHTER & BLACHNIK 2013).

In unserer Studie wurden in der Mehrzahl der *A. dioica*-Populationen ein sehr geringer Fruchtsatz und somit gravierende Verluste in der sexuellen Reproduktionsfähigkeit beobachtet. Es konnten in fünf von 17 Populationen keine keimfähigen Achänen gesammelt werden. In weiteren fünf Populationen waren mindestens 95 % der untersuchten Achänen steril. Dementgegen lag der Anteil fertiler Achänen in nur drei Populationen bei über 50 %. Bereits SÖYRINKI (1954) und FELDT (2008) stellten fest, dass der Fruchtsatz in natürlichen Populationen von *A. dioica* häufig sehr gering ist und dass das Verhältnis von vegetativer zu sexueller Reproduktion nicht ausgewogen scheint.

Die Keimfähigkeit der fertilen Achänen variierte zwischen den Populationen sehr stark (zwischen 6 und 98 %), wurde aber von der Populationsgröße und dem Geschlechterverhältnis nicht beeinflusst. Eine ähnliche Variation der Keimraten zwischen verschiedenen Populationen von *A. dioica* wurde bereits von FOSATTI (1980) dokumentiert. Im Gegensatz zur Qualität der fertilen Achänen (Keimfähigkeit) bestand zwischen der Quantität der Früchte und der Populationsgröße ein signifikanter Zusammenhang. Der Anteil an fertilen Früchten nahm mit der Populationsgröße zu, wohingegen der Anteil an sterilen Achänen der Kategorie 2 abnahm. Diese beobachteten Verluste der Reproduktionsfähigkeit durch geringe Populationsgrößen bzw. Oligoklonalität stehen im Einklang mit Analysen und zahlreichen Fallstudien zu klonalen Arten (z. B. ECKERT 2002, KUNIN 1997, CHARPENTIER et al. 2000). Da vorrangig sterile Achänen der Kategorie 2 gefunden wurden, wird die Nichtbefruchtung der Ovarien als Hauptgrund für die vielen beobachteten sterilen Achänen vermutet. Insbesondere in den kleinen Populationen findet demzufolge häufig kein sexueller Austausch von Gameten statt. Dies lässt sich damit erklären, dass kleine Populationen zoophiler Pflanzenarten aufgrund ihrer geminderten Attraktivität für Bestäuber häufig unter dem Effekt der Pollenlimitation leiden, der den Fruchtsatz stark dezimieren kann (ÅGREN 1996, KNIGHT et al. 2005). Andererseits kann sich bei diözischen Arten wie *A. dioica* auch ein unausgewogenes Geschlechterverhältnis negativ auf den Samenanatz auswirken, was wir in unserer Studie jedoch nicht statistisch belegen konnten. In eingeschlechtlichen Populationen fand eine sexuelle Reproduktion generell nicht statt. Aufgrund des hohen Isolationsgrades erfolgt auch keine Bestäubung via Fremdpollen anderer Populationen, da laut FELDT (2008) eine solche Regeneration aus räumlich entfernten Standorten „für *A. dioica* völlig ausgeschlossen“ erscheint.

Ein geringer oder ausbleibender Fruchtsatz wirkt sich für alle sexuell reproduzierenden Arten negativ auf das Populationswachstum aus. Er scheint jedoch für *A. dioica* besonders gravierend, da Keimlinge der Art sehr niedrige Etablierungsraten aufweisen (FELDT 2008). Aussaaten auf Erde oder im Freiland führten, im Vergleich zu Keimexperimenten unter kontrollierten Bedingungen, zu sehr viel geringeren Keimraten oder zum vollständigen Ausbleiben der Keimung (FOSSATTI 1980, PERTTULA 1941, SCHWABE 1990). FELDT (2008) führte die geringe Etablierungsrate der Keimlinge darauf zurück, dass die Keimlinge von *A. dioica* gegenüber anderen Arten in halbnatürlichen Trockenrasen nicht konkurrenzfähig sind und schlussfolgerte, dass *A. dioica* große Mengen an Diasporen benötigt, um die vereinzelt auftretenden konkurrenzfreien Vegetationslücken (z. B. Trittstellen) zu besiedeln. In einem Aussaatexperiment dokumentierte ERIKSSON (1997), dass nach der Keimung nur acht von 19 000 *A. dioica*-Achänen in der Lage waren, sich unter totalem Konkurrenzausschluss zu etablieren. Sobald die Keimlinge interspezifischer Konkurrenz ausgesetzt wurden, konnte sich gar kein Keimling etablieren.

Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Beobachtungen im Feld, in denen wir, insbesondere in kleinen Populationen nahezu keine etablierten *A. dioica*-Keimlinge vorfinden konnten (unveröffentlichte Ergebnisse, vgl. ROSCHE 2011). Nach FELDT (2008) stellt die geringe Achänenproduktion in vielen Populationen in Verbindung mit wenigen Keimungs-Schutzstellen einen bedeutenden Grund für die Rückgänge von *A. dioica* dar, da es für die Art essentiell ist, die stochastischen Verluste von Patches und Genets durch sexuelle Reproduktion zu nivellieren. Ohne Etablierung sexuell reproduzierter Genets verringert sich der Genpool der Populationen sukzessive, was zum Aussterben kleiner und isolierter Vorkommen von *A. dioica* im Untersuchungsgebiet führen kann.

4.5 Implikationen für den Naturschutz

Wir konnten in dieser Studie darlegen, dass die in den vergangenen 50 Jahren beobachteten Aussterbeprozesse der *A. dioica*-Populationen neben verschlechterten Habitatbedingungen (vgl. BLACHNIK 2009, SCHWABE 1990) auch auf genotypische Verarmung der Populationen und die damit einhergehenden stochastischen Schwankungen im Geschlechterverhältnis zurückzuführen sind. Die daraus resultierende Reduktion der sexuellen Reproduktion scheint die beobachteten Populationsrückgänge zu beschleunigen.

Die Ergebnisse dieser Studie müssen als sehr bedrohlich für die verbliebenen *A. dioica*-Populationen im Untersuchungsgebiet interpretiert werden. Ohne adäquate Schutzmaßnahmen erscheint der Erhalt der meisten Populationen unmöglich. Zum einen sollte der Verlust von Genotypen durch Anpflanzungen neuer Genets ausgeglichen werden. Zum anderen sollte darauf geachtet werden, dass ein möglichst optimales Geschlechterverhältnis innerhalb der Populationen gewährleistet werden kann (60 - 75 % Anteil weiblicher Patches). Neben der Revitalisierung der sexuellen Reproduktion ist ein geeignetes Management der Flächen unabdingbar, da in vielen vorangegangenen Studien (z. B. SCHWABE 1990, ONIPCHENKO et al. 2009) belegt wurde, dass *A. dioica* mit konkurrenzarmen Phytozönosen assoziiert ist und dass die Etablierung von Keimlingen ausschließlich in konkurrenzfreien Keimungs-Schutzstellen stattfindet (ERIKSSON 1997, FELDT 2008).

Die Ergebnisse unserer Studie deuten darauf hin, dass sich viele der untersuchten Populationen in den letzten Jahrzehnten nahezu ausschließlich klonal reproduzierten. In diesem Zustand kann *A. dioica* anscheinend je nach Populationsgröße und Management der Flächen einige Jahrzehnte überdauern, verliert aber sukzessive an Genets und Patches. Der Verlust von Genotypen kann wiederum zu einer weiteren Reduktion der sexuellen Reproduktion führen. Im Sinne der „route to extinction“-Theorie von HONNAY & BOSSUYT (2005) kann ein so entstehender Kreislauf des Verlustes genotypischer Diversität für *A. dioica* zum Aussterben der Populationen im Untersuchungsgebiet führen. Ohne ausreichende sexuelle Reproduktion sind selbst intensive Pflegemaßnahmen auf Dauer wahrscheinlich nicht ausreichend um die aktuellen Bestände von *A. dioica* zu erhalten. Sexuelle Reproduktion ist für ein dauerhaftes Bestehen von *A. dioica*-Populationen essentiell.

5 Zusammenfassung

ROSCHÉ, C., SCHRIEBER, K., HIRSCH, H., BLACHNIK, T., TRÄGER, S., RICHTER, F., SEIDLER, G., HENSEN, I.: Sexuelle Reproduktion und klonales Wachstum in kleinen Populationen von *Antennaria dioica* (L.) GAERTNER. - *Hercynia* N. F. 47 (2014): 59 – 86.

Habitatfragmentierung und Landnutzungsveränderung können zu kleinen und isolierten Populationen führen, die eine reduzierte Fitness aufweisen. Dies kann bei Pflanzen, die sowohl zu sexueller als auch zu klonaler Reproduktion befähigt sind, zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den beiden Fortpflanzungsformen zu Gunsten der klonalen Reproduktion führen. Der dadurch bedingte Verlust von Genets verringert die effektive Populationsgröße, was den Rückgang der Art beschleunigen kann. Verstärkt trifft dies auf diözische Arten zu, da Populationen, die aus wenigen Genets bestehen, unausgewogene Geschlechterverhältnisse beinhalten können. Dadurch kann die sexuelle Reproduktion weiter verringert werden oder in eingeschlechtlichen Populationen ganz ausbleiben.

Antennaria dioica ist eine diözische Art, die zur klonalen Reproduktion befähigt ist. Die Art befindet sich in den mitteleuropäischen Tiefländern in einem starken Rückgang, wo sie halbnatürliche, meist artenreiche Trocken- und Halbtrockenrasen besiedelt. In dieser Studie wurde der Einfluss sinkender Populationsgrößen auf die klonale Struktur und das Geschlechterverhältnis von *A. dioica* untersucht. Dabei wurde analysiert, ob die sexuelle Reproduktion in kleinen Populationen mit unausgewogenen Geschlechterverhältnissen beeinträchtigt ist.

In 32 Populationen wurden Daten zur Fitness von *A. dioica* und den Habitateigenschaften (Tiefgründigkeit, Stickstoffgehalt des Bodens, Höhe der Umgebungsvegetation) aufgenommen. Um die klonale Struktur der Populationen zu bestimmen, wurden Blattproben für AFLP-Analysen genommen. In 17 Populationen wurden Achänen gesammelt und der Anteil steriler und fertiler Früchte sowie deren Keimfähigkeit untersucht.

Die meisten der Populationen wiesen weniger als zehn Patches auf. Die Fitness der Art sank mit zunehmender Vegetationshöhe. In der AFLP-Analyse wurden in den kleinen Populationen nur sehr wenige Genets bestimmt. Die geringen Populationsgrößen bedingten unausgewogene Geschlechterverhältnisse und einen verminderten Fruchtansatz.

Unsere Studie zeigt, dass genotypische Verarmung und Reduktion der sexuellen Reproduktion zur gegenwärtigen Bestandsabnahme von *A. dioica* im Untersuchungsgebiet beitragen. Erfolgreiche sexuelle Reproduktion ist jedoch für ein dauerhaftes Bestehen von *A. dioica*-Populationen essentiell, um stochastische Verluste von Genotypen ausgleichen zu können. Ohne adäquate Schutzmaßnahmen ist der Erhalt des Großteils der heute vorkommenden Populationen stark gefährdet.

6 Danksagung

Ein großer Dank geht an die technischen Assistenzen Frau Birgit Müller und Frau Christine Voigt für ihre kompetente Laborunterstützung. Zwei anonymen Gutachtern und Dr. Monika Partzsch verdanken wir sehr hilfreiche Kritiken, die das Manuskript bedeutend verbessert haben. Wir danken zahlreichen hilfsbereiten Mitarbeitern von diversen Naturschutzvereinen und –ämtern, die uns die Populationen vor Ort vorgestellt haben, Proben sammelten und uns wertvolle Hintergrundinformationen zu den Populationen vermitteln konnten. Für das Korrekturlesen des Manuskriptes und wertvolle Anregungen danken wir herzlich Frau Isabel Link und Frau Angela Rosche.

7 Literaturverzeichnis

- ÅGREN, J. (1996): Population size, pollination limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. - *Ecol.* 77: 1779 – 1790.
- AKAIKE, H. (1973): Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. - In: PETRAN, B., CSAKI, F. (Eds.): International symposium on information theory. 2nd edition: 267 – 281. Akademiai Kiado, Budapest.
- ALBERT, T., RASPÉ, O., JACQUEMART, A.-L. (2003): Clonal structure in *Vaccinium myrtillus* L. revealed by RAPD and AFLP markers. - *Int. J. Plant Sci.* 164: 649 – 655.
- ALLEE, W. C., EMERSON, A. E., PARK, O., PARK, T., SCHMIDT, K. P. (1949): Principles of animal ecology. - Saunders, Philadelphia.
- BASKIN, C. C., BASKIN, J. M. (1998): Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy. - Academic Press, San Diego.
- BATES, D., MAECHLER, M., BOLKER, B. (2011): lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4 classes. R package version 0.999375-39. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- BELCHER, J. W., KEDDY, P. A., TWOLAN-STRUTT, L. (1995): Root and shoot competition intensity along a soil depth gradient. - *J. Ecol.* 83: 673 – 682.
- BLACHNIK, T. (2009): Artenhilfsprojekt Arnika und Katzenpfötchen im Bayerischen Vogtland, Landkreis Hof. - Unveröff. Gutachten im Auftr. d. Höheren Naturschutzbehörde, Regierung von Oberfranken.
- BLACHNIK, T. (2010): Bestandserfassung und Artenhilfsmaßnahmen für ausgewählte Arten in Stadt und Landkreis Hof - *Antennaria dioica*, *Blysmus compressus*, *Nymphaea candida*, *Elatine spec.*, *Sparganium natans* und *Veronica dillenii*. - Unveröff. Gutachten im Auftr. d. Bayerischen Landesamtes f. Umwelt, Augsburg.
- BLACHNIK, T. (2012): *Antennaria dioica* im östlichen Frankenwald/Landkreis Hof - Monitoring akut vom Aussterben bedrohter Restpopulationen. - Unveröff. Gutachten im Auftr. d. Bayerischen Landesamtes f. Umwelt (LfU), Augsburg.
- BOBBINK, R., HICKS, K., GALLOWAY, J., SPRANGER, T., ALKEMADE, R., ASHMORE, M., BUSTAMANTE, M., CINDERBY, S., DAVIDSON, E., DENTENER, F., EMMETT, B., ERISMAN, J.-W., FENN, M., GILLIAM, F., NORDIN, A., PARDO, L., DE VRIES, W. (2010): Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. - *Ecol. Appl.* 20: 30 – 59.
- BOBBINK, R., HORNUNG, M., ROELOFS, J. G. M. (1998): The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. - *J. Ecol.* 86: 717 – 738.
- BOLKER, B. M., BROOKS, M. E., CLARK, C. J., GEANGE, S. W., POULSEN, J. R., STEVENS, M. H. H., WHITE, J.-S. S. (2009): Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. - *Trends in Ecology and Evolution* 24: 127 – 135.
- BRESINSKY, A., KÖRNER, C., KADEREIT, J. W., NEUHAUS, G., SONNEWALD, U. (2008): Strasburger - Lehrbuch der Botanik. 36. Auflage. - Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin.
- BRAUN-BLANQUET, J. (1949): Übersicht der Pflanzengesellschaften rätiens (II). - *Plant Ecol.* 1: 129 – 146.
- BRUELHEIDE, H. (2007): Modul "Geobotanik III": Praktikumsskript Populations- und Standortsökologie. MLU Halle-Wittenberg, Institutsbereich Biologie, Geobotanik und Botanischer Garten, Halle. - Unveröff. Manuskript, Halle (Saale).
- CHAPIN III, F. S., ZAVALA, E. S., EVINER, V. T., NAYLOR, R. L., VITOUSEK, P. M., REYNOLDS, H. L., HOOPER, D. U., LAVOREL, S., SALA, O. E., HOBIE, S. E. (2000): Consequences of changing biodiversity. - *Nature* 405: 234 – 242.
- CHARPENTIER, A., GRILLAS, P., THOMPSON, J. D. (2000): The effects of population size limitation on fecundity in mosaic populations of the clonal macrophyte *Scirpus maritimus* (Cyperaceae). - *Am. J. Bot.* 87: 502 – 507.
- CRAWLEY, M.J. (2009): The R Book. - Wiley Publishing, Chichester.
- DORKEN, M. E., ECKERT, C. G. (2001): Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). - *J. Ecol.* 89: 339 – 350.
- DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. - *Phytochem. bull.* 19: 11 – 15.
- ECKERT, C. G. (2002): The loss of sex in clonal plants. - *Evol. Ecol.* 15: 501 – 520.
- ELLENBERG, H., WEBER, H.E., DÜLL, R., WIRTH, V., WERNER, W., PAULISSEN, D. (2001): Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. 3. Auflage. - Scripta Geobot. 18: 1 – 262.
- ERIKSSON, O. (1996): Population ecology and conservation – some theoretical considerations with examples from the Nordic flora. - *Acta Univ. Symb. Ups* 31: 159 – 167.
- ERIKSSON, O. (1997): Colonization dynamics and relative abundance of three plant species (*Antennaria dioica*, *Hieracium pilosella* and *Hypochoeris maculata*) in dry semi-natural grasslands. - *Ecography* 20: 559 – 568.
- FELDT, C. (2008): Beiträge zur Populationsdynamik von *Antennaria dioica* (L.) Gaertn. im Bereich der mittleren Schwäbischen Alb. - Diss., Universität Ulm.

- FISCHER, J., LINDENMAYER, D. B. (2007): Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. - *Global Ecol. Biogeogr.* 16: 265 – 280.
- FOSSATI, A. (1980): Keimverhalten und frühe Entwicklungsphasen einiger Alpenpflanzen. - *Veröff. Geobot. Inst. ETH* 73: 1 – 180.
- FRANK, D., NEUMANN, V. (1999): Bestandssituation der Pflanzen und Tiere Sachsen-Anhalts. - Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- FRANKHAM, R. (1995): Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. - *Genet. Res.* 66: 95 – 107.
- FUKAREK, F., HENKER, H. (2006): Flora von Mecklenburg-Vorpommern - Farn- und Blütenpflanzen. - Weißdorn-Verlag, Jena.
- GATTERER, K., NEZADAL, W. (2003): Flora des Regnitzgebietes, Band 2. - IHW, Eching.
- HANSEN, M., KRAFT, T., CHRISTIANSSON, M., NILSSON, N. O. (1999): Evaluation of AFLP in Beta. - *Theor. Appl. Genetics* 98: 845 – 852.
- HARTNETT, D.C., BAZZAZ, F.A. (1985): The genet and ramet population dynamics of *Solidago canadensis* in an abandoned field. - *J. Ecol.* 73: 407 – 413.
- HEGLI, G. (1979): *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Band 5, Teil 3: Compositae. - Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- HENSEN, I. (1997): Life strategy systems of xerothermic grasslands – mechanisms of reproduction and colonization within *Stipetum capillatae* s.l. and *Adonido-Brachypodietum pinnati*. - *Feddes Repert.* 108: 425 – 452.
- HIJMANS, R. J., CAMERON, S. E., PARRA, J. L., JONES, P. G., JARVIS, A. (2005): Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. - *Int. J. Climat.* 25: 1965 – 1978.
- HONNAY, O., BOSSUYT, B. (2005): Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction? - *Oikos* 108: 427 – 432.
- ISTA: International Seed Testing Association (2008): Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut. Ausgabe 2008. - ISTA, Zürich.
- JÄGER, E. J. (1957): Über Wuchsform, Wuchsrhythmus und Verbreitung einheimischer Wiesenasteraceen. - *Diplomarb., Univ. Halle-Wittenberg*.
- KAPLAN, S. M. (1972): Seed production and sex ratio in anemophilous plants. - *Heredity* 28: 281 – 285.
- KAYE, J. P., HART, S. C. (1997): Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. - *Trends in Ecol. & Evol.* 12: 139 – 143.
- KLEKOWSKI JR, E. J. (1988): Progressive cross-and self-sterility associated with aging in fern clones and perhaps other plants. - *Heredity* 61: 247 – 253.
- KNIGHT, T. M., STEETS, J. A., VAMOSI, J. C., MAZER, S. J., BURD, M., CAMPBELL, D. R., DUDASH, M. R., JOHNSTON, M. O., MITCHELL, R. J., ASHMAN, T. L. (2005): Pollen limitation of plant reproduction: Patterns and Process. - *Annu. Rev. Ecol., Evol. Syst.* 36: 467 – 497.
- KNUTH, P. (1898): *Handbuch zur Blütenbiologie II*. - Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- KORNECK, D., SCHNITTLER, M., VOLLMER, I. (1996): Rote Liste der Farn- und Blütenpflanzen (Pteridophyta und Spermatophyta) Deutschlands. Bundesamt für Naturschutz. Rote Liste gefährdeter Pflanzen Deutschlands. - *Schr. R. f. Veg.kd.* 28: 21 – 187.
- KOWARIK, I., SUKOPP, H. (1984): Auswirkungen von Luftverunreinigungen auf die spontane Vegetation (Farn- und Blütenpflanzen). - *Angewandte Bot.* 58: 157 – 170.
- KUNIN, W. E. (1997): Population size and density effects in pollination: pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. - *J. Ecol.* 85: 225 – 234.
- KUTSCHERA, L., LICHTENEGGER, E. (1992): *Wurzelatlas Mitteleuropäischer Grünlandpflanzen*. Band 2 Pteridophyta und Dicotyledoneae (Magnoliopsida) Teil 1: Morphologie, Anatomie, Ökologie, Verbreitung, Soziologie, Wirtschaft. - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- LANGFELDER, P., HORVATH, S., DONG, J., MILLER, J., SONG, L., YIP, A., ZHANG, B. (2011): WGCNA: Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. R package version 1.11-2. <http://CRAN.R-project.org/package=WGCNA>
- LEMON, J. (2006): *Plotrix*: a package in the red light district of R. - *R-news* 6: 8–12.
- ONIPCHENKO, V. G., BLINNIKOV, M. S., GERASIMOVA, M. A., VALICOVA, E. V., CORNELISSEN, J. H. C. (2009): Experimental comparison of competition and facilitation in alpine communities varying in productivity. - *J. Veg. Sci.* 20: 718 – 727.
- ÖSTER, M., ERIKSSON, O. (2007): Sex ratio mediated pollen limitation in the dioecious herb *Antennaria dioica*. - *Ecoscience* 14: 387 – 398.
- PARTZSCH, M. (2001): Die Porphyrkuppenlandschaft des unteren Saaletals - Vergleich der Vegetation der Kuppen in Abhängigkeit von Flächengröße und Genese der Porphyrkuppen. - *Bot. Jahrbücher Syst.* 123: 1 – 45.
- PEERING, H., WALTERS, S. M. (1982): *Atlas of the British Flora*. - Bot. Soc. British Isles, East Ardsley, Yorkshire.

- PERTTULA, U. (1941): Untersuchungen über die generative und vegetative Vermehrung der Blütenpflanzen in der Wald-, Hainwiesen und Hainfelsenvegetation. - *Annales Acad. Sci. Fennicae* 58: 1 – 380.
- PFEIFFER, T. (2005): Sexual or clonal origin? A morpho-ecological and molecular analysis in a patch of *Ajuga reptans* L. (Lamiaceae). - *Feddes Repert.* 116: 183 – 190.
- PINHEIRO, J., BATES, D., DEBROY, S., SARKAR, D., R DEVELOPMENT CORE TEAM (2010): nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-97. <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- PORNON, A., ESCARAVAGE, N., THOMAS, P., TABERLET, P. (2000): Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) populations. - *Mol. Ecol.* 9: 1099 – 1111.
- POSCHLOD, P., BAKKER, J. P., KAHMEN, S. (2005): Changing land use and its impact on biodiversity. - *Basic Appl. Ecol.* 6: 93 – 98.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2012): R: A language and environment for statistical computing. - R Foundation for Statistical Computing, Wien.
- RICHTER, F., BLACHNIK, T. (2013): *Antennaria dioica* - Vorschlag für ein länderübergreifendes Erhaltungsprojekt im Vogtland und Frankenwald. - Unveröff. Gutachten im Auftr. d. Bayerischen Landesamtes f. Umwelt (LfU), Augsburg.
- ROMAHN, K. (2009): Funde ausgewählter Arten der Borstgrasrasen in Schleswig- Holstein. - *Kieler Notizen zur Pflanzenkunde*, 36: 75 – 94.
- ROSCHÉ, C. (2011): Zur genetischen Diversität und Struktur kleiner Populationen von *Antennaria dioica* Gaertner (L.) in Nord- und Mitteldeutschland. - Diplomarb., Univ. Halle-Wittenberg.
- SCHRIEBER, K. (2011): Geschlechtsspezifische Habitatpräferenzen der gefährdeten diözischen Art *Antennaria dioica* (L.) P. Gaertn. - Diplomarb., Univ. Halle-Wittenberg, Halle.
- SCHROETER, C. (1926): Das Pflanzenleben der Alpen. 2. Auflage. - Verlag Albert Raustein, Zürich.
- SCHÜTZ, M. (1989): Keimverhalten alpiner Compositae und ihre Eignung zur Wiederbegrünung von Skipistenplanierungen oberhalb der Waldgrenze. - *Ber. d. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich* 55: 131 – 150.
- SCHWABE, A. (1990): Veränderungen in montanen Borstgrasrasen durch Düngung und Brachlegung: *Antennaria dioica* und *Vaccinium vitis-idaea* als Indikatoren. - *Tuexenia* 10: 295 – 310.
- SCHWABE, A. (1991): A method for the analysis of temporal changes in vegetation pattern at the landscape level. - *Vegetatio* 95: 1 – 19.
- SHAFFER, M. L. (1987): Minimum viable populations: coping with uncertainty. In: SOULÉ, M. E. (Ed.): *Viable populations for conservation*: 69 – 86. - Cambridge University Press, Cambridge.
- SHAH, M. A., CALLAWAY, R. M., SHAH, T., HOUSEMAN, G. R., PAL, R. W., XIAO, S., LUO, W., ROSCHÉ, C., RESHI, Z. A., KHASA, D. P. (2014): *Conyza canadensis* suppresses plant diversity in its nonnative ranges but not at home: a transcontinental comparison. - *New Phyt.* 202: 1286 – 1296.
- SÖYRINKI, N. (1954): Vermehrungsökologische Studien in der Pflanzenwelt der bayerischen Alpen. - *Societas Zool. Bot. Fennica "Vanamo"* 27: 1 – 68.
- STEIN, K., ROSCHÉ, C., HIRSCH, H., KINDERMANN, A., KÖHLER, J., HENSEN, I. (2014): The influence of forest fragmentation on clonal diversity and genetic structure in *Heliconia angusta*, an endemic understorey herb of the Brazilian Atlantic rain forest. - *J. Tropical Ecol.* 30: 199 – 208.
- STÖCKLIN, J. (1992): Umwelt, Morphologie und Wachstum klonaler Pflanzen. - *Botanica Helvetica* 102: 3 – 21.
- TRÄGER, S. (2010): Klonales Wachstum und genetische Struktur von *Antennaria dioica* (Asteraceae). - Bachelorarb., Univ. Halle-Wittenberg.
- VON UBISCH, G. (1930): Geschlechtsverteilung und sekundäres Geschlechtsverhältnis bei *Antennaria dioica*. - *Biol. Zentralblatt* 50: 532 – 540.
- URBANSKA, K. M. (1985): Some life history strategies and population structure in asexually reproducing plants. - *Botanica Helvetica* 95: 81 – 97.
- URBANSKA, K. M. (1992): *Populationsbiologie der Pflanzen*. - Fischer-Verlag, Stuttgart.
- VAMOSI, J. C., VAMOSI, S. M. (2005): Present day risk of extinction may exacerbate the lower species richness of dioecious clades. - *Diversity and Distributions* 11: 25 – 32.
- VARGA, S., KYTÖVIITA, M. M. (2011): Sex ratio and spatial distribution of male and female *Antennaria dioica* (Asteraceae) plants. - *Acta Oecologica* 37: 433 – 440.
- VENABLES, W. N., RIPLEY, B. D. (2002): *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. - Springer, New York.
- VOGLER, P. (1901): Ueber die Verbreitungsmittel der schweizerischen Alpenpflanzen. - *Flora, Ergänzungsband* 89: 1 – 55.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRITERS, A., POT, J., PALEMAN, J., KUIPER, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. - *Nucleic acids res.* 23: 4407 – 4414.
- YOUNG, A., BOYLE, T., BROWN, T. (1996): The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. - *Trends in Ecol. & Evol.* 11: 413 – 418.

- ZIEGENHAGEN, B. (1990): ATMA B DNA Extraction. Method Birgit Ziegenhagen. - unveröff. Manuskript, Univ. Marburg.
- ZIMMERMANN, P. (1996): Flora und Vegetation ausgewählter, xerothermer Schafweiden im Landkreis Calw. - Beih. zu den Veröff. f. Naturschutz u. Landschaftspflege in Baden-Württemberg 88: 137 – 257.

Manuskript angenommen: 15. September 2014

Anschrift der Autoren:

Christoph Rosche, Karin Schrieber, Prof. Dr. Isabell Hensen, Gunnar Seidler
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Institut für Geobotanik & Botanischer Garten
Am Kirchtor 1, 06108 Halle (Saale)

Email: christoph.rosche@botanik.uni-halle.de,
karin.schrieber@botanik.uni-halle.de,
isabell.hensen@botanik.uni-halle.de,
gunnar.seidler@botanik.uni-halle.de

Dr. Heidi Hirsch

Stellenbosch University, Department of Botany & Zoology, Centre for Invasion Biology
Matieland, Western Cape, 7602, South Africa

Email: Hirsch@sun.ac.za

Thomas Blachnik

Agentur und Naturschutzbüro Blachnik

Guntherstraße 41, 07743 Nürnberg

Email: info@agentur-blachnik.de

Sabrina Träger

University of Regina, Department of Biology
3737 Wascana Parkway, Regina, SK, S4S 0A2, Canada

Email: trger20s@uregina.ca

Frank Richter

TU Dresden, Institut für Botanik

Zellescher Weg 20b, 01062 Dresden

Email: frank.richter@tu-dresden.de

Anhang:

DNA-Extraktion

Von den auf Silicagel getrockneten Blattproben wurden 15 mg abgewogen. Die Proben wurden zusammen mit zwei sterilen Keramikugeln und einer Löffelspitze Seesand in ein 2,2-ml Tube gegeben und anschließend bei -20°C eingefroren. Im Tissue-Lyser (Retsch, Haan-Gruiten, GER) wurden die Proben im gefrorenen Zustand staubfein zermahlen. Alle Proben wurden dabei viermal für 30 Sekunden bei einer Frequenz von 20 Hz geschüttelt. Nach dem Mahlen wurden 1 ml 55°C warmer ATMAB-Puffer und 50 μl DTT-Lösung (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) den Proben zugegeben. Die Tubes wurden auf einem Vortexer durchmischt bis eine einheitliche grüne Emulsion entstand. Es folgte eine einstündige Inkubation der Emulsion im Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, GER) bei 55°C und 900 rpm. Auf die anschließend im Kühlschrank abgekühlten Proben wurde 400 μl Dichlormethan gegeben. Nach einer Durchmischung mit dem Vortex erfolgte eine Zentrifugation mit der Zentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, GER). Aus dem entstandenen Zweiphasensystem wurden 700 μl der oberen wässrigen Phase, in welcher die DNA gelöst war, entnommen. Die Lösung wurde mit 400 μl -80°C kaltem, 99 %igem 2-Propanol gefällt. Nach einer darauffolgenden Zentrifugation wurde das Lösungsmittel verworfen und die verbliebenen grauen Pellets für 30 Minuten im Trockenschrank (Heraeus, Hanau, GER) bei 45°C getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden mit Ethanol (76 %; -20°C) gewaschen. Das entstandene weiße Pellet wurde eine Stunde bei 45°C getrocknet und in 1 x TE-Puffer mit RNase A (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resuspendiert. Die Resuspensionen wurden 30 Minuten bei 37°C im Block Heater (Stuart Scientific, Staffordshire, UK) inkubiert.

DNA-Konzentrationsmessung

1 μl der extrahierten Stammlösung ("stocksolution") wurde am NanoDrop *ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) mit Hilfe der zugehörigen Software NanoDrop 1000 Operating Software ver. 3.7.1 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) gemessen. Die Stammlösungen wurden mit 1 x TE auf eine Konzentration von 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ verdünnt. Da die Messungen nicht fehlerfrei sind, wurden die verdünnten Gebrauchslösungen anschließend wieder gemessen und bezüglich ihrer Konzentrationen überprüft. Wenn eine Konzentration $> 25 \text{ ng}/\mu\text{l}$ oder $< 15 \text{ ng}/\mu\text{l}$ gemessen wurde, wurde die Gebrauchslösung erneut mit 1 x TE bzw. der Stammlösung auf 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ eingestellt.

Die Reihenfolge der Gebrauchslösungen der Proben und ihrer Wiederholungen wurde nach der Verdünnung randomisiert. Somit wurde eine anonyme und objektive Auswertung der Proben ermöglicht, die unabhängig von der jeweiligen 96-well-Platte und deren Position auf dieser Platte war. Für die Restriktion-Ligation (ReLi) wurden 5 μl der Gebrauchslösung mit 6 μl ReLi-Mastermix (Tab. A.1) gemischt.

Tab. A.1 Zusammensetzung des Mastermixes für die Restriktion-Ligation.

Tab. A.1 Composition of master mix used for restriction-ligation

	Volumen pro Probe in μl
H ₂ O bidest.	0,73
T4 DNA Ligase-Puffer	1,10
NaCl 0,5 M	1,10
BSA 1 mg/ml	0,55
MseI Adapter 50 μM	1,00
EcoRI Adapter 5 μM	1,00
MseI Enzyme 10 U/ μl	0,10
EcoRI Enzyme 20 U/ μl	0,25
T4 DNA Ligase 6 U/ μl	0,17
Gesamt	6,00

In dem Thermocycler Mastercycler *epgradient* S (Eppendorf, Hamburg, GER) wurde die Reaktionslösung für drei Stunden bei 37 °C und nachfolgend für zehn Minuten bei 65 °C erwärmt.

Die verwendeten Adapter hatten folgende Nukleotidzusammensetzung:

MseI adapter 1/2 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

MseI adapter 2/2 5'-TACTCAGGACTCAT-3'

EcoRI adapter 1/2 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

EcoRI adapter 2/2 5'-AATTGGTACGTCAGTCTAC-3'

Das entstandene Reaktionsprodukt wurde mit 39 µl bidestilliertem, sterilem Wasser verdünnt. In der nachfolgenden Präamplifikation (PA) wurden von dieser Lösung 4 µl mit 16 µl PA-Mastermix (Tab. A.2) zusammenpipettiert.

Tab. A.2 Zusammensetzung des Mastermixes für die Präamplifikation.

Tab. A.2 Composition of master mix used for pre-amplification.

	Volumen pro Probe in µl
H2O bidest.	9,70
PCR Puffer 10 x	2,00
MgCl ₂ 50 mm	0,60
dNTPs 2,5 mm	1,60
MseI Präprimer 5 pmol/µl	1,00
EcoRI Präprimer 5 pmol/µl	1,00
Taq 5 U/µl	0,10
Gesamt	16,00

Die Präprimer hatten folgende Sequenz:

MseI Präprimer + C 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

EcoRI Präprimer + A 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler unter Einfluss des nachfolgenden PCR-Zyklus amplifiziert:

5 min à 94 °C	} 20 x
20 sec à 94 °C	
30 sec à 56 °C	
2 min à 72 °C	

Das Präamplifikationsprodukt wurde mit 180 µl bidestilliertem Wasser verdünnt. Für die anschließende Hauptamplifikation (HA) wurden 3 µl dieser verdünnten Lösung zu 17 µl HA-Mastermix (Tab. A.3) gegeben.

Tab. A.3 Zusammensetzung des Mastermixes für die Hauptamplifikation.

Tab. A.3 Composition of master mix used for main amplification.

	Volumen pro Probe in μl
H ₂ O bidest.	9,20
PCR Puffer 10x	2,00
MgCl ₂ 50 mm	0,60
dNTPs 2,5 mm	1,60
EcoRI+ANN (HEX) 1 pmol/ μl	1,00
EcoRI+ANN (FAM) 1 pmol/ μl	1,50
MseI+CNN 5 pmol/ μl	1,00
Taq 5 U/ μl	0,10
Gesamt	17,00

In der Bachelorarbeit von TRÄGER (2010) erwiesen sich fünf Primerkombinationen für Untersuchungen an *A. dioica* als besonders gut geeignet. Aus diesen wurden vier Primerkombinationen ausgewählt und für die HA verwendet. In jeden der beiden HA-Ansätze wurden jeweils zwei verschiedene EcoRI-Primer und ein MseI-Primer gegeben. Somit wurden zwei HAs mit vier Primerkombinationen durchgeführt (Tab. A.4). Die Amplifikate lassen sich dadurch unterscheiden, dass die beiden EcoRI-Primer mit zwei verschiedenen Farbstoffen (HEX – gelb; FAM – blau) gelabelt wurden.

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler folgendem PCR-Programm ausgesetzt:

1 min à 95 °C	} 10 x
20 sec à 94 °C	
30 sec à 65 °C – 1 °C	
2 min à 72 °C	
20 sec à 94 °C	} 30 x
30 sec à 56 °C	
124 sec à 72 °C	

Nach der Hauptamplifikation wurden die Produkte mit 10 μl bidestilliertem Wasser verdünnt und mit Hilfe einer Multi-well Filter Plate (Pall Corporation, Port Washington, U.S., Porendurchmesser = 1,2 μm), die mit gequollenem Sephadex G-50 Superfine powder (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) gefüllt wurde, gereinigt. Anschließend wurden 4 μl der gereinigten Lösung der Hauptamplifikate mit 5 μl eines ET-Rox-Mastermixes (Tab. A.5) versetzt. Ein Sequencer-Lauf dauerte 80 Minuten bei einer Laufspannung von 10 V. Die Injektionszeit betrug 90 Sekunden bei einer Injektionsspannung von 2 V.

Tab. A.4 Primerkombinationen der beiden Hauptamplifikationen (HA).

Tab. A.4 Primer set in the two main amplifications.

EcoRI	MSEI
HA1	
5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3' (FAM)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'
5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3' (HEX)	
HA2	
5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3' (FAM)	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3' (HEX)	

Tab. A.5 Zusammensetzung des ET-Rox-Mastermixes.

Tab. A.5 Composition of the ET-Rox-master mix

	Volumen pro Probe in μl
H ₂ O bidest.	4,75
ET-Rox 400 Längenstandard	0,25
Gesamt	5,00

Statistische Modelle

Die Tiefgründigkeit des Bodens wurde in einem LME in Abhängigkeit zur Position der Messung (Zentrum vs. Peripherie) gesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses der Habitategenschaften auf die Reproduktion von *A. dioica*, wurden in GLMEs die Abhängigkeiten der Blühfähigkeit und der vegetativen Verjüngung von der Höhe der Umgebungsvegetation bzw. vom Stickstoffgehalt des Bodens analysiert. Da auch das Geschlecht der Patches diese Variablen beeinflussen kann, wurde es als Korrekturvariable mit in das Modell einbezogen.

Um zu untersuchen, ob abnehmende Populationsgrößen eine Zunahme der Stochastizität in der Geschlechterverteilung bedingen, wurde in einem GLM untersucht, ob die Abweichung vom optimalen Geschlechterverhältnis (66 % weibliche Individuen nach VARGA & KYTOVIITA 2011) von der Populationsgröße abhängt.

Um den Einfluss der Populationsgröße und der Geschlechterverteilung auf die sexuelle Reproduktion zu untersuchen, wurden die Abhängigkeiten des Verhältnisses von fertilen zu sterilen Achänen (GLME) und der Keimfähigkeit (LME) von der Populationsgröße (linearer Term) und vom prozentualen Anteil weiblicher Individuen in der Population (quadratischer Term) untersucht. Der quadratische Term steht hierbei für ein Szenario, bei dem der Reproduktionserfolg bis zu einem bestimmten Anteil an weiblichen Patches steigt, jedoch danach wieder abfällt.

Nicht signifikante Terme wurden auf Basis von "maximum likelihood ratio tests" aus den vollen Modellen mit allen erklärenden Variablen entfernt bis das minimal adäquate Modell erreicht wurde.