

**Molekularbiologische Charakterisierung benthischer  
Tiefsee-Foraminiferen in der Östlichen Grönlandsee  
zur Aufklärung der Phylogenie von  
*Planulina wuellerstorfi* (Schwager 1866)**

**DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT DER  
CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

VORGELEGT VON

MARTINA BLÜMEL  
KIEL 2005

Referent: Prof. Dr. Imhoff  
Korreferent: Prof. Dr. Kuhnt

Tag der Disputation: Montag, 06. Februar 2006  
Zum Druck genehmigt: Mittwoch, 08. Februar 2006

.....  
(Der Dekan)

## INHALTSVERZEICHNIS

	<b>Zusammenfassung</b>	4
	<b>Summary</b>	6
1	<b>Einleitung</b>	8
1.1	Fragestellung der Arbeit	8
1.2	Biologie der Foraminiferen	9
1.2.1	Systematik und Taxonomie	9
1.2.2	Lebensweise der Foraminiferen	10
1.2.3	Entstehung und Evolution der Foraminiferen	11
1.3	Die Gruppe <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i>	12
1.3.1	Morphologische Charakterisierung	12
1.3.2	Lebensweise von <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i>	13
1.3.3	Evolution der Gruppe <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i>	13
1.3.4	Nomenklatur der Gattungen <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i>	14
1.4	Ribosomale Gene	14
1.5	Substitutionsraten der SSU rDNA bei Foraminiferen und die Hypothese der Molekularen Uhr	16
1.6	Stand der Forschung	17
1.7	Charakterisierung des Untersuchungsgebietes Ostgrönlandsee	19
1.7.1	Topographie	19
1.7.2	Hydrographie	20
1.7.3	Benthische Foraminiferen in der östlichen Grönlandsee	21
1.7.4	Die Reise ARK XIX/4a des deutschen Forschungsschiffes POLARSTERN (10.08.03 – 21.09.03 Tromsø – Longyearbyen)	22
2	<b>Material und Methoden</b>	24
2.1	Probenahme und Probenmaterial	24
2.2	Aufbereitung des Probenmaterials und morphologische Charakterisierung	25
2.3	DNA-Extraktion	26
2.4	Etablierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Amplifikation benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen	28
2.5	Primer-Design für die PCR und die Sequenzierung	31
2.6	Überprüfung der PCR durch Agarose-Gel-Elektrophorese	35
2.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	35
2.8	Klonierungsexperimente	36
2.9	Sequenzierung	37
2.10	Ethanol-Fällung	40
2.11	Phylogenetische Analyse	40
2.11.1	Alignment-Berechnung	41
2.11.2	Berechnung von Sekundärstrukturen	42
2.11.3	Berechnung phylogenetischer Stammbäume	45
2.12	Morphometrische Analyse der als <i>Planulina wuellerstorfi</i> identifizierten Individuen	48
3	<b>Ergebnisse</b>	50
3.1	Artenverteilung der benthischen Foraminiferen-Gemeinschaft in der östlichen Grönlandsee	51
3.2	Überprüfung der Spezifität der entwickelten Primer für die SSU rDNA von Foraminiferen	52

# Inhaltsverzeichnis

---

3.3	Ergebnisse zur Optimierung der PCR für die SSU rDNA von Einzelzellen benthischer Foraminiferen	55
3.4	Aus den Proben von ARK XIX/4a erhaltene Sequenzen	60
3.5	Ergebnisse der phylogenetischen Rekonstruktionen	63
3.5.1	Berechnung von Sekundärstrukturen	63
3.5.2	Genetische Variabilität innerhalb der <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i> -Gruppe	69
3.5.3	Klonierung der SSU rDNA ausgewählter Individuen von <i>Planulina wuellerstorfi</i>	73
3.6	Ergebnisse der morphometrischen Analyse	74
3.7	Berechnung molekularer Substitutionsraten innerhalb der <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i> -Gruppe auf Basis der SSU rDNA-Sequenzen	78
3.8	Auswertung der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen SSU rDNA-Sequenzen von <i>Cibicides lobatulus</i>	80
3.9	Phylogenetische Einordnung von <i>Cribrostomoides</i> sp. anhand der SSU rDNA-Sequenz	82
3.10	Ergebnisse der Amplifikation und Sequenzierung der SSU rDNA aus Sediment-Proben der Reisen RV MARION DUFRESNE 122, FS SONNE 164 und FS POLARSTERN ARK XVIII/1a	83
4	<b>Diskussion</b>	85
4.1	Artenverteilung der Foraminiferen-Fauna der östlichen Grönlandsee	85
4.2	Ausbeute der PCR und Sequenzierung	85
4.3	Genetische Variabilität innerhalb der <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i> -Gruppe	86
4.4	Genetische Analyse hinsichtlich des Vorliegens verschiedener Kopien des Gens für die SSU rDNA innerhalb eines Individuums von <i>Planulina wuellerstorfi</i>	92
4.5	Phylogenetische Einordnung der SSU rDNA-Sequenzen von <i>Cribrostomoides</i> sp.	92
4.6	Molekulare Substitutionsraten innerhalb der Gruppe <i>Cibicides/Cibicidoides/Planulina</i>	93
4.7	Molekulare und Morphologische Daten	94
4.8	Diskussion der Analyse des Probenmaterials der Fahrten RV MARION DUFRESNE 122, FS SONNE 164, FS POLARSTERN ARK XVIII/1a	95
5	Literatur	97
6	Anhang	I

### Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die kombinierte molekularbiologische und morphometrische Analyse der benthischen rotaliiden Foraminiferen-Art *Planulina wuellerstorfi* in der östlichen Grönlandsee. Da es sich bei dieser Foraminiferen-Spezies um eine für paläozeanographische Rekonstruktionen wichtige Art handelt, ist es von zentraler Bedeutung, die Phylogenie dieser Art aufzuklären. Die östliche Grönlandsee ist durch ihre besonderen hydrographischen Verhältnisse (erhöhte laterale Fließgeschwindigkeiten an der Sediment-Wasser-Grenze durch den Ostgrönlandstrom) als geeignetes Untersuchungsgebiet anzusehen, da *Planulina wuellerstorfi* als epibenthischer Suspensionsfiltrierer angepasst an erhöhte laterale Bodenströmungen lebt.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein zusammenhängender Datensatz von SSU rDNA Sequenzen von *Planulina wuellerstorfi* von verschiedenen Stationen in der östlichen Grönlandsee erhalten werden. Auch wurden erstmalig SSU rDNA Sequenzen anderer benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen (*Cibrostomoides* sp., *Oridorsalis umbonatus*, *Triloculina* sp.) erhalten.

Insgesamt konnten 89 SSU rDNA-Sequenzen benthischer Foraminiferen von sieben Stationen eines Profils vom Schelf bis in die tiefe Ostgrönlandsee erhalten werden. 65 Sequenzen konnten *Planulina wuellerstorfi* zugeordnet werden.

Die in dieser Arbeit gefundene Artverteilung der benthischen Foraminiferen-Fauna der östlichen Grönlandsee steht in Übereinstimmung mit Literaturdaten. *Cibicides lobatulus* ist ein Vertreter des Schelfs sowie des oberen Kontinentalhanges und *Planulina wuellerstorfi* ist ein typischer Vertreter der Tiefsee-Foraminiferen-Fauna.

Anhand einer detaillierten Analyse der Sekundärstruktur der variablen Bereiche der SSU rDNA konnte die phylogenetische Position von *Planulina wuellerstorfi* innerhalb eines Clusters der rotaliiden benthischen Foraminiferen *Chilostomella ovoidea*, *Cibicides refulgens* und *Melonis affinis* aufgeklärt werden.

Es zeigten sich Sequenzvariabilitäten innerhalb der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe. Zwei verschiedene Sequenz-Typen konnten identifiziert werden. Die Sequenzen des Typs 1 deuteten aufgrund der hohen Similarität auf Sequenzen von *Cibicides lobatulus* hin. Diese Spezies wurde jedoch in solch großen Tiefen (> 2000 m) in der Literatur bisher nicht lebend beschrieben. Die morphometrische Analyse klassifizierte zwar Typ 1 als *Planulina wuellerstorfi*, zeigte aber signifikante Unterschiede zwischen Typ 1 und Typ 2. Der kombinierte molekularbiologische und morphometrische Ansatz liefert somit Hinweise auf das Vorliegen kryptischer Speziation innerhalb von *Planulina wuellerstorfi*.

## Zusammenfassung

---

Berechnungen der Evolutionsraten von *Planulina wuellerstorfi* und *Cibicides lobatulus* erbrachten eine Evolutionsrate von  $0.831 \times 10^{-9}$  Substitutionen/Position/Jahr. Diese Evolutionsraten sind in der gleichen Größenordnung wie bereits in der Literatur für *Ammonia* sp. ermittelte Substitutionsraten. Für die Divergenzzeit von *Cibicides refulgens* und *Planulina wuellerstorfi* bzw. *Cibicides lobatulus* wurden unter Annahme einer molekularen Uhr Werte von 16.53 – 30.53 Mio. Jahre ermittelt, was einer Divergenz dieser Arten im mittleren Miozän bis mittleren Oligozän entspricht.

### Summary

Aim of the present study was the elucidation of the phylogeny of the benthic rotaliid foraminiferal species *Planulina wuellerstorfi* in the East Greenland Sea using a combined molecular and morphometric approach. *Planulina wuellerstorfi* is an important species for paleoceanographic reconstruction, therefore it is necessary to enlighten the modern phylogenetic relationships within this species. Due to the special hydrographic settings (elevated lateral bottom current velocities caused by the Eastern Greenland Current), the East Greenland Sea can be regarded as a suitable location for these analyses, because *Planulina wuellerstorfi* prefers elevated bottom current velocities.

For the first time, a comprehensive dataset of SSU rDNA sequences from *Planulina wuellerstorfi* was obtained. In total, 89 SSU rDNA sequences of benthic foraminifera from seven stations of a shelf-deep sea transect could be obtained. 65 SSU rDNA sequences were assigned to *Planulina wuellerstorfi*. Moreover, SSU rDNA sequences from *Cibicides lobatulus*, *Oridorsalis umbonatus*, *Dentalina* sp., *Pyrgo* sp. and *Cribrostomoides* sp. were obtained.

The benthic foraminiferal species composition in the East Greenland Sea found during this study is in accordance with literature data. *Cibicides lobatulus* is a typical shelf species and was also found on upper slope stations; *Planulina wuellerstorfi* is a characteristic deep sea species.

Secondary structure analysis of the variable regions of the SSU rDNA turned out to be the decisive criterion for the phylogenetic classification of *Planulina wuellerstorfi*. The integration of these regions into phylogenetic analysis showed the phylogenetic position of *Planulina wuellerstorfi* together with *Chilostomella ovoidea*, *Cibicides refulgens* and *Melonis affinis*.

Sequence variabilities within *Planulina wuellerstorfi* were detected. Two different sequence types could be identified. Sequence type 1 pointed to *Cibicides lobatulus* because sequences were highly similar to one *Cibicides lobatulus* sequence from the EMBL database. However, occurrence of living *Cibicides lobatulus* has never been reported from these depths (> 2000 m). Based on morphological determination, type 1 was classified as *Planulina wuellerstorfi*, but morphometric analysis showed significant differences between types 1 and 2. Thus, the combined molecular and morphometric approach indicated cryptic speciation within *Planulina wuellerstorfi*.

## Zusammenfassung

---

Calculation of evolutionary rates for *Planulina wuellerstorfi* and *Cibicides lobatulus* resulted in  $0.831 \times 10^{-9}$  substitutions/site/year. Assuming a molecular clock for SSU rDNA, a divergence time of 16.53 - 30.53 Mio y (middle Miocene – middle Oligocene) was calculated for divergence time of *Cibicides refulgens* from *Planulina wuellerstorfi* and *Cibicides lobatulus*.



## 1 Einleitung

### 1.1 Fragestellung der Arbeit

Foraminiferen kommen im Meer ubiquitär vor und ihre Kalkschalen werden über Jahrmillionen in den Ozeansedimenten konserviert. In der Paläozeanographie, einer Disziplin der Geowissenschaften, welche sich mit der Rekonstruktion und Modellierung vergangener Klimata der Erde beschäftigt, werden bestimmte Isotopenverhältnisse ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ;  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) in den Schalen von Foraminiferen standardmäßig verwendet. Das  $\delta^{13}\text{C}$ -Verhältnis in den Schalen der kalkschaligen benthischen Foraminiferen-Spezies *Planulina wuellerstorfi* (Schwager 1866) wird in der Paläozeanographie als Näherungswert (*proxy*) für die Ventilation des Bodenwassers genutzt.

Die Taxonomie der Foraminiferen beruht klassischerweise auf Merkmalen der Schale. Dies ist auch die einzig mögliche Taxonomie für fossile Formen. Heute wird zur Aufklärung der taxonomischen Position und der Phylogenie der Foraminiferen auch eine molekulare Taxonomie verwendet, die auf der Analyse der Sequenz der ribosomalen Gene beruht. Hier wird standardmäßig das Gen für die kleine Untereinheit der ribosomalen RNA, die *small subunit ribosomal DNA* (SSU rDNA, Synonym 18S rDNA) eingesetzt.

Anhand eines kombinierten molekularbiologischen und morphologischen Ansatzes ist es möglich, die Phylogenie von modernen Foraminiferen aufzuklären. Molekularbiologische Ergebnisse können so Hinweise für paläozeanographische Interpretationen liefern. Ein solcher Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit für die benthische kalkschalige Tiefsee-Foraminiferen-Art *Planulina wuellerstorfi* (Schwager 1866) verfolgt.

*Planulina wuellerstorfi* gilt als kosmopolitische benthische Foraminiferen-Art; anhand der vorliegenden molekularbiologischen Untersuchung sollte diese Hypothese überprüft werden. Bei vielen planktonischen Foraminiferen-Arten wurde hingegen das Phänomen der kryptischen Speziation bereits beschrieben. Ein Vorliegen der kryptischen Speziation bei benthischen Foraminiferen sollte anhand der molekularbiologischen Analyse von SSU rDNA-Sequenzen überprüft werden.

# Einleitung

---

## 1.2 Biologie der Foraminiferen

Foraminiferen sind einzellige, hauptsächlich marin lebende Eukaryonten. In der neueren Literatur wurden auch limnische und terrestrische Formen beschrieben (Meisterfeld et al. 2001; Pawlowski et al. 1999). Im marinen Bereich kommen Foraminiferen ubiquitär vor; planktonische Foraminiferen leben pelagisch (Epipelagial und Mesopelagial), benthische Foraminiferen können entweder epibenthisch angeheftet an Steinen oder endobenthisch im Sediment eingegraben leben.

### 1.2.1 Systematik und Taxonomie

Foraminiferen werden als einzellige Organismen den Protozoa zugeordnet. Innerhalb der Protozoa bilden die Foraminiferen eine Ordnung der Klasse Rhizopoda. Sie werden hier aufgrund der speziellen Form ihrer Pseudopodien, den Granuloreticulopodien, weiterhin der Unterordnung Granuloreticulosea zugeordnet (Westheide & Rieger 2004). Innerhalb der Granuloreticulosea bilden die Foraminiferida mit ca. 4000 rezenten benthischen und ca. 40 planktonischen Arten die größte systematische Gruppe; darüber hinaus sind ca. 30.000 fossile Taxa bekannt (Westheide & Rieger 2004). Die benthischen Foraminiferen können aufgrund der Beschaffenheit ihrer Schale in vier verschiedene systematische Gruppen untergliedert werden (Tabelle 1). In der neueren Literatur wird basierend auf Ergebnissen molekularbiologischer Analysen eine Revision der *Allogromiida* und *Astrorhizida* vorgeschlagen (Pawlowski 2000).

Tabelle 1 : Übersicht über die verschiedenen taxonomischen Gruppen der Foraminiferen sowie die Charakteristika, die für die Klassifizierung verwendet werden.

Morphologisches Merkmal	Taxonomische Klassifizierung			
	<b>Allogromiida</b>	<b>Astrorhizida</b>	<b>Textulariida</b>	<b>Rotaliida</b>
	monothalam	monothalam	polythalam	monothalam polythalam
<b>Anordnung der Kammern</b>	-	-	serial	serial rund
<b>Material zum Kammeraufbau</b>	organisch (Membran)	organisch und anorganisch	organisch und anorganisch	anorganisch (Kalk)

Die einkammerigen (monothalamen) *Allogromiida* bilden lediglich eine dünne Membran aus und besitzen keine feste Schale. Die *Astrorhizida* sind ebenfalls einkammerig (monothalam); sie besitzen wie die mehrkammerigen (polythalamen) *Textulariida* eine agglutinierte Schale (anorganisches Material ist in eine organische Matrix eingelagert). Die *Rotaliida* sezernieren eine kalkhaltige Schale, wobei es sowohl monothalame (z.B. *Lagena* sp.) als auch polythalam (z.B. *Planulina wuellerstorfi*) Formen gibt. Unterschieden wird bei den Rotaliida in perforate Formen (Schale mit Poren durchsetzt, z.B. *Planulina wuellerstorfi*) und imperforate Formen

(keine Poren, z.B. *Lagena* sp.). Die planktonischen Foraminiferen werden aufgrund ihrer kalkhaltigen Schale systematisch zu den *Rotaliida* gerechnet.

Die Taxonomie innerhalb der Foraminiferen beruht bisher nahezu ausschließlich auf Merkmalen der Schalenanatomie (Jones 1994; Loeblich & Tappan 1988). Erst seit Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die molekulare Taxonomie für Foraminiferen angewandt (Langer et al. 1993a; Pawlowski et al. 1994b; Wray et al. 1993). Durch Sequenzierung des Gens für die RNA der großen Untereinheit der Ribosomen (*large subunit ribosomal DNA*, LSU rDNA) konnte die genaue systematische Position der Foraminiferen innerhalb der Protozoa aufgeklärt werden (Pawlowski et al. 1994a). Anhand molekularbiologischer Arbeiten wurde auch gezeigt, dass sich die planktonischen Taxa aus den benthischen *Rotaliida* entwickelt haben (Darling et al. 1997). Die Positionierung einiger bis dahin unbekannter Taxa (z.B. *Xenophyophora*) innerhalb der Foraminiferen konnte so aufgeklärt werden (Pawlowski et al. 2003b). Anhand von Analysen der SSU rDNA konnten auch membranöse limnische bzw. terrestrische Formen, deren phylogenetische Position vorher unklar war, den Foraminiferen zugerechnet werden, so dass die Foraminiferen heute nicht mehr als rein marine Gruppe gelten (Meisterfeld et al. 2001; Pawlowski et al. 1999).

### 1.2.2 Lebensweise der Foraminiferen

Planktonische Foraminiferen ernähren sich meist räuberisch oder als Weidegänger von Phytoplankton; bei benthischen Foraminiferen sind verschiedenste Ernährungsweisen bekannt. So ernährt sich die epibenthische Tiefsee-Foraminifere *Planulina wuellerstorfi* durch Filtration von mit Bodenströmungen herangetragenem Material (Suspensionsfiltration); die endobenthische Art *Uvigerina* sp. ernährt sich detritivor. Allgemein anerkannt ist die Anpassung verschiedener Foraminiferen-Arten an ein unterschiedliches Nahrungsangebot. Die Verteilung der verschiedenen Foraminiferen-Arten im Sediment (bis in ca. 15 cm Sediment-Tiefe) wird mit unterschiedlichen Präferenzen hinsichtlich des Nahrungsangebotes sowie des Sauerstoffgehaltes im Sediment erklärt (Gooday & Rathburn 1999; Mackensen et al. 2000). So wird angenommen, dass einige endobenthische detritivore Arten eher an hohe puls-artige Stoff-Flüsse wie z.B. nach einer Phytoplankton-Blüte angepasst sind (z.B. *Eponides pusillus*, *Nonionella iridea*), während epibenthische Suspensionsfiltrierer meist eher geringere konstante Stoff-Flüsse tolerieren (Altenbach 1992b; Gooday 2002). Von benthischen Flachwasser-Foraminiferen ist bekannt, dass sie in Symbiose mit Diatomeen oder Dinoflagellaten leben können (Pawlowski et al. 2001a; Pawlowski et al. 2001b). Auch bei benthischen Tiefsee-Foraminiferen werden Symbiosen mit Bakterien vermutet (Bernhard 2003).

Die Fortbewegung benthischer Foraminiferen erfolgt mit Hilfe ihrer Pseudopodien, die als Reticulopodien bezeichnet werden. Diese Reticulopodien bilden ein

## Einleitung

---

anastomosierendes Netzwerk, welches sowohl zur Fortbewegung als auch zur Ernährung (Beutefang bei planktonischen Foraminiferen, Filtration) eingesetzt werden kann. Besonders von endobenthischen Foraminiferen (*Bulimina sp.*, *Uvigerina sp.*) wird angenommen, dass sie sich im Sediment aktiv entlang vorhandener Gradienten (z.B. Sauerstoff-Gehalt) bewegen (Duijnsteet et al. 2003; Mackensen et al. 2000).

Über die Vermehrung der Foraminiferen ist relativ wenig bekannt. In einigen Experimenten ist es gelungen, Foraminiferen zu kultivieren (Chandler et al. 1996; Havach et al. 2001; Heinz et al. 2002; Nigam & Caron 2000). Während der Kultivierung fand ein Ausschwärmen von Gameten statt, eine Verschmelzung dieser konnte jedoch nicht beobachtet werden (Kimoto et al. 2003). Es wird angenommen, dass Foraminiferen über einen heterophasischen Generationswechsel verfügen, bei welchem eine diploide (durch sexuelle Fortpflanzung entstandene) Generation einer haploiden (durch asexuelle Vermehrung entstandenen) Generation folgt. Die Gameten sind in der Regel begeißelt, und es kann in bestimmten Entwicklungsstadien Kerndualismus auftreten (Westheide & Rieger 2004). Foraminiferen-Arten mit dimorphen Lebenszyklen sind bekannt (Pawlowski & Lee 1991; Röttger et al. 1986). Auch eine Änderung der Morphologie während des Wachstums wurde beschrieben (Haynes 1981; Kitazato et al. 2000). Morphologische Variation von Foraminiferen kann durch unterschiedliche Umweltparameter ausgelöst werden (Boltovskoy et al. 1991). Faktoren wie Temperatur, Salzgehalt, gelöster Sauerstoff, Lichteinfluss oder Ernährung können die Schalenmorphologie beeinflussen (Boltovskoy et al. 1991; Holzmann 2000).

### 1.2.3 Entstehung und Evolution der Foraminiferen

Die ältesten fossilen Funde von Foraminiferen stammen aus dem frühen Kambrium (ca. 560 Mio. Jahre, Culver (1991)). Die zunehmende Komplexität von Foraminiferen-Schalen wurde als „major trend“ in der Foraminiferen-Evolution angesehen (Hansen 1979). Die folgenden Merkmale stehen jedoch nach Pawlowski et al. (1996) mit der frühen Entstehung der Foraminiferen im Widerspruch: die hohe Komplexität der Schalen-Morphologie, komplexe sexuelle Lebenszyklen mit einem Wechsel zwischen diploider und haploider Generation und der Besitz von Endosymbionten. Es wird davon ausgegangen, dass kalzitische Formen sich aus einem agglutinierten Vorfahren entwickelt haben, was durch molekulare Daten bestätigt werden konnte. Im Devon (400 Mio. Jahre) erfolgte eine Radiation der agglutinierten Formen sowie der heute als ausgestorben geltenden kalkschaligen *Fusulinidae*. Die porzellanösen *Miliolida* traten erstmals im Karbon auf (350 Mio. Jahre), die ersten *Rotaliida* im frühen Jura (200 Mio. Jahre) (Tappan & Loeblich 1988). Die planktonischen Foraminiferen wurden ebenfalls auf das frühe Jura (200 Mio Jahre) datiert (Görög 1994). Aufgrund von genetischen Analysen wird heute ein polyphyletischer Ursprung dieser Gruppe, hervorgegangen

aus den benthischen Foraminiferen, angenommen (Darling et al. 1997; de Vargas et al. 1997). Fünf Episoden mit sehr hohen Aussterberaten (Ende des Ordoviziums (436 Mio. Jahre), des Perms (245 Mio. Jahre), der Trias (205 Mio. Jahre) und der Kreide (65 Mio. Jahre)) beeinflussten die Diversifizierung sowohl der planktischen als auch der benthischen Foraminiferen stark.

## 1.3 Die Gruppe *Cibicidoides/Cibicides/Planulina*

### 1.3.1 Morphologische Charakterisierung

Die benthische Foraminiferen-Gattung *Cibicides* ist aufgrund ihrer polythalamen kalkhaltigen Schale ein Vertreter der Ordnung der Rotaliida. Die Anatomie der Kalkschale wird in der Mikropaläontologie als maßgebliches Charakteristikum zur Artbestimmung herangezogen. Die Schale der Spezies *Planulina wuellerstorfi* (Schwager 1866) ist charakterisiert durch eine plane bis trochospirale Umbilicalseite (Nabelseite, Abb. 1); die Spiralseite kann spirokonkav bis spirokonvex ausgebildet sein. Im äußersten Umgang findet man bei *Planulina wuellerstorfi* 9 – 11 Kammern. Die Kammern sind durch gut ausgebildete Suturen voneinander separiert. Die Kammern der Spiralseite sind mit etwas größeren Poren versehen als die der Umbilicalseite. Bandy (1967) konnte beobachten, dass *P. wuellerstorfi*-Individuen aus dem Bathyal/Abyssal morphologische Abweichungen zu denen aus flacheren Gebieten (Struktur der Suturen) zeigen.

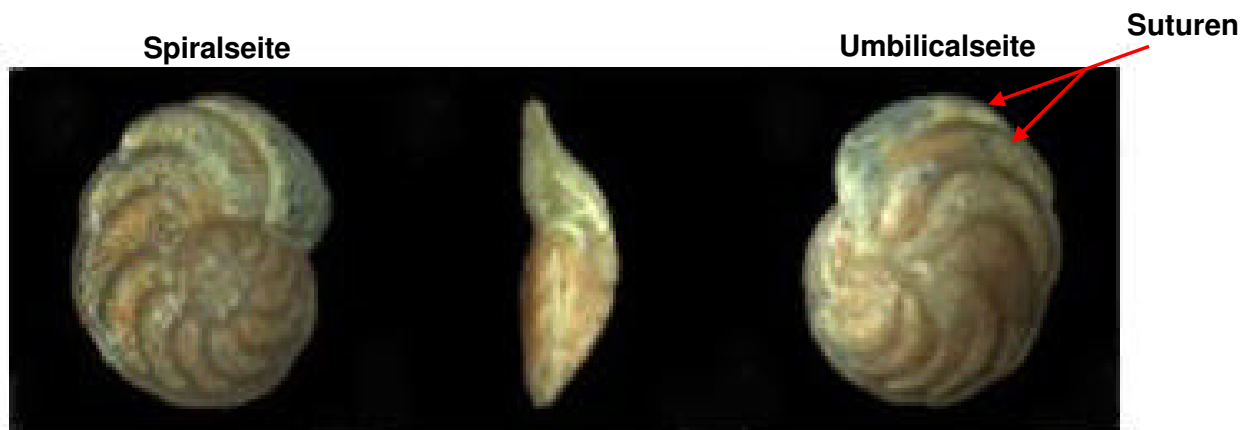


Abb. 1: Morphologie der Spezies *Planulina wuellerstorfi*, modifiziert nach Holbourn & Henderson (2002). Spiralseite: meist plan bis spirokonkav ausgebildet; Seite mit welcher das Individuum am Untergrund festgeheftet ist; Umbilicalseite: meist spirokonvex ausgebildet; der Strömung exponierte Seite. Mitte: deutlich erkennbar die konvexe Wölbung der Umbilicalseite.

## Einleitung

---

### 1.3.2 Lebensweise von *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*

Vertreter der Gattung *Cibicides/Cibicidoides/Planulina* sind ubiquitäre marine benthische Foraminiferen. Sie leben sowohl neritisch als auch im Abyssal. Einen Überblick über die Angabe der Lebensräume aus der Literatur gibt Tabelle 2.

Tabelle 2 : Lebensräume rezenter Arten der Gattungen *Cibicidoides/Cibicides/Planulina* nach Holbourn & Henderson (2002).

Art	Lebensraum
<i>C. subhaidingeri</i>	Neritisch – unteres Bathyal
<i>C. lobatulus</i>	Neritisch
<i>C. robertsonianus</i>	Bathyal – Abyssal
<i>C. mundulus</i>	Bathyal – Abyssal
<i>C. bradyi</i>	Bathyal – Abyssal
<i>P. wuellerstorfi</i>	Bathyal – Abyssal

*Planulina wuellerstorfi* ist eine für die Tiefsee charakteristische epibenthische Foraminiferen-Art (Siedlung auf Hartsubstraten und sessilen und vagilen Metazoen) und ernährt sich durch Suspensionsfiltration (Corliss 1985; Lutze & Thiel 1989). Auch von *Cibicides lobatulus* (Walker & Jacob 1798) ist eine epibenthische Lebensweise bekannt (Altenbach 1992b).

*Planulina wuellerstorfi* gilt als eine Indikator-Art für einen geringen bis mittleren Kohlenstoff-Fluss (2.5-9 g/m<sup>2</sup>/Jahr, Altenbach et al. (1999)) und wird bei paläozeanographischen Rekonstruktionen als bathymetrische Indikator-Art für Wassertiefen über 1000 m genutzt (Holbourn & Henderson 2002).

In der Paläozeanographie werden die Schalen dieser Foraminiferen-Art für die Analyse stabiler Isotope genutzt, da sie durch ihre epibenthische Lebensweise und den Einbau von Kalk in ihre Schale die d<sup>13</sup>C-Werte des Bodenwassers zum Zeitpunkt der Inkorporation in die Schale widerspiegelt. In flacheren Gebieten, in welchen *Planulina wuellerstorfi* nicht vorkommt, werden die d<sup>13</sup>C-Werte in den Schalen von *Cibicides lobatulus* als proxy für die Ventilation des Bodenwassers genutzt (Weinelt et al. 2001).

### 1.3.3 Evolution der Gruppe *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*

Die Gruppe *Cibicides/Cibicidoides/Planulina* wird erstmalig im frühen Eozän (Ypresian, 55.8 Mio Jahre) mit den Arten *Cibicidoides micrus* und *Cibicidoides bradyi* beschrieben (Holbourn & Henderson 2002). Eine Chronologie der Entstehung der Arten der Gattungen *Cibicides/Cibicidoides/Planulina* ist in Abb. 2 dargestellt.

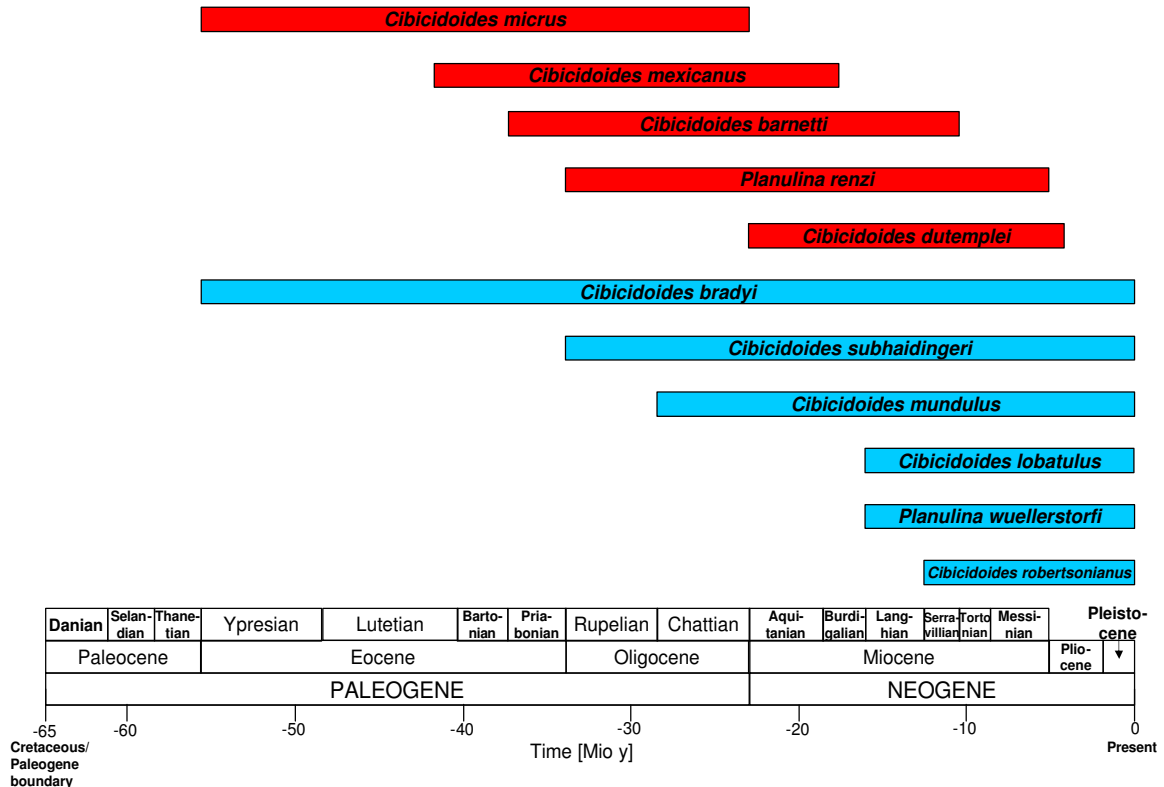


Abb. 2: Chronologie des Auftretens verschiedener Arten von *Cibicoides/Cibicides/ Planulina* im fossilen „Record“ nach Holbourn & Henderson (2002). Rot: ausgestorbene Arten; blau: rezente Arten.

### 1.3.4 Nomenklatur der Gattungen *Cibicides/ Cibicoides/ Planulina*

Die Nomenklatur der verschiedenen Arten ist uneinheitlich. So wurden verschiedenen Taxa mehrere Namen zugeordnet. *Planulina wuellerstorfi* (Schwager 1866) wird synonym verwendet mit *Cibicoides wuellerstorfi*, *Cibicides wuellerstorfi*, *Fontbotia wuellerstorfi* oder *Anomalina wuellerstorfi*, dem Namen der Erstbeschreibung. *Cibicoides subhaidingeri* wird auch *Truncatulina haidingeri*, *Cibicides subhaidingeri* oder *Cibicoides yoitaensis* genannt. Die Typen-Spezies der Gattung *Cibicoides* ist *Cibicoides mundulus* (Thalman 1939). In der vorliegenden Arbeit wurde der Taxonomie von Holbourn & Henderson (2002) folgend der Name *Planulina wuellerstorfi* verwendet.

## 1.4 Ribosomale Gene

Die Taxonomie der Foraminiferen beruht, wie im Abschnitt 1.3.1 dargestellt, hauptsächlich auf Charakteristika der Schalenanatomie. Pawlowski (1994-2004) und (Darling et al. 1996-2003) nutzten in den 1990er Jahren erstmals molekulare Untersuchungsverfahren, um die Phylogenie der Foraminiferen aufzuklären.

Gene für die ribosomale RNA sind in allen Organismen vorhanden. Diese können in mehreren Kopien vorliegen, da sie die genetische Information zum Aufbau der

## Einleitung

Ribosomen enthalten. Ribosomen sind in der Zelle die Orte der Proteinbiosynthese; sie sind also für jede Zelle von zentraler Bedeutung. Daher sind ribosomale Gene sehr konserviert; sie sind in allen eukaryontischen Organismen in vergleichbarer Weise organisiert (Abb. 3).

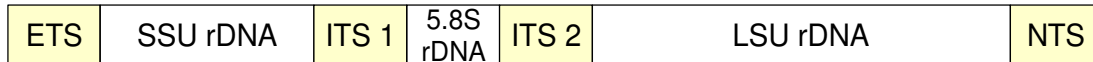


Abb. 3: Organisation des eukaryontischen Operons für die ribosomale RNA. ETS: external transcribed spacer; SSU rDNA: small subunit ribosomal DNA; ITS1: internal transcribed spacer 1; 5.8S DNA; ITS2: internal transcribed spacer 2; LSU rDNA: large subunit ribosomal DNA; NTS: non transcribed spacer. Gelb markiert: nicht kodierende Bereiche; blau markiert: kodierende Bereiche

Charakteristisch für die Organisation ist, dass **kodierende** Abschnitte von **nicht kodierenden** Abschnitten unterbrochen werden (farbliche Markierung in Abb. 3). Die kodierenden Abschnitte dieser Gene sind eingeteilt in sehr konservierte Bereiche, welche über verschiedene taxonomische Ebenen in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind sowie variable Regionen, welche artspezifisch verschieden sein können. Bei Eukaryonten (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*) ist das Gen für die RNA der kleinen Untereinheit der Ribosomen, die SSU rDNA, üblicherweise ca. 1900 Basenpaare (bp) lang. Foraminiferen sind phylogenetisch sehr alte Organismen; sie besitzen innerhalb der variablen Bereiche ihrer SSU rDNA Insertionen von meist Adenin- und Thymin-Basen. Diese Insertionen innerhalb der variablen Bereiche führen dazu, dass die SSU rDNA der Foraminiferen ca. 4000 Nucleotide (z.B. bei *Ammonia becarii*) umfasst. Für die phylogenetische Analyse wird jedoch in den meisten Untersuchungen nicht das ganze Gen analysiert wie es z.B. in der bakteriellen Phylogenie für die 16S rDNA üblich ist. Es wird nur ein ca. 1000 Nucleotide (*nt*) langes 3'-terminales Fragment verwendet, da dieses Fragment mit acht konservierten, vier variablen und drei Foraminiferen-spezifischen variablen Bereichen über ausreichende phylogenetische Information verfügt, um phylogenetische Rekonstruktionen zu ermöglichen (Abb. 4, Huber et al. (1997)).

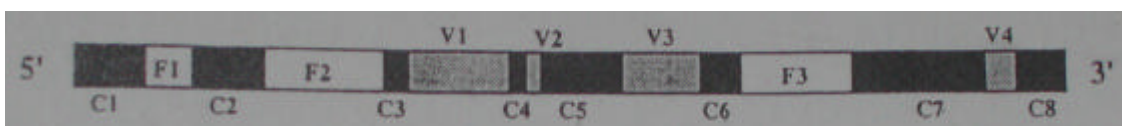


Abb. 4: 3'terminale Region der SSU rDNA der Foraminiferen. C1 – C8: konservierte Bereiche; F1-F3: Foraminiferen-spezifische Bereiche; V1 – V4: variable Bereiche (aus Huber et al. (1997)).



### 1.5 Substitutionsraten der SSU rDNA bei Foraminiferen und die Hypothese der molekularen Uhr

Bei Eukaryonten wurden höhere Substitutionsraten in der SSU rDNA gefunden als bei Prokaryonten. (Syvanen 2002). Die ribosomalen Gene werden lediglich in RNA transkribiert; sie kodieren nicht für Proteine. Hierin könnte der Grund dafür liegen, dass die Transkriptionsprodukte der ribosomalen Gene (die rRNAs) bei Foraminiferen trotz ihrer Insertionen und der daraus resultierenden Gesamtlänge der SSU rDNA funktional sind.

Die von (Kimura 1968) postulierte Neutralitätstheorie besagt, dass viele molekulare Unterschiede selektiv neutral sind. Nach der Neutralitätstheorie sollte die Evolutionsrate von Molekülen (z.B. Proteinen, DNA-Sequenzen), welche keiner Funktionalität unterliegen höher sein als die von Molekülen mit festgelegter Funktion, so genannten *constrained molecules* (Kimura 1983). Die 18S, 5.8S und 28S rDNA sind Vertreter von *constrained molecules*; es ist also anzunehmen, dass ihre Evolutionsrate wesentlich geringer ist als die der nicht kodierenden Abschnitte des Operons (ETS, ITS1 und ITS2, NTS).

Für planktonische Foraminiferen werden von de Vargas et al. (1997) für die SSU rDNA mittlere Substitutionsraten von  $3 \times 10^{-9}$  Substitutionen/Position/Jahr angegeben. Diese sind deutlich höher als die mittlere Substitutionsrate der SSU rDNA von Diatomeen, welche wiederum eine 2-3fach höhere Substitutionsrate als die SSU rDNA von Metazoen aufweisen (de Vargas et al. 1997; Sorhannus 1996). Es wird angenommen, dass die Substitutionsraten in planktonischen Foraminiferen bis zu 100fach höher sind als die in benthischen Foraminiferen und dass die Substitutionsraten innerhalb der verschiedenen benthischen Foraminiferen-Linien variabel sein können (Pawlowski et al. 1997). Die höchsten Substitutionsraten bei benthischen Foraminiferen werden von Pawlowski et al. (1997) für *Ammonia* sp. (Rotaliida) beschrieben ( $0.5 \times 10^{-9}$  Substitutionen/Position/Jahr) und die niedrigsten für agglutinierte Textulariida ( $2 \times 10^{-11}$  Substitutionen/Position/Jahr).

Die Hypothese der molekularen Uhr (molecular clock hypothesis, MCH) wurde von Zuckerkandl & Pauling (1965) postuliert. Laut dieser Hypothese kann anhand der Differenzen in der Sequenz zweier verschiedener Arten die Zeit der Divergenz vom letzten gemeinsamen Vorfahren berechnet werden.

Die Annahme einer molekularen Uhr setzt die Gültigkeit dreier Annahmen voraus: 1. das Wissen über den genauen Entstehungszeitpunkt einer Art, 2. das untersuchte Gen muss eine konstante Evolution zeigen, die sich in eine Uhr umwandeln lässt und 3. jede

## Einleitung

---

Base auf dem sequenzierten DNA-Fragment muss mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zu jeder anderen Base mutieren.

Der auf Fossilfunden basierende Datensatz liefert insbesondere für Foraminiferen eine sehr gute Datenbasis zur zeitlichen Entstehung und Evolution der verschiedenen Arten. Die belegten Entstehungszeitpunkte für verschiedene Vertreter der *Cibicides/Cibicidoides*-Gruppe aus dem fossilen Datensatz sind in Abb. 2, Seite 12 dargestellt. Im Fall von *Cibicides lobatulus* und *Planulina wuellerstorfi* ist dieser Zeitpunkt innerhalb enger Grenzen bekannt, bei *Cibicides refulgens* ist dieser Zeitpunkt unbekannt.

### 1.6 Stand der Forschung

Extraktion von DNA aus Foraminiferen und die Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für Foraminiferen-DNA wurde erstmals von Langer et al. (1993b), Wray et al. (1993) und Pawlowski et al. (1994a) beschrieben. Die phylogenetische Stellung der Foraminiferen konnte anhand molekularer Daten (SSU rDNA Sequenzen) innerhalb der Eukaryonten/Protozoa von Pawlowski et al. (1996) aufgeklärt werden.

Aktuell sind in internationalen Datenbanken insgesamt ca. 1360 DNA-Sequenzen von Foraminiferen aufgeführt, davon sind ca. 830 Sequenzen der 18S rDNA und 450 sind Sequenzen der 28S rDNA. Für die DNA von Foraminiferen ist eine Vielzahl an spezifischen Primern entwickelt worden (Übersichtstabelle im Anhang E). In internationalen Sequenz-Datenbanken sind aktuell drei Sequenzen der *Cibicides/Cibicidoides*-Gruppe zu finden. Eine Sequenz der SSU rDNA (CRE514839) wurde von *Cibicides refulgens* erhalten (Pawlowski et al. 2003a) und es wurde weiterhin je eine SSU rDNA-Sequenz von *Cibicides lobatulus* (AY93472) und *Cibicides wuellerstorfi* (AY93471) beschrieben (Schweizer et al. 2005).

Durch die genetische Analysen der SSU/ LSU rDNA und anderer Abschnitte des Operons (ITS1, 5.8S rDNA) von planktonischen Foraminiferen konnte eine so genannte „kryptische Speziation“ in verschiedenen Arten nachgewiesen werden. Kryptische Speziation ist ein Prozess, der zur reproduktiven Isolation von Arten führt, die anhand ihrer Morphologie jedoch nicht unterscheidbar sind. Nur mithilfe der molekularen Analyse der DNA kann eine solche kryptische Speziation detektiert werden.

De Vargas et al. (1999 und 2001) wiesen nach, dass anhand rein morphologischer Analysen die Vielfältigkeit im Genotyp von *Orbulina universa* und *Globorotalia truncatulinoides* unterschätzt wurde. Bei *Orbulina universa* wird angenommen, dass die verschiedenen Genotypen einer morphologischen Gesamtheit an verschiedene hydrographische Gegebenheiten angepasst sind (de Vargas et al. 1999). Auch eine

Anpassung an bestimmte Konzentrationen von Nährstoffen oder POC/DOC-Konzentrationen (POC - particulate organic carbon/DOC - dissolved organic carbon) sind denkbar. De Vargas et al. (2004) postuliert, dass morpho-taxonomische Arten, welche einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, Super-Spezies darstellen. Diese bestehen aus genetisch verschiedenen Schwester-Taxa, die sich durch die Besetzung unterschiedlicher ökologischer Nischen voneinander unterscheiden. Innerhalb aller bisher genetisch untersuchten planktonischen Foraminiferen-Arten konnten je nach Art drei bis sechs verschiedene Genotypen verschiedener Gene (SSU rDNA, ITS, tufA) nachgewiesen werden (de Vargas et al. 2004). Auch bei verschiedenen Coccolithophoriden-Arten wurde bereits kryptische Speziation (Tabelle 3, (de Vargas et al. 2004)).

Tabelle 3 : Aktuell vorliegende Datensätze zur Detektion der kryptischen Speziation bei planktonischen Foraminiferen und Coccolithophoriden (modifiziert nach de Vargas et al. (2004)).

Morphospecies	Gene(s)	# of genetic types	# of specimens genotyped	# of stations, geographic locations
<b>Foraminifer</b>				
<i>Orbulina universa</i>	SSU/ITS rDNA	3	764 (65 seq/700 RFLP)	102; large transects: Atlantic, Indian Ocean, South Pacific. See Fig. 3
<i>Neogloboquadrina pachyderma (sin)</i>	SSU rDNA	4	263	~30; 4 transects in the North and South Atlantic
<i>N. pachyderma (dext)</i>	SSU rDNA	2	66	~30; 4 transects in the North and South Atlantic, California
<i>Globorotalia truncatulinoides</i>	SSU/ITS rDNA	4	350 (4 SSUseq/50 ITS seq/230 RFLP)	102; large transects: Atlantic, Indian Ocean, South Pacific. See Fig. 3
<i>Globigerinella siphonifera</i>	SSU rDNA	4	189 (25 seq/164 RFLP)	55; large transect in the Atlantic
<i>Globigerina bulloides</i>	SSU rDNA	6	85	27; North and South Atlantic, California
<i>Turborotalita quinqueloba</i>	SSU rDNA	3	24	22; North and South Atlantic
<i>Neogloboquadrina dutertrei</i>	SSU rDNA	3	A few	Caribbean, Azores, Coral sea, California
<i>Globigerinoides ruber</i>	SSU rDNA	4	A few	Caribbean, Canary, Coral sea, California
<b>Coccolithophore</b>				
<i>Calcidiscus leptoporus</i>	TufA / SSU rDNA	3	13	6; East coast of North and South Atlantic, Mediterranean
<i>Coccolithus pelagicus</i>	TufA / SSU rDNA	2	9	7; East coast of North and South Atlantic, Mediterranean
<i>Umbilicosphaera sibogae</i>	TufA / SSU rDNA	2	2	2; West coast of North Atlantic, Mediterranean
<i>Pleurochrysis carterae</i>	TufA / SSU rDNA	2	2	2; East coast of North Atlantic, California coast
<i>Helicosphaera carteri</i>	TufA	2	2	2; East coast of South Atlantic, Mediterranean

Eine deutliche Divergenz in der SSU rDNA zwischen planktonischen und benthischen Foraminiferen konnte von Pawlowski et al. (1997) gezeigt werden. Die SSU rDNA wurde von 52 Foraminiferen-Spezies (<http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz/>

## Einleitung

---

[page+srsq2+-noSession](#)) vollständig sequenziert. Die durchschnittliche Länge der SSU rDNA in benthischen Foraminiferen beträgt 2200-3500 nt, bei *Orbulina universa* 5500 nt (Pawlowski, unveröffentlicht). Die durchschnittliche Länge dieses Gens innerhalb von Eukaryonten beträgt in der Regel ca. 2000 nt; Foraminiferen besitzen also die längsten bekannten SSU rRNA-Gene (Pawlowski 2000). Innerhalb des für die meisten Untersuchungen verwendeten 3' terminalen Fragmentes der SSU rDNA befinden sich acht konservierte sowie vier variable Regionen sowie drei Foraminiferen-spezifische variable Regionen (Huber et al. 1997). Für die phylogenetische Analyse werden fast ausschließlich die konservierten Regionen verwendet, da sich die homologen Positionen dieser Bereiche leicht detektieren und in einem Alignment vergleichen lassen. Die variablen Bereiche sind artspezifisch, weshalb sie in der Regel für die Erstellung von Alignments nicht geeignet sind. Daher werden sie in den meisten Studien nicht in die weiterführende phylogenetische Analyse miteinbezogen. Eine Ausnahme bildet die Studie von Ertan et al. (2004). In dieser Untersuchung wurden erstmals die Sekundärstrukturen der variablen Bereiche der SSU rDNA benthischer Foraminiferen berechnet, wodurch es möglich wurde, diese Regionen in die phylogenetische Analyse mit einzubeziehen. Die Ergebnisse dieser Studie erbrachten eine generelle Übereinstimmung mit dem auf der Schalenmorphologie der Foraminiferen basierenden Datensatz. Innerhalb der *Rotaliida* konnten hier erstmals basierend auf molekularen Daten die elongaten *Buliminidae* von den spiralen *Rotaliidae* getrennt werden, was bei den bisherigen Studien basierend auf der molekularen Analyse der SSU rDNA-Sequenz nicht erreicht werden konnte.

### 1.7 Charakterisierung des Untersuchungsgebietes Ostgrönlandsee

#### 1.7.1 Topographie

Die östliche Grönlandsee gehört dem Seegebiet der Nordischen Meere (Nordic Seas, Greenland-Iceland-Norwegian Seas) an. Die Nordischen Meere werden durch verschiedene ozeanische Rücken in unterschiedliche Becken eingeteilt, zu denen das Grönland-Becken zählt (Abb. 5). Dieses wird im Westen begrenzt durch die grönländische Landmasse, im Süden durch die *Jan-Mayen fracture zone* und im Osten durch den *Mohs Ridge*, welcher im Nordosten in den *Knipovich Ridge* übergeht. Im Süden wird Wasser aus der Grönlandsee durch die Dänemarkstraße zwischen Island und Grönland (Tiefe der Schwelle 600 m; Schäfer et al. (2001)) in den tiefen Nordatlantik transportiert. Im Norden bildet die Framstraße die einzige Tiefenwasser-Verbindung zum Arktischen Ozean.

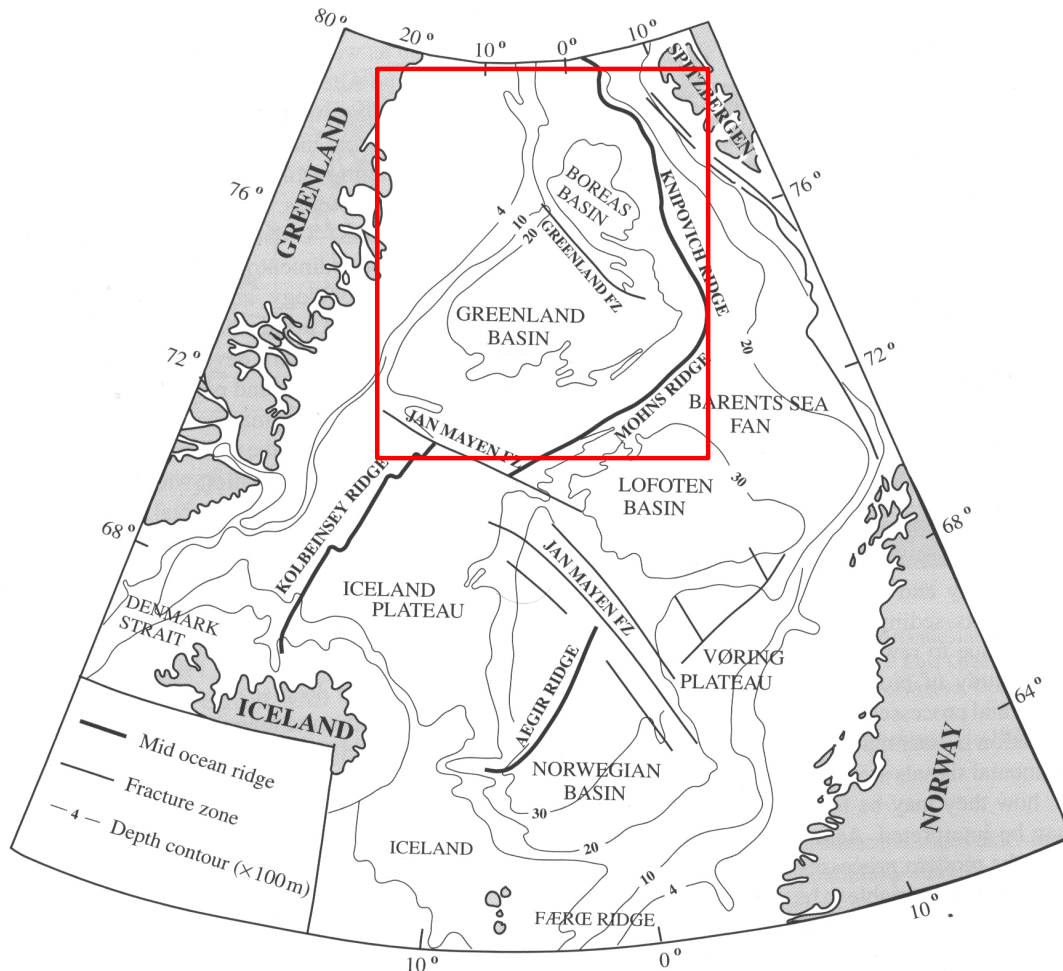


Abb. 5: Topographie der Greenland-Iceland-Norwegian Seas (GIN Seas, modifiziert nach Schäfer et al. (2001)). Rote Markierung: Grönländisches Becken.

## 1.7.2 Hydrographie

Die Nordischen Meere sind eine hydrographisch sehr kontrastreiche Region. Im Osten wird warmes Oberflächenwasser durch Ausläufer des Golfstroms in die Nordischen Meere transportiert, wohingegen im Süden durch die Dänemarkstraße ein Transport von kaltem polarem Wasser in den tiefen Nordatlantik stattfindet. Kaltes polares Wasser (PW) fließt als Ostgrönlandstrom (EGC – East Greenland Current) entlang des grönländischen Kontinentalhanges. Diese Wassermasse (Salinität 30-34; Temperatur -1.5°C – 0°C) kann sich von der Oberfläche bis in Tiefen von 150 – 800 m erstrecken (Schäfer et al. 2001). Während der meisten Zeit des Jahres ist die Region größtenteils von Meereis bedeckt. Die zentrale Grönlandsee wird als eine der Hauptregionen für die Bildung des Nordatlantischen Tiefenwassers (NADW) angesehen (Schäfer et al. 2001).

Die Hydrographie hat einen direkten Einfluss auf die Verteilung von Plankton, auf die Produktivität des Seegebietes (Primärproduktion) und durch die benthopelagische Kopplung (Hargrave 1973) auch auf die benthische Lebensgemeinschaft. In der östlichen Grönlandsee sind diese Faktoren stark von der saisonalen Eisbedeckung abhängig.

## Einleitung

---

### 1.7.3 Benthische Foraminiferen in der östlichen Grönlandsee

Die Verteilung der Benthos-Lebensgemeinschaft in der östlichen Grönlandsee zeigt eine ausgeprägte Tiefenzonierung (Piepenburg et al. 2001). Nach Piepenburg et al. (2001) können drei Hauptzonen unterschieden werden:

- 1) Schelf (< 400 m)
- 2) Hang (800 – 2000 m)
- 3) Tiefsee (> 2000 m)

Diese Zonierung trifft auch auf das Vorkommen benthischer Foraminiferen zu. Mit zunehmender Tiefe und entsprechend niedrigeren Flussraten organischen Kohlenstoffs steigt der Anteil der Foraminiferen, welche sich auf die Suspensionsfiltration als Ernährungsform spezialisiert haben (z.B. *Planulina wuellerstorfi*). Die mittleren Strömungsgeschwindigkeiten der arktischen Bodenströmungen in den Tiefseebecken liegen bei 1.5 – 2.5 cm/sec, (Galt 1967; Hunkins et al. 1969) und organisches Material wird so in die Tiefseebecken transportiert und dort und resuspendiert. So kommt es zur Ausbildung von Nepheloidschichten (Altenbach 1992a; Hunkins et al. 1969). Diese mit organischem Material angereicherten Nepheloidschichten sorgen für ein erhöhtes Nahrungsangebot für epibenthische Organismen, die sich durch Suspensionsfiltration ernähren.

Altenbach (1992b) beschreibt die Arten *Cibicides lobatulus*, *Elphidium bartletti*, *Cassidulina islandica* sowie *Cassidulina norcrossi* als typische Vertreter größerer arktischer Schelfsedimente. In tonigeren Sedimenten werden *Portatrochammina bipolaris*, *Cribrostomoides crassimargo*, *Cassidulina teretis* und *Saccammina sphaerica* als dominierende Arten angegeben (Altenbach 1992b). Für den Bereich des Kontinentalhanges mit tonigen Sedimenten und der atlantischen Zwischenschicht als dominierendem Wasserkörper werden die Arten *Cribrostomoides subglobosum*, *Melonis barleeaanum*, *Patellina corrugata*, *Valvulineria arctica*, *Stetsonia arctica*, *Oridorsalis umbonatus* und *Nummoloculina sp.* als charakteristisch angesehen.

Typische Vertreter der Tiefsee (arktisches Tiefenwasser) sind nach Altenbach (1992b) *Stetsonia arctica*, *Oridorsalis umbonatus*, *Eponides tumidulus horvarthi*, *Valvulineria arctica*, *Cassidulina teretis* und *Planulina wuellerstorfi*. Ab 2400 m wurden nur *Oridorsalis umbonatus*, *Triloculina tricarinata*, *Cribrostomoides subglobosum* und *Planulina wuellerstorfi* lebend nachgewiesen (Altenbach 1992b).



## 1.7.4 Die Reise *ARK XIX/4a* des deutschen Forschungsschiffes POLARSTERN (10.08.03 – 21.09.03 Tromsø – Longyearbyen)

Auf dem 4. Abschnitt der 19. Arktis-Reise (im Folgenden als *ARK XIX/4a* bezeichnet) des deutschen Forschungsschiffes POLARSTERN wurden auf 26 Stationen Proben mit Hilfe eines Multicorers genommen. Diese 26 Stationen wurden auf drei Profilen vom grönländischen Schelf bis in die Tiefsee beprobt (Abb. 6). Tabelle 4, Seite 21 zeigt eine Zusammenstellung der auf dieser Reise beprobten Stationen mit Tiefenangaben und geographischen Positionen.

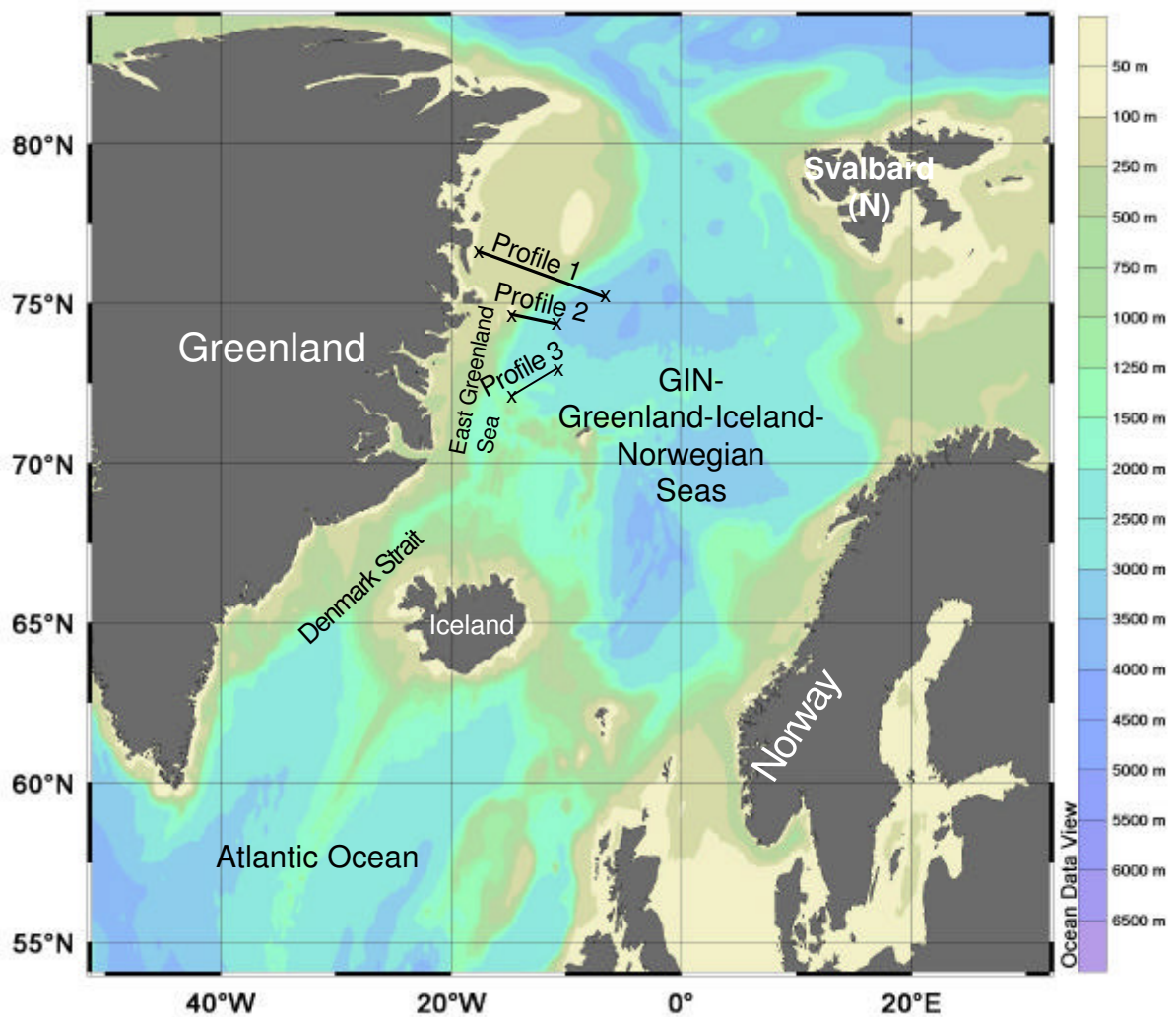


Abb. 6: Untersuchungsgebiet der Reise ARK XIX/4a des deutschen Forschungsschiffes FS POLARSTERN (10.08.03 – 21.09.03 Tromsø - Longyearbyen). Details zu den beprobten Stationen auf diesen Profilen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

## Einleitung

Tabelle 4 : Übersicht der auf der Reise ARK XIX/4a beprobten Stationen. Die im Focus der vorliegenden Arbeit stehenden sieben Stationen sind durch eine blaue Markierung hervorgehoben.

Profil Nr.	Stationsbezeichnung	Geographische Position	Tiefe [m]
1	PS64/487-1	76°8.939 N 17°16.975 W	236
1	PS64/488-1	76°10.966 N 15°10.858 W	306
1	PS64/489-1	76°14.138 N 11.00.106 W	302
<b>1</b>	<b>PS64/490-1</b>	<b>76°23.822 N</b> <b>09°59.437 W</b>	<b>253</b>
1	PS64/504-1	75°43.242 N 08°05.400 W	2284
<b>1</b>	<b>PS64/506-1</b>	<b>75°51.158 N</b> <b>08°38.838 W</b>	<b>1700</b>
<b>1</b>	<b>PS64/508-1</b>	<b>75°58.902 N</b> <b>09°11.849 W</b>	<b>1062</b>
<b>1</b>	<b>PS64/511-1</b>	<b>76°09.955 N</b> <b>10°06.943</b>	<b>276</b>
1	PS64/516-1	76°28.488 N 11°24.863 W	313
1	PS64/526-1	75°27.824 N 06°59.073 W	3374
<b>1</b>	<b>PS64/528-1</b>	<b>75°35.368 N</b> <b>07°34.591 W</b>	<b>3134</b>
<b>1</b>	<b>PS64/529-1</b>	<b>75°38.693 N</b> <b>07°48.121 W</b>	<b>2958</b>
<b>1</b>	<b>PS64/531-1</b>	<b>75°46.901 N</b> <b>08°20.833 W</b>	<b>1982</b>
1	PS64/533-1	75°54.584 N 08°54.525 W	1443
2	PS64/573-1	74°45.900 N 16°43.913 W	377
2	PS64/581-2	74°28.605 N 14°26.346 W	259
2	PS64/582-1	74°26.527 N 14°11.670 W	561
2	PS64/583-2	74°23.864 N 13°53.619 W	1399
2	PS64/584-1	74°22.157 N 13°39.596 W	1850
2	PS64/585-2	74°19.718 N 13°23.607 W	2254
2	PS64/586-1	74°18.086 N 13°06.959 W	2492
3	PS64/628-2	73°08.852 N 12°36.684 W	2702
3	PS64/706-1	72°42.618 N 16°36.141 W	910
3	PS64/707-2	72°41.501 N 16°28.599 W	1223
3	PS64/708-1	72°40.614 N 16°13.579 W	1600
3	PS64/710-2	72°37.476 N 15°40.268 W	1892



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probennahme und Probenmaterial

Die Probennahme erfolgte auf der Reise ARK XIX/4a mit einem Multicorer (MUC, Abb. 7). Dieses Gerät ist besonders geeignet, um ungestörte Sediment-Oberflächen zu erhalten. Es handelt sich bei allen Proben um Sedimentoberflächen, definiert als oberster Zentimeter des Sediments. Es wurden auf jeder Station ein bis drei MUC-Rohre beprobt; bei Mehrfachprobenentnahmen wurden die Oberflächen aus mehreren MUC-Rohren gepoolt.



Abb. 7: Probennahme während der Reise ARK XIX/4a mit Hilfe eines Multicorers.

Die Art der Probennahme ist essentiell für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Der Multicorer ist dem Großkastengreifer als Probenahmegerät vorzuziehen, da mit dem Multicorer ungestörte Sediment-Oberflächen gewonnen werden können. Dies ist besonders für die Untersuchung epibenthisch lebender Foraminiferen unerlässlich. Nachteilig an der Probennahme mit dem Multicorer ist allerdings die geringe Ausbeute an Sedimentoberfläche ( $78.53 \text{ cm}^3$  bei 10 cm Durchmesser pro Rohr und 1 cm Sedimenttiefe). Dieser Nachteil wurde in

## Material und Methoden

---

der vorliegenden Arbeit durch eine Zusammenführung der Sedimentproben kompensiert.

Für die vorliegende Arbeit stand Sedimentmaterial von drei weiteren Reisen zur Verfügung (RV MARION DUFRESNE (F) Reise MD122, FS SONNE (D) Reise SO164, FS POLARSTERN (D) Reise ARK XVIII/1a). Außerdem lag Probenmaterial aus dem Skagerrak vor. Da sich die molekularbiologische Analyse der Proben dieser Reisen aufgrund des Zustands des Probenmaterials als nicht durchführbar erwies, lag das Hauptaugenmerk der genetischen Untersuchungen auf Probenmaterial der Reise ARK XIX/4a. Gründe für die Probleme mit den Proben dieser Reisen werden im Abschnitt 4.8 diskutiert. Es wurden jedoch mit dem Probenmaterial der Reisen MD122, SO164 und ARK XVIII/1a sowie Probenmaterial aus dem Skagerrak zahlreiche Versuche zur Etablierung von PCR und Sequenzierung durchgeführt. Daher sind in den Tabellen 5 und 6, Seite 21 und 24 die für diese Proben erfolgten Methoden zur molekularbiologischen Analyse mit aufgeführt. Karten der auf diesen Reisen untersuchten Seegebiete sowie eine Übersicht über die auf diesen Reisen beprobten Stationen sind im Anhang A und B aufgelistet.

Die Proben der Reise ARK XIX/4a wurden während der Analyse mit dem Prefix PS für „POLARSTERN“ versehen. Jeder isolierten Foraminiferen-Zelle wurde eine fortlaufende Nummer zugeordnet. Die Proben-Bezeichnung **PS 692** bezeichnet also die isolierte Foraminifere Nr. **692** der Reise **ARK XIX/4a**.

### 2.2 Aufbereitung des Probenmaterials und morphologische Charakterisierung

Um molekularbiologische Analysen an benthischen Tiefsee-Foraminiferen durchführen zu können, muss das Probenmaterial entweder unmittelbar nach der Probennahme analysiert oder bei -20°C gelagert werden, damit der Abbau des genetischen Materials durch DNA-abbauende Enzyme (sog. DNAsen) weitgehend verhindert wird.

Nach der MUC-Beprobung des obersten Zentimeters des Sediments wurde die Probe durch sieben (Maschenweite 63 µm) unter kaltem Oberflächenwasser (2-4°C) fraktioniert; die Fraktion <63 µm wurde verworfen. Die Proben wurden teilweise (PS 1 – PS 379) unmittelbar danach unter gekühltem (4°C) Oberflächenwasser unter einem Binokular ausgesucht. Die Proben, welche nicht unmittelbar an Bord analysiert werden konnten, wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Labor des IFM-GEOMAR bei -20°C gelagert.

Die als lebend identifizierten Foraminiferen wurden der Taxonomie von Jones (1994) folgend bestimmt und mit einer mit dem Binokular verbundenen Digitalkamera (Nikon Coolpix 995) sowohl von der Umbilical- als auch von der Spiralseite fotografisch dokumentiert. Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit war, die genetischen Daten

mit morphologischen Daten in Zusammenhang zu bringen. Während der genetischen Untersuchungen erfolgt eine Zerstörung der Schale, so dass eine morphologische Analyse nach der genetischen Analyse an demselben Individuum nicht möglich ist. Daher ist die fotografische Dokumentation vor der genetischen Analyse vonnöten.

In der Mikropaläontologie werden Foraminiferen mit dem Farbstoff Bengal-Rot angefärbt, um lebende und tote Foraminiferen zu unterscheiden. Bengal-Rot stört jedoch die PCR; für molekularbiologische Methoden untersucht werden sollen, ist dieser Farbstoff zur Selektion lebender Foraminiferen daher ungeeignet. Die Proben befanden sich zum Zeitpunkt der morphologischen Untersuchung bereits in gefrorenem Zustand, d.h. alle in der Probe vorliegenden Foraminiferen konnten als tot bezeichnet werden (Eiskristallbildung zerstört die Zellmembranen). Da die Proben bei -20°C gelagert wurden, konnte der Abbau der DNA durch DNAsen weitestgehend verhindert werden. Die Begriffe „lebende“ und „tote“ Foraminiferen sind daher in diesem Zusammenhang zu verstehen als „lebend (bzw. tot) zum Zeitpunkt der Probenahme“.

Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Foraminiferen im ungefärbten Zustand wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden Merkmale verwendet:

- 1) Gesamter Erhaltungszustand der Schale (lebend: Schale intakt; tot: Löcher in der Schale, Kammer zerbrochen)
- 2) Bewuchs (lebend: kein Bewuchs auf der Schalenoberfläche; tot: Bewuchs auf der Schalenoberfläche)
- 3) Verwitterungszustand der Schale (lebend: glatte Schalenoberfläche, Schale durchscheinend/ hyalin; tot: raue Schalenoberfläche, weiße Schale)
- 4) Füllung der Kammern (lebend: ungleichmäßige Füllung der Kammern; oft nur letzte Kammer mit Material angefüllt oder letzte Kammer frei/hyalin; tot: gleichmäßige Füllung aller Kammern mit Sedimentmaterial)
- 5) Färbung der Füllung der Kammern (lebend: hyalin/rot/grün/braun; tot:schwarz)
- 6) Sedimentpfropf an der Öffnung (lebend: vorhanden; tot: nicht vorhanden)

Meist zeigten die untersuchten Individuen nicht alle der aufgeführten Merkmale; in den meisten Fällen zeigten die Foraminiferen, von welchen SSU rDNA-Sequenzen gewonnen werden konnten, nur eines oder einige dieser Merkmale.

### 2.3 DNA-Extraktion

In der vorliegenden Arbeit wurden kalkschalige Foraminiferen individuell genetisch charakterisiert werden. Dafür musste die DNA einzelner Foraminiferen extrahiert werden (Einzelzell-DNA-Extraktionen). Für die DNA-Extraktion aus agglutinierten sowie rotaliiden Foraminiferen wurde die DOC-Methode (Natrium-Deoxycholat Holzmann & Pawlowski (1996)) verwendet. Hierzu wurde eine einzige Foraminiferen-

## Material und Methoden

---

Zelle in ein 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, mit 40 µl DOC-Extraktionspuffer (Rezept s. Anhang C) versehen und mechanisch zerstört (DStroy S-15 Sticks, Biozym, Hessisch-Oldendorf, D). 5 µl der entstandenen Lösung wurden direkt ohne weitere Aufreinigung als template in die PCR eingesetzt.

Um die Gesamt-DNA in einer Sedimentprobe untersuchen zu können, wurden ferner DNA-Extraktionen von Sedimentproben durchgeführt. Die Gesamt-Sediment-Extraktionen erfolgten mit dem QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit und vergleichend mit dem UltraClean MegaPrep Soil DNA Kit der Firma Mobio Laboratories (Solana Beach, USA) sowie der DOC-Methode, der Phenol-Chloroform-Methode und der CTAB-Methode (Tabelle 5).

Die Extraktion der DNA ist der grundlegende Schritt für alle in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden. In dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von verschiedenen Methoden zur DNA-Gewinnung aus einzelnen Foraminiferen-Zellen angewendet. Die CTAB-, Phenol-Chloroform-, Guanidin- sowie DOC Extraktionen beruhen im Prinzip auf der Zerstörung des Protoplasten durch chemische Detergenzien bzw. organische Lösungsmittel. Allen oben erwähnten Methoden zur DNA-Extraktion ging eine mechanische Zerstörung der Zellen mit den DStroy Sticks (Biozym) voraus. Das DNA Plant Mini Kit der Firma QIAGEN sowie das MegaPrep Soil Kit der Firma MoBio kombinieren ebenfalls eine mechanische Zerstörung der Zellen mit einer DNA-Extraktion durch Verwendung von Detergenzien sowie einer anschließenden Aufreinigung der gewonnenen DNA über die Bindung der DNA an eine Kieselgel-Matrix analog der Aufreinigung mit dem High Pure Purification Kit der Firma Roche.

Im Prinzip haben die Kit-basierten Methoden zur DNA-Extraktion den Vorteil, dass sie sehr reine DNA liefern, da über die Säulen-Reinigung Protoplasten- oder Kalkschalen-Reste herausgefiltert werden und die PCR nicht stören können. Bei einer DNA-Extraktion, die lediglich auf der mechanischen Zerstörung der Schale sowie der chemischen Zerstörung des Protoplasten beruht, kann dies nicht gewährleistet werden.

Bei der Aufreinigung über die Kieselgel-Säulen in den Kits bleibt ein Teil der DNA von der Säulenmatrix gebunden, was insbesondere bei sehr geringen DNA-Mengen zu Problemen führen kann. Foraminiferen sind einzellige Organismen und es ist bisher nicht bekannt, wie viele Chromosomen sie besitzen und in wie vielen Kopien das Gen für die SSU rRNA auf dem nukleären Genom vorliegt. Eine DNA-Extraktion über eine Säule war wegen der hohen möglichen Verluste an DNA daher ungeeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die DOC-Extraktion mit vorangehender mechanischer Zerstörung der Schale verwendet.

Tabelle 5 : In der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommene Methoden zur DNA-Extraktion sowohl aus Einzelzellen (EZ) als auch aus Gesamtsediment-Proben (GS). Positives Amplifikationsergebnis nach der PCR (grün); negatives Amplifikationsergebnis nach der PCR (rot).

Methoden zur DNA-Extraktion	Bezeichnung der Ausfahrt				
	MD 122	So164	Skagerrak	ARK XVIII/1a	ARK XIX/4a
Guanidin (EZ)	X	X	X	X	
(Allogromidae)					
Phenol-Chloroform (GS)		X	X	X	
CTAB (GS)	X	X	X	X	
DOC (EZ)	X	X	X	X	X
DOC (GS)	X	X	X	X	
Dneasy Plant (EZ)		X		X	
Dneasy Plant (GS)	X	X	X	X	
MegaPrep Soil (GS)		X		X	X

### 2.4 Etablierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Amplifikation benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis & Faloona 1987) ist ein zyklischer Prozess, in welchem ein von zwei Oligonukleotiden (Primer) flankierter DNA-Abschnitt von einer hoch temperaturstabilen DNA-Polymerase enzymatisch vervielfältigt wird (Abb. 8).

Ein PCR-Zyklus kann in drei Schritte unterteilt werden: *Denaturierung*, *Annealing* und *Elongation*.

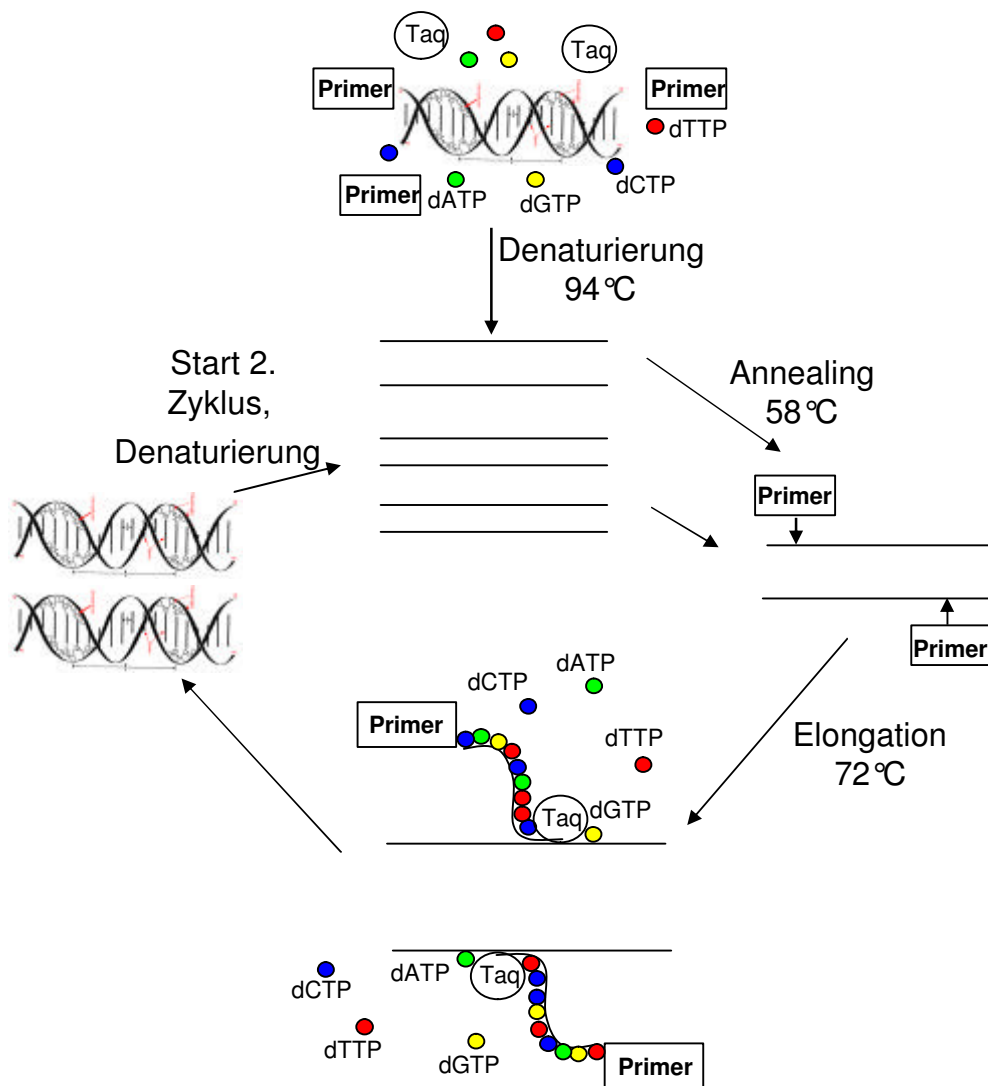


Abb. 8: Schematischer Verlauf der Polymerase-Kettenreaktion. dGTP: desoxy-Guanidin-Triphosphat, dATP: desoxy-Adenin-Triphosphat, dTTP: desoxy-Thymin-Triphosphat, dCTP: desoxy-Cytosin-Triphosphat, *Taq*: Taq-Polymerase

Für die PCR mit einzelnen Foraminiferen-Zellen wurden die Reaktionsbedingungen mehrfach modifiziert (Tabelle 6), da im Extremfall von lediglich einem Target-Molekül, das heißt einem Gen für die RNA der kleinen Untereinheit der Ribosomen (SSU rDNA, Abb. 3, Seite 8) ausgegangen werden musste.

Tabelle 6 : Modifikationen zur Etablierung der PCR. rot: negative Amplifikations-  
ergebnisse; grün: positive Amplifikationsergebnisse

Modifikationen der PCR	Bezeichnung der Ausfahrt				
	MD 122	SO164	Skagerrak	ARK XVIII/1a	ARK XIX/4a
Annealing –Temperatur	X	X	X	X	
Template-Konzentration	X	X	X	X	X
Primer-Konzentration	X	X	X		X
Reamplifikation	X	X	X	X	X
Elution aus Agarose-Gel und Reamplifikation				X	
Multiplex-PCR			X		X
anderes Molekül amplifiziert (ITS, LSU)				X	
neues Primer-Design		X	X	X	
Polymerase-Systems	X	X	X		
Salzkonzentration (MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> )		X		X	
Gradienten-PCR			X	X	
Single-cell-PCR vs. Gesamt-Sediment-Extraktion	X	X	X	X	X
Reaktionspuffer/selbst angesetzter Reaktionspuffer			X		
Bengal-Rot + Ethanol-Färbung	X				
Bengal-Rot + H <sub>2</sub> O -Färbung			X		
Polymerase-Konzentration	X	X			
TouchDown-PCR					
Primer-Kombinationen	X	X	X	X	X
Zyklenanzahl	X	X	X	X	X

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Reaktion, bei welcher die Konzentration der einzelnen Komponenten genau aufeinander abgestimmt sein muss, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen. So war es notwendig, die Zusammensetzung dieser Komponenten während der vorliegenden Arbeit mehrfach zu modifizieren, um ein optimales Amplifikationsergebnis für benthische Foraminiferen zu erreichen. Bei den Proben von ARK XIX/4a wurde in zwei hintereinander geschalteten Amplifikationen (nested PCR) jeweils 1.5 µl sense/antisense - Primer (10 pmol/ µl) verwendet. Die Konzentration der Salze in der ersten Amplifikation wurde durch Erhöhung der MgSO<sub>4</sub>-Konzentration modifiziert (pro Ansatz 0.5 µl MgSO<sub>4</sub> (100 mM, New England Biolabs)). Bei der zweiten Amplifikation mit den Ready-To-Go PCR Beads von Amersham Biosciences ist dieses Verhältnis vorgegeben; außerdem ist BSA (Bovines Serum Albumin) als PCR-Enhancer zugegeben. Der bei anderen Polymerase-Systemen

## Material und Methoden

---

mitgelieferte Reaktionspuffer enthält ebenfalls schon eine bestimmte Konzentration an Salzen ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ).

Bei der Amplifikation der Proben der Forschungsreise ARK XIX/4a wurde in der Voramplifikation ein nach Angaben des Polymerase-Herstellers (New England Biolabs) selbst angesetzter Puffer (Rezept im Anhang C) verwendet, da dieser im Vergleich deutlich bessere Amplifikations-Signale zeigte als der kommerzielle Puffer (Kapitel 3.3). Unterschiedliche DNA-Polymerasen zeichnen sich durch ein unterschiedlich prozessives Verhalten aus. Neben *Taq*-Polymerasen (isoliert aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) gibt es auch Polymerasen mit einem Reparaturmechanismus, der so genannten *proofreading*-Funktion, welche am 3'-Ende des Primers falsch eingebaute Nucleotide korrigiert. Die *Taq*-Polymerase verfügt nicht über einen solchen Reparaturmechanismus, das heißt ein „falsches“ Nucleotid wird im Komplementärstrang nicht korrigiert. Die Fehler-Raten der *Taq*-Polymerase belaufen sich auf 1% pro 1kb, d.h., statistisch werden pro 1000 Basen von der *Taq*-Polymerase 10 falsche Basen eingebaut. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Amplifikation von DNA aus einzelnen Foraminiferen-Zellen eine Kombination zweier verschiedener Polymerase-Systeme verwendet, die in einer nested PCR hintereinander geschaltet wurden. Die erste PCR, im Folgenden als Voramplifikation bezeichnet, wurde mit einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  und mit dem New England Biolabs *exo<sup>-</sup>* Vent DNA Polymerase System (Polymerase-Konzentration: 2.5 u) durchgeführt. Bei dieser Polymerase handelt es sich um eine *proofreading*-Polymerase. Herstellerangaben zufolge sind die Fehler-Raten dieser Polymerase verglichen mit einer herkömmlichen *Taq*-Polymerase um die Hälfte niedriger. Die Konzentration der dNTPs (*Desoxy-Nucleosid-Tri-Phosphate*, Roche Mannheim, D) in der Vorläufer-PCR betrug 10 mM. Nach der Voramplifikation erfolgte eine Aufreinigung mit dem High Pure PCR Purification Kit (Roche, Mannheim, Kapitel 2.7). Die zweite Amplifikation, im Folgenden als nested PCR bezeichnet, erfolgte mit den Amersham Pharmacia Biotech puRE Taq Ready-To-Go PCR Beads (Polymerase-Konzentration fix: 2.5 u). Bei diesem System werden die Polymerase, die dNTPs, der Reaktionspuffer und einige PCR-Enhancer (z.B. BSA,  $\text{MgCl}_2$ ) bereits fertig vorgemischt geliefert. Es werden lediglich das DNA-template sowie die Primer hinzu gegeben und mit DNA-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

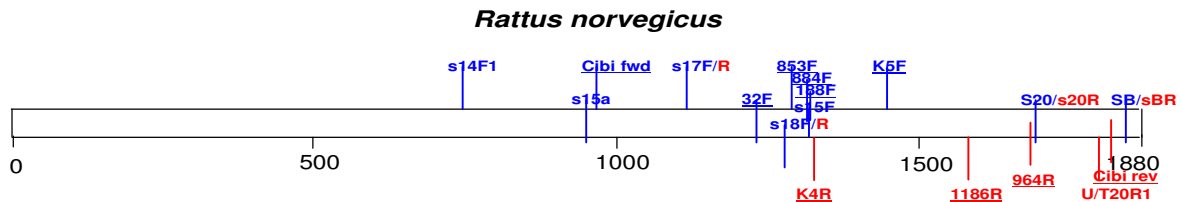
### 2.5 Primer-Design für die PCR und die Sequenzierung

Die in der Literatur beschriebenen Primer s14F1, s14F3 sowie sB (Protozoa-spezifisch) wurden eingesetzt, um DNA von Vertretern der *Allogromiida*, *Lituolida* oder *Textulariida* zu amplifizieren (Meisterfeld et al. 2001; Pawlowski et al. 2002). Eine Ausnahme bilden hier die Arbeiten von Pawlowski et al. (1995) und Holzmann et al. (1996 - 2001), welche die Phylogenie der rotaliiden Art *Ammonia* sp. behandeln.



Versuche zur Amplifikation von *Planulina wuellerstorfi* mit diesen Primern waren jedoch nicht erfolgreich. Daher war es notwendig, sowohl für die Amplifikation als auch für die Sequenzierung neue Primer zu entwickeln. Die Positionen der Primer auf der SSU rDNA aus der Literatur sowie der während dieser Arbeit entwickelten Primer für die SSU rDNA sind in Abb. 9 dargestellt.

a)



b)

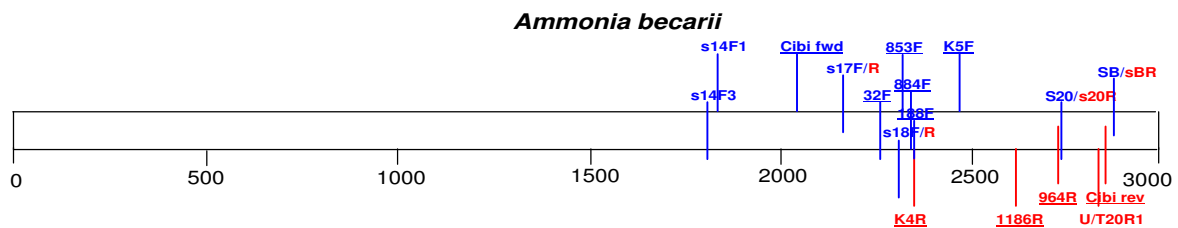


Abb. 9: a) SSU rDNA von *Rattus norvegicus* und b) von *Ammonia becarii* mit Primern aus Literaturangaben (Pawlowski et al., 1994, 1996, Sogin, 1990) sowie während dieser Arbeit entwickelten Primern; die während der vorliegenden Arbeit entwickelten Primer sind unterstrichen dargestellt. Blau: sense-Primer; Rot: antisense-Primer

Für die Entwicklung von Primern dienen bekannte Sequenzen der untersuchten Spezies oder phylogenetisch nahe stehender Spezies als Grundlage für ein Alignment. Solche Sequenzen können mithilfe entsprechender Datenbanken (EMBL, NCBI) über das Internet erhalten werden. Im Alignment können konservierte und variable Bereiche unterschieden werden. Es ist notwendig, dass ein Primer in einem konservierten Abschnitt des zu untersuchenden Gens liegt, da ansonsten dieser Primer nur exakt die Sequenz der dem Primer-Design zugrunde liegenden Spezies amplifiziert. (Abb. 10). Phylogenetisch verwandte Sequenzen können an verschiedenen Positionen im Primer-Bindungsbereich unterschiedliche Basen aufweisen. Daher kann es bei der Entwicklung eines Primers nötig sein, eine multiple Basencodierung (*wobbles*) in die Primer-Sequenz zu integrieren. Um alle möglichen Basen an einer Position zu berücksichtigen, erfolgt beim Primer-Design eine Codierung dieser Position nach dem *Nucleotide Ambiguity Code* (Anhang D, Cornish-Bowden (1985)), welche den Einbau aller an dieser Position möglichen Basen zulässt (Abb. 10). Es erfolgt dann eine Synthese mehrerer Primer mit an dieser Position unterschiedlichen Basen zu gleichen Anteilen.

## Material und Methoden

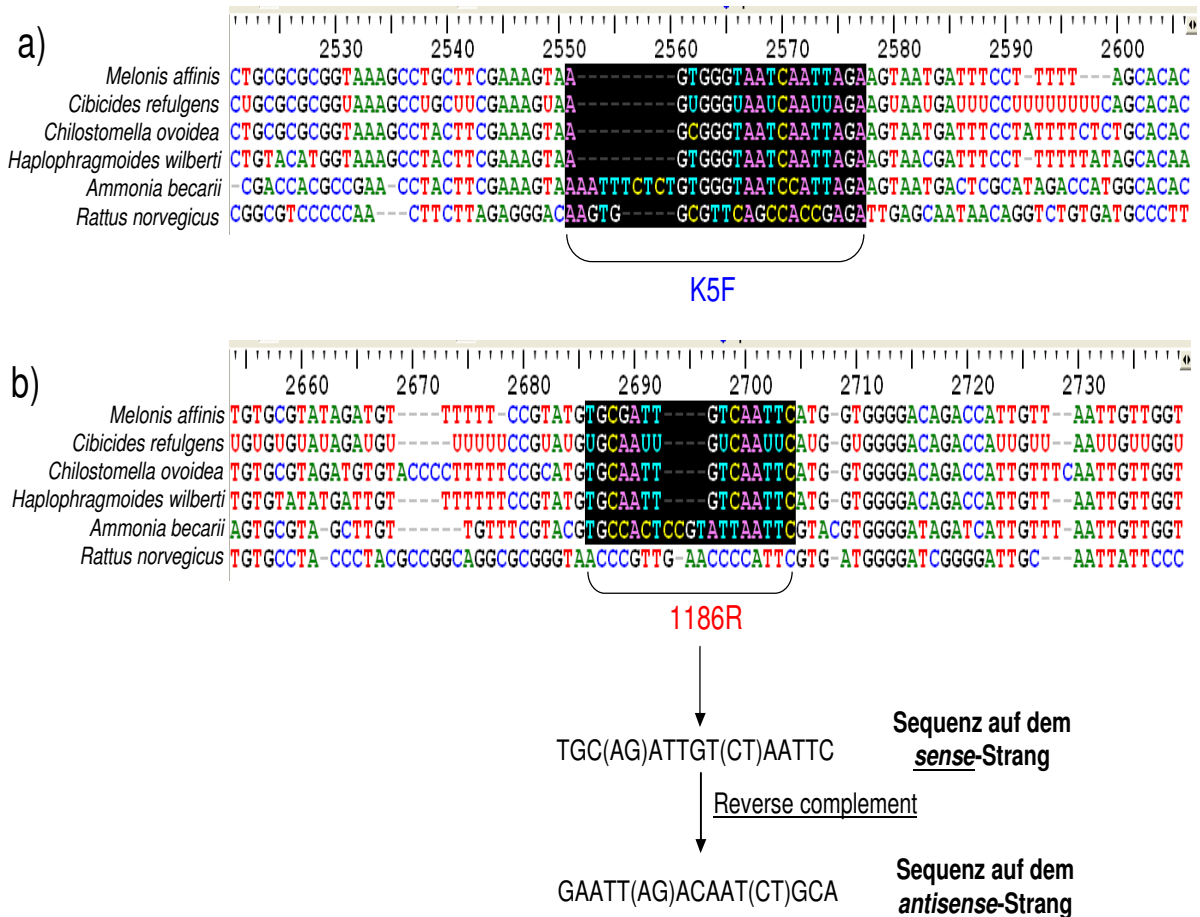


Abb. 10: a) Design eines sense-Primers, hier am Beispiel K5F (schwarz markierter Bereich). b) Design eines antisense-Primers, z.B. 1186R (schwarz markierter Bereich). Von der Sequenz auf dem sense-Strang wird zunächst das Komplement gebildet, anschließend wird die Komplementär-Sequenz 5'→3'-invertiert, damit der neu entwickelte Primer auf dem antisense-Strang binden kann. *wobbles*: in Klammern stehende Basen.

Bei der Herstellung von Primern ist es wichtig, sowohl die thermodynamischen Eigenschaften der potentiellen Primer zu kennen als auch mögliche Sekundärstrukturen zu analysieren. Je reicher ein Primer an Guanin- und Cytosin-Basen ist, desto höher wird die Schmelztemperatur (aufgrund der Dreifach-Bindung zwischen G und C) dieses Primers liegen und desto höher muss letztlich in der PCR die Annealing-Temperatur gewählt werden. Die Annealing-Temperatur bei der PCR sollte ca. 5°C höher als die Schmelztemperatur der Primer liegen, und es ist vorteilhaft, in der PCR zwei Primer mit ähnlicher Schmelztemperatur einzusetzen, um während des Annealings eine Bindung beider Primer an die target-DNA zu gewährleisten. Modernere Berechnungsmethoden zur Schmelztemperatur von Primern beziehen thermodynamische Relationen zwischen Enthalpie, Entropie, freier Energie und Temperatur mit in die Berechnung ein. Sekundärstrukturen eines Primers verhindern beim Annealing in der PCR eine Bindung an die target-DNA. Diese Sekundärstrukturen (self-annealing, loop-Bildung) sind bei einem Primer generell unerwünscht und können durch bestimmte Software-Programme (z.B. Oligo

Calculator) berechnet werden. Ein anschließender Vergleich der Primer-Sequenz mit internationalen Datenbanken liefert erste Anhaltspunkte zur Spezifität des neu entwickelten Primers.

Die während der vorliegenden Arbeit entwickelten Primer wurden nach dem vorangehend beschriebenen Prinzip entwickelt. Die Primer Cibi fwd und Cibi rev wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Topac Ertan (AG Prof. Hemleben, Tübingen) auf der Basis eines umfassenden Alignments der Rotaliida (*Chilostomella*, *Uvigerina*, *Bolivina*) unter Einbeziehung der bis dahin einzigen in internationalen Datenbanken deponierten Sequenz der *Cibicides/Cibicidoides*-Gruppe (*Cibicides refulgens*, CRE514839) entwickelt (Tabelle 7).

Die Primer Foram-K4R, Foram-K5F, 853F-Rotaliidae, 884F-Rotaliidae und 1186R-Rotaliidae wurden ausschließlich für die Sequenzierung entwickelt (Kapitel 2.9). Die während der vorliegenden Arbeit entwickelten Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg, D) synthetisiert.

Tabelle 7 : Entwickelte Primer, deren Position auf der SSU rDNA von *Ammonia beccarii* und deren Anwendungsbereich

Primer-Bezeichnung	Lese-richtung	Sequenz	Position in SSU von <i>Ammonia beccarii</i> (X86094)	Anwendung	Gen	Referenz
Foram-K4R	antisense	tgt gca gcc cgg aac atc t	2351-2333	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
Foram-K5F	sense	agt ggg taa tca att aga	2467-2499	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
853F-Rotaliidae	sense	aca ggt ctg tga tgc cct	2314-2331	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
884F-Rotaliidae	sense	ggg ctg cac acg tgc tac aa	2342-2361	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
1186R-Rotaliidae	antisense	gaa tt(ag) aca at(ct) gca	2610-2592	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
Eukarya 32 F	sense	gct taa ttt gac tca ac(ag) cgg	2257-2277	PCR	SSU	diese Arbeit
Eukarya 188F	sense	ggg gca tgg cgg ttc tta g	2350-2368	PCR	SSU	diese Arbeit
Cibi-fwd	sense	tgt ctg ctt aat tgc gtt tca cta	2037-2060	PCR	SSU	In Kooperation mit Dr. Topac Ertan, Tübingen, diese Arbeit
Cibi-rev	antisense	atg cct tgt tac gac ttc tct ttc	2850-2827	PCR Sequenzierung	SSU	2 bp kürzer als U/T20r1. In Kooperation mit Dr. Topac Ertan, Tübingen, diese Arbeit

### 2.6 Überprüfung der PCR durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Ergebnisse der PCR wurden mittels Agarose-Gelen überprüft. In der vorliegenden Arbeit wurden 1.5%ige Agarose-Gele (Biozym Spezialagarose für die Elektrophorese von Nukleinsäuren > 500 bp, Biozym, Hess. Oldendorf, D) in 1x TBE-Puffer (Rezept im Anhang C) verwendet. Die Agarose wird zunächst erhitzt und bildet dann beim Erkalten ein molekulares Sieb aus. Als Laufpuffer für die Agarose-Gele wurde ebenfalls 1x TBE-Puffer verwendet. DNA-Fragmente wandern bei einem angelegten Strom entsprechend ihres Molekulargewichtes sowie ihrer negativen Ladung durch dieses Sieb zur Anode. Je größer das DNA-Fragment ist, desto langsamer ist die Geschwindigkeit, mit welcher das Fragment durch das Gel wandert. Ein molekularer Marker mit DNA-Fragmenten bekannter Größe (in der vorliegenden Arbeit DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics, Mannheim, D, Rezept der Arbeitslösung im Anhang C) dient zur Identifizierung der verschiedenen PCR-Produkte. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (Ethidium-Bromid von Merck, Darmstadt) gefärbt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, welcher in die DNA interkaliert und diese unter UV-Beleuchtung orange anfärbt. Nach kurzer Entfärbung in Aq.dest. wurde das Gel auf einem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet und das Ergebnis mit dem Kodak 1D Image Analysis-System (Kodak, Stuttgart, D) dokumentiert.

### 2.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Eine Aufreinigung der PCR-Produkte ist notwendig, da Verunreinigungen (z.B. nicht eingebaute dNTPs oder Primer) nachfolgende Arbeitsschritte beeinträchtigen können.

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem High Pure PCR Purification Kit der Firma Roche (Mannheim, D) entsprechend den Herstellerangaben. Bei der Aufreinigung von PCR-Produkten über Silikatsäulen erfolgt zunächst eine Bindung der amplifizierten DNA an die Säule. Nach zwei Reinigungsschritten, welche mit einem Waschpuffer erfolgen, wird die DNA von der Säule in Tris-HCl (10 mM, pH 8.5) eluiert. Bei den Waschvorgängen werden bei der PCR nicht eingebaute Desoxynucleotide sowie Salze aus der Säule heraus gewaschen, während die DNA bis zur Elution an die Säule gebunden bleibt. Vor dem finalen Zentrifugationsschritt wurde die Säule mit dem Elutionspuffer 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, um eine quantitative Elution der DNA von der Säule zu gewährleisten.

### 2.8 Klonierungsexperimente

Klonierungsexperimente dienen der Trennung von DNA-Fragmenten verschiedener Sequenz.

Die Klonierungsexperimente wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) durchgeführt. Für die Ligation des PCR-Produktes wurde der Vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO verwendet und in die Transformation in TOP10-kompetente *Escherichia coli*-Zellen durchgeführt. An die multiple cloning site des Vektors ist das Enzym Topoisomerase kovalent gebunden, welches eine Ligation des Vektors mit sich selbst verhindert. Da die bei der PCR meist verwendete *Taq*-Polymerase durch eine template-unabhängige terminale Transferase-Aktivität meist ein Adenin an das PCR-Produkt anhängt, ist der Vektor an der multiple cloning site mit einem zusätzlichen Thymin ausgestattet, was die Ligation des DNA-Fragments in den Vektor erleichtert.

Bei der Ligation erfolgt die Abspaltung der Topoisomerase und das DNA-Fragment kann in die multiple cloning site des Vektors eingebaut werden. Die multiple cloning site des Vektors liegt innerhalb des Gens für einen Inhibitor der bakteriellen DNA-Gyrase (*LacZa-ccdB*), welches bei einer Expressierung letal wirkt. Falls eine Selbstligation des Vektors erfolgt, nachdem die Topoisomerase abgespalten und bevor das zu klonierende DNA-Fragment eingebaut wurde, wird dieses Gen exprimiert und ein Bakterium, welches einen so beschaffenen Vektor aufnimmt, ist nicht lebensfähig. Wird jedoch ein DNA-Fragment in die multiple cloning site eingebaut, so ist die Sequenz des Inhibitor-Gens unterbrochen und es kann kein funktionsfähiger Gyrase-Inhibitor ausgebildet werden. Das Bakterium, welches beim Vorgang der Transformation den Vektor aufgenommen hat, ist lebensfähig und kann Kolonien ausbilden. Bei dem verwendeten Vektor handelt es sich um einen so genannten *multicopy*-Vektor; er liegt in der Zelle in mehreren Kopien vor. Der Vektor verfügt noch über eine weitere selektive Funktion. Er enthält die Gene für die Ausbildung der Resistenz gegen die Antibiotika Kanamycin und Ampicillin. Bei der Ausplattierung der transformierten Zellen wird mit einem Medium gearbeitet, welches eines dieser beiden Antibiotika enthält; in der vorliegenden Arbeit wurde Luria-Bertani-Medium (Rezept im Anhang C) mit 50 µg/ml Kanamycin verwendet. Zellen, die den Vektor nicht aufgenommen haben, sind nicht resistent gegen Kanamycin oder Ampicillin und können somit nicht auf dem Medium wachsen. So ist gewährleistet, dass alle auf dem Medium wachsenden Zellen und der sich daraus bildenden Kolonien das in den Vektor eingebaute DNA-Fragment enthalten. Mit einer PCR, bei der Primer verwendet werden, deren Bindungsstellen auf dem Vektor nahe der multiple cloning site liegen (z.B. M13), kann die Länge des klonierten Fragments bestimmt werden. Nach einem Abgleich mit der Länge des in die Klonierung eingesetzten DNA-Fragments können

## Material und Methoden

die positiven PCR-Produkte der richtigen Länge nach einer Aufreinigung direkt in die Sequenzierung eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Klonierung entsprechend den Herstellerangaben. Es wurden zwei LB-Agar-Platten pro Ansatz mit transformierten Zellen beimpft, davon eine mit 50 µl einer Mischung aus Zellen und Medium und die andere mit 200 µl. Daraufhin wurden die beimpften Platten für 24h bei 37°C inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien wurden selektiert und die korrekte Länge des Inserts durch eine PCR mit M13F als sense- und M13R (Sequenz siehe Anhang E) als antisense-Primer überprüft Tabelle 8.

Tabelle 8 : In der vorliegenden Arbeit eingesetztes PCR-Programm für die Überprüfung des Klonierungserfolges.

Amplifikation	Primer sense/antisense	Zyklen Anzahl	Annealing		Elongation		Denaturierung	
			T [°C]	Zeit [sec]	T [°C]	Zeit [sec]	T [°C]	Zeit [sec]
Sequenzierungs reaktion	M13F	1					94	120
	M13R	25	55	40	72	50	94	30
		1	42	60	72	300		

Die Inserts mit korrekter Fragment-Länge wurden mit dem High-Pure-PCR Purification Kit (Roche, Mannheim, 2.7) aufgereingt und in die Sequenzierung eingesetzt.

### 2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Prinzip der Kettenabbruchreaktion. Die Reaktion erfolgte in Form eines „cycle sequencing“. Zu der zu sequenzierenden DNA werden Desoxynucleotide (dNTPs) sowie in einem (vom Hersteller der Sequenzierungs-Chemikalien) definierten Verhältnis zu den Desoxynucleotiden basenspezifisch fluoreszenzmarkierte *di*-Desoxynucleotide (ddNTPs) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde durch die Zugabe einer Polymerase und eines Primers sowie eines Reaktionspuffers komplettiert. Das cycle sequencing verläuft analog zu einer PCR mit nur einem Primer. Wird bei der Elongation statt eines dNTPs ein ddNTP eingebaut, bricht die Ketten-Verlängerung der Polymerase ab. Da die ddNTPs in einem definierten Verhältnis zu den dNTPs stehen, ergeben sich statistisch Fragmente verschiedener Länge (Abb. 11). Die terminalen fluoreszenzmarkierten ddNTPs können dann nach einer Trennung durch eine Polyacrylamid-Matrix von einem Laser detektiert werden. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Perkin Elmer ABI 310 Genetic Analyzer. Auch die Sequenzierung wurde für die Anwendung auf die SSU rDNA benthischer Tiefsee-Foraminiferen mehrfach modifiziert (Tabelle 9).

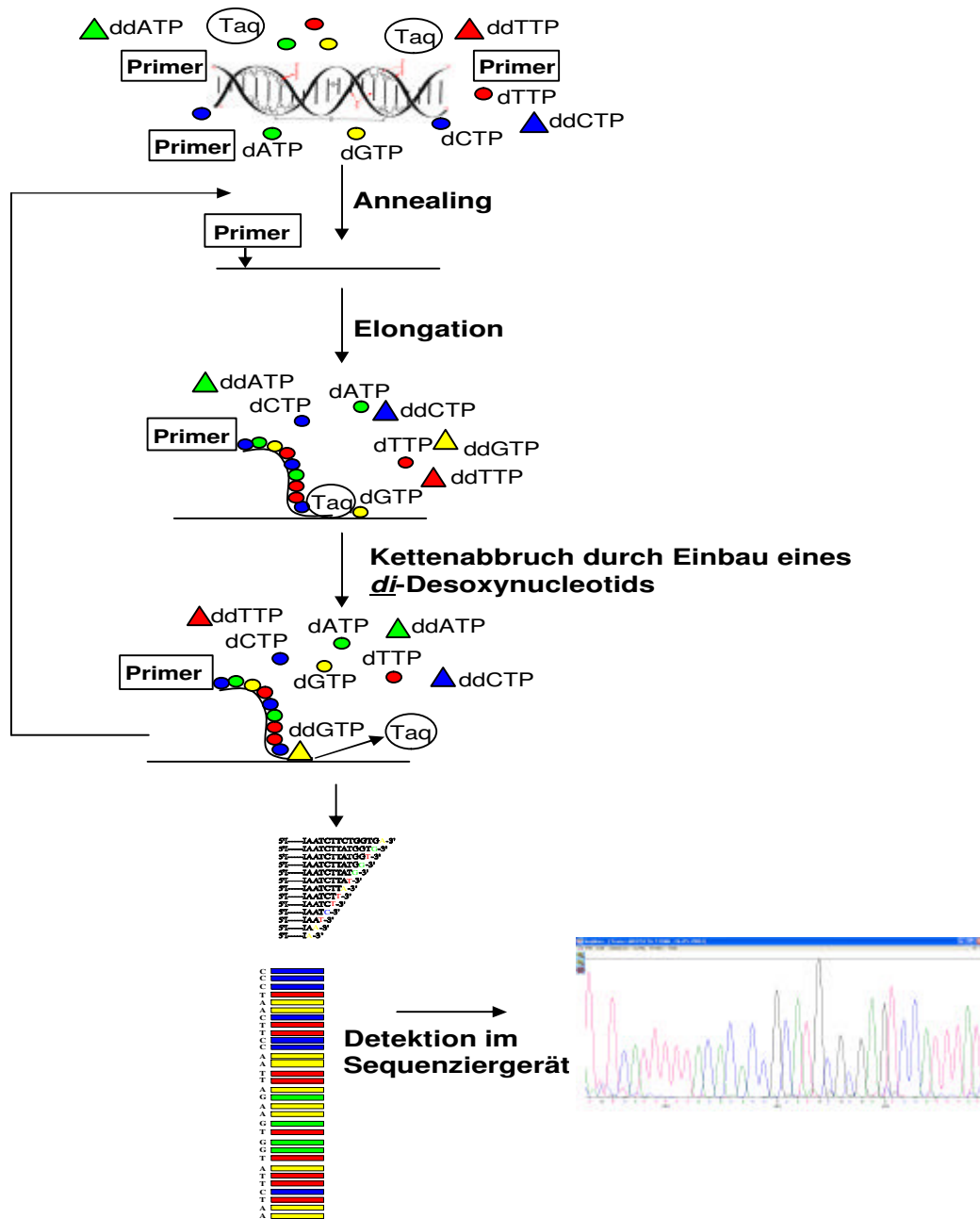


Abb. 11: Schematischer Ablauf einer Sequenzierungsreaktion (cycle sequencing)

Tabelle 9 : Modifikationen der Sequenzierungsreaktion (cycle sequencing). Rot: Sequenzierung nach der Modifikation nicht erfolgreich; grün: Sequenzierung nach der Modifikation erfolgreich

Modifikation der Sequenzierung	Bezeichnung der Ausfahrt	
	SO164	ARK XIX/4a
Template-Konzentration	X	X
Primer-Konzentration	X	X
Polymerase-Konzentration	X	X
neues Primer-Design	X	X

## Material und Methoden

Die Sequenzierungsreaktion ist ebenso wie die PCR stark von den Konzentrationen der beteiligten Komponenten abhängig. Daher wurde sowohl die Polymerase-Konzentration, die Primer-Konzentration als auch die eingesetzte DNA-template-Konzentration mehrfach modifiziert.

Für die Proben der Reise ARK XIX/4a wurde die Sequenzierung mit 1.5 µl Primer (3.2 pmol/µl) und 2 µl DNA-template durchgeführt. Die bereits mit dNTPs sowie ddNTPs versehene Sequenzier-Polymerase (ABI Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde zunächst mit 2.5fachem Sequenzierpuffer 1:1 (Rezept im Anhang C) verdünnt. Im Folgenden wurde dieser Reaktionsansatz nochmals 1:5 mit DNA-freiem Wasser (Fluka, Buchs, CH) verdünnt. Davon wurden 8 µl in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Zu dem Sequenzierungsansatz wurden 8.5 µl DNA-freies Wasser hinzu gegeben, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erhalten.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Programm für das Cycle Sequencing ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 : Übersicht über das zur Sequenzierung (cycle Sequencing) verwendete Programm

Amplifikation	Primer sense/ antisense	Zyklen Anzahl	Annealing		Elongation		Denaturierung	
			T [°C]	Zeit [sec]	T [°C]	Zeit [sec]	T [°C]	Zeit [sec]
Sequenzierungs- reaktion	Cibi fwd	1					94	120
	Cibi rev							
	1186R	99	50	15	60	240	96	30
	K4R							
	K5F							

Um die Zahl der Einzelsequenzierungen für eine Gesamtsequenz des SSU rDNA-Fragmentes zu minimieren, wurden weitere Primer entwickelt (Kapitel 2.5). Die aus der Literatur bekannten Primer zeigten entweder keinen Erfolg in der Sequenzierung oder es waren bis zu acht verschiedene Primer nötig, um ein amplifiziertes DNA-Fragment in seiner gesamten Länge zu sequenzieren, da die mit diesen Primern sequenzierten DNA-Fragmente nur sehr kurze Leseweiten aufwiesen. Mit den entwickelten Primern konnte die Anzahl der benötigten Primer von acht auf fünf reduziert werden, um ein 1000 nt langes Fragment zu sequenzieren, (Cibi fwd, K4R, K5F, 1186R, Cibi rev).



### 2.10 Ethanol-Fällung

Vor der Sequenz-Detektion muss eine erneute Aufreinigung der zu sequenzierenden Proben erfolgen. Auch das cycle sequencing ist eine gepufferte Reaktion mit hohen Salzkonzentrationen, bei der sowohl di-Desoxynucleotide als auch Desoxynucleotide im Überschuss zugegeben werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Aufreinigung der cycle sequencing-Reaktionen durch eine Ethanol-Fällung. Ethanol fällt die DNA und durch Zentrifugation kann diese DNA pelletiert werden, während überschüssige Nucleotide sowie Salze in der flüssigen Phase verbleiben und durch Verwerfen des Überstandes entfernt werden können. Die Fällung erfolgte mit 64% Ethanol p.A. (Merck, Darmstadt, D.). Hierzu wurden 80 µl 80% Ethanol<sub>abs</sub> zu 20 µl Reaktionsvolumen aus dem cycle sequencing gegeben, um einen möglichst hohen Anteil der amplifizierten DNA zu erhalten und zu pelletieren. Die Reinigung erfolgte mit 70% Ethanol, um die evtl. nach der ersten Fällung noch vorliegenden Salze quantitativ aus der Reaktion zu entfernen. Im Folgenden wurden 30 µl Template Suppression Reagent (Applied Biosystems, Foster City, USA) sowie 10 µl DNA-freies Wasser zu jeder Reaktion hinzu gegeben, um die DNA bis zur Detektion der Sequenzen in einem gelösten, denaturierten Zustand zu erhalten.

### 2.11 Phylogenetische Analyse

Die Berechnung eines Stammbaumes ergibt immer nur ein theoretisches Muster eines evolutiven Zusammenhanges, basierend auf der Unvollkommenheit der zugrunde liegenden Daten (Swofford et al. 1996). Die Grundlage für phylogenetische Berechnungen liefert die Annahme von vererbbaaren Merkmalen sowie der Existenz einer auf diesen Merkmalen basierenden Evolutionsgeschichte. Wenn eine phylogenetische Berechnung auf der kompletten Evolutionsgeschichte aufgebaut werden könnte, müsste sie notwendigerweise die richtige Phylogenie liefern und wäre frei von systematischen Fehlern. Da dies jedoch nicht der Fall sein kann, müssen phylogenetische Schätzungen anhand von verschiedenen Methoden als Ersatz dienen, die natürlich nicht frei von systematischen Fehlern sein können (Swofford et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden die aus der Sequenzierung erhaltenen DNA-Sequenzen einer ausführlichen phylogenetischen Analyse unterzogen. Zunächst erfolgte die Editierung der Rohdaten mit Chromas v.1.45 (McCarthy 1996). Darauf folgte ein Abgleich der Sequenzen mit der Datenbank des European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Im Folgenden wurden Sequenzstücke, welche mit verschiedenen Primern sequenziert wurden, mit dem Programm Seqman (DNASTAR) zusammengesetzt und erneut editiert. Anschließend wurden Alignments mit Hilfe des Programms Clustal X Version 1.83 (Thompson et al. 1994) berechnet. Auf Grundlage

## Material und Methoden

---

dieser Alignments erfolgte die Kalkulation phylogenetischer Stammbäume mit verschiedenen Methoden (Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Distanzbasierte Methoden, Neighbour Joining).

### 2.11.1 Alignment-Berechnung

Die Berechnung des Alignments bildet die Grundlage für die phylogenetische Analyse. Alignment-Software (z.B. ClustalX, GDE, ARB) erkennt homologe Positionen verschiedener Sequenzen unabhängig von der Länge des sequenzierten Fragmentes und verrechnet die Sequenzen so miteinander, dass sich die homologen Positionen verschiedener Sequenzen entsprechen. Dies gilt für die SSU rDNA der Foraminiferen nur eingeschränkt. Die vier variablen Regionen innerhalb der 3'-terminalen Region dieses Gens sind charakterisiert durch lange, meist AT-reiche Insertionen. Außerdem besitzen die Foraminiferen drei Abschnitte innerhalb dieser Region des Gens, welche als Foraminiferen-spezifisch angesehen werden können (Ertan et al. 2004). Bei der Verrechnung dieser variablen und Foraminiferen-spezifischen Abschnitte haben die meisten Alignment-Programme Probleme, die homologen Basen bei verschiedenen Sequenzen zu detektieren. Die meisten Studien lösen dieses Problem, indem die Alignments entweder manuell korrigiert werden (Darling et al. 2000; Holzmann & Pawlowski 1997; Pawlowski et al. 1999; Pawlowski et al. 2002) oder nicht eindeutig alignbare Regionen aus der weitergehenden phylogenetischen Analyse ausgeschlossen werden (Darling et al. 2000; de Vargas et al. 1999). Dies führt zu einem Verlust an phylogenetischer Information. Gerade in den variablen bzw. Foraminiferen-spezifischen Regionen unterscheiden sich die Sequenzen verschiedener Arten stark voneinander. Dies kann als zentrale phylogenetische Information angesehen werden und gerade diese Bereiche werden von der weiteren phylogenetischen Analyse ausgeschlossen. Es gibt weiterhin die Möglichkeit eines manuellen Alignments. Das manuelle Alignment muss allerdings als nachrangig gegenüber automatisierten Alignments angesehen werden, da beim manuellen Alignment ohne objektive Vorgaben wie *gap penalties* („Strafpunkte“ für das Einfügen einer Lücke (*gap opening penalty*) oder die Erweiterung einer bereits vorhandenen Lücke im Alignment (*gap extension penalty*)) vorgegangen wird. Je höher *gap opening* und *gap extension penalties* gewählt werden, desto weniger Lücken werden vom Programm in das Alignment eingefügt (bzw. bereits vorhandene erweitert) und als desto stringenter kann das daraus resultierende Alignment angesehen werden. Die default-Werte dieser Parameter sind im Programm ClustalX 10.00 für *gap opening* sowie 0.20 für *gap extension*. In der vorliegenden Arbeit wurden default-Werte für *gap-opening penalties* sowie *gap extension penalties* gewählt.

Es ist also von Bedeutung, eine Methodik zu finden, mit welcher die variablen Regionen durch eine objektive Analyse-Methode mit in die phylogenetische Analyse

einbezogen werden können. Ertan et al. (2004) haben mit einer Analyse der Sekundärstrukturen der variablen Regionen erstmals solch einen Ansatz verfolgt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wurde in der vorliegenden Arbeit verfahren, um die phylogenetische Einordnung der erhaltenen Sequenzen besonders von *Planulina wuellerstorfi* innerhalb der Rotaliida aufzuklären.

### 2.11.2 Berechnung von Sekundärstrukturen

Das Gen, welches für die RNA der kleinen Untereinheit der Ribosomen codiert, verfügt über sehr konservierte sowie über variable Regionen. Für eine phylogenetische Analyse eines Spezies-Komplexes wie der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe ist es unabdingbar, die variablen Regionen in die phylogenetische Analyse mit einzubeziehen. Die variablen Bereiche in der SSU rDNA der Foraminiferen sind artspezifisch und reich an AT-Insertionen (Abb. 12).

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	191		
ALA311218 <i>Allogromia laticollaris</i>	GATCGACAGG	TTTTTA	TAAGACTATGTATA	TTTTTTTTTAAAAATTAT					ATATAGCAATTCCTATATCAAAATATGCT				
AJ312434 <i>Ammotium pseudocassis</i>	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AA AAUGCUUUU	CUUCGG	UGC			AAGA GAACAUUU	AU GUCAAAUAUGCU				
AJ312436 <i>Haplophragmoides wilberti</i>	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AAU UAUAUAUAUUUUUUUAUCUUUCGG					GAAUAAAU UAUAUAUAUUUUUAUAU	GUUAAAUAUGCU				
Z69610 <i>Textularia</i> sp.	GAUUGACAGGU	AUAU	UUAUAUG	CAUU	CGAUUAA	UCGUAU	UGU		CAUAUAUGUAAAUAUGCU				
Z69612 <i>Trochammina</i> sp.	GAUUGACAGGC	AAUA	UUGA AAU	UAUU	GCUAUUA	UGC		AAU AUUUC	AU GUUAAAUAUGCU				
G8P514840 <i>Globocassidulina</i> sp.	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AUAAUAU	UCUGU	AAUAUAUCG	UGU	GUUCAC	AGUU	AUAUAUGUAAAUAUGCU				
AY359139 <i>Bolivina variabilis</i>	GAUUGACAGGU	AACA		UCUCAUACUUCGCUU	CGG	CA	UGU	GU	GGG	UA	UAAAUAUGCU		
AF533838 <i>Bulimina aculeata</i>	GAUUGACAGCAAAUA			UGGA	AA	UUUU		AUA	UUU	CUC	AUA	UA	UAAAUAUGCU
AF533846 <i>Globobulimina pseudospinescens</i>	GAUUGACAGGC	AAUA	UUAAUAU	UUUAUUUU	CGCUUU		CAC	UGC	GA	UUUCAUAU	UUU	AUAU	GUUAAAUAUGCU
AY359180 <i>Uvigerina peregrina</i>	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AAUAUGUGACUUUUUU	GUCUUU	CACGAGU	GAGAAAG	CUUACGUAU	AUAU	GUUAAAUAUGCU				
AJ504684 <i>Planorbulina mediterraneensis</i>	GAUUGACAGGC	AAUAUCUGAGUU	AACA	UCU	CUGUA	UGU	UU	CUCA		GUUUAAAUAUGCU			
AJ504687 <i>Hyalinea baltica</i>	GAUUGACAGGC	AAUAUCAUAUUU	UAUA	GUUUAUUUA	CUU	CGG	UACUUA	UUUA	AU	AUAUGUAAAUAUGCU			
AF533850 <i>Rosalina orbicularis</i>	GAUUGACAGGC	GAUA	UC AACUC	UCUCUUUUUUUUUAUAUAUA	AAA	AGUAGAG		GU	GUUGU	GUUAAAUAUGCU			
AY210774 <i>Melonis affinis</i>	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AAUAC	GUGUUUU	AAC	CUU	CAC		GU	AUAU	GUUAAAUAUGCU		
AY359154 <i>Chilostomella ovoidea</i>	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AAUACACCAGUCU		CUUUU	GAC	UGU		GU	AUAU	GUUAAAUAUGCU		
CRE514839 <i>Cibicides refulgens</i>	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AAUA	UGU	GUUUCGG	CAC		GU	AUAU	GUUAAAUAUGCU			
Planulina wuellerstorfi P8698	GAUUGACAGGC	AAUA	UU AAUAC	UUUG	CUU	CGG	CAU	UGU		AUAU	GUUAAAUAUGCU		

Abb. 12: Variable Region F1 (Position 98 – 180) von Sequenzen ausgewählter Foraminiferen-Spezies. Die variable Region ist begrenzt von konservierten Bereichen, in welchen sich die Sequenzen morphologisch sehr verschiedener Arten kaum unterscheiden.

Aufgrund der Variabilität dieser Regionen ist es für Computerprogramme schwierig, homologe Sequenzpositionen innerhalb dieser Regionen zu detektieren und in ein Alignment einzurechnen. Diese Problematik machte es nötig, die Sekundärstrukturen der variablen Regionen F1, F2, V1, V3, F3, V4 der einzelnen Sequenzen zu berechnen. Die Sekundärstruktur gibt durch das Vorliegen der einzelnen Nucleotide in *stems* oder *loops* Auskunft über die homologen Basen verschiedener Sequenzen innerhalb der variablen Bereiche. Die Nomenklatur der variablen Bereiche erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach (Huber et al. 1997). Bei der Analyse der Sekundärstrukturen der variablen und Foraminiferen-spezifischen Regionen innerhalb der SSU rDNA werden mit Hilfe eines Faltungsalgorithmus (mfold; Mathews et al. (1997)) die Bereiche des DNA-Fragmentes so gefaltet, wie sie theoretisch nach thermodynamischen Grundsätzen im nativen Zustand vorliegen müssten. Die Grundlage zur Berechnung der Sekundärstrukturen von F1-F3 sowie V1-V4 lieferte die

## Material und Methoden

bekannte Sekundärstruktur der SSU rRNA von *Saccharomyces cerevisiae* V01335 (Abb. 13, (Rubtsov et al. 1980; van de Peer 2000)). Die Berechnungen der variablen Bereiche der 3'-terminalen Region der SSU rDNA von *Saccharomyces cerevisiae* (V01335) entsprachen dem in der European Ribosomal RNA Database publizierten Sekundärstruktur-Modell. Die Sekundärstrukturen von F1-F3 bzw. V1-V4 der SSU rDNA von Foraminiferen wurden mit identischen Parametern berechnet wie die entsprechenden Bereiche von *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 13).

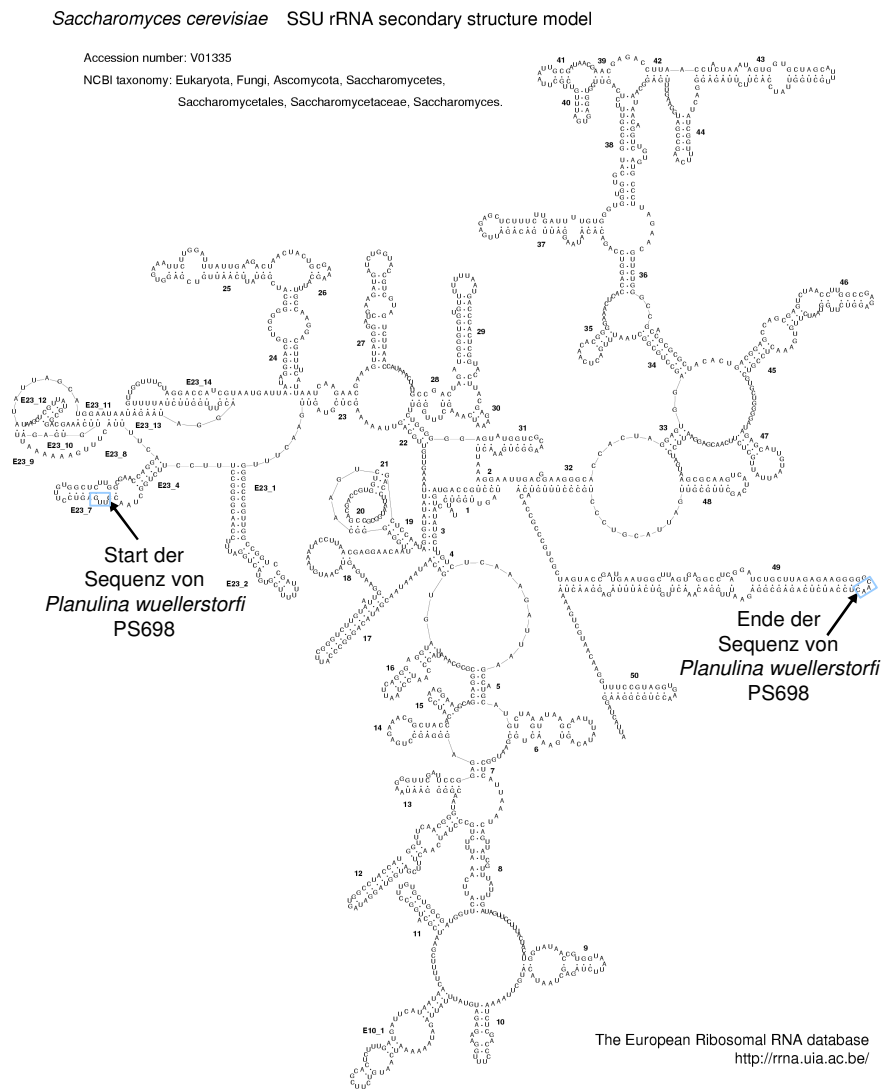


Abb. 13: Sekundärstrukturmodell der SSU rRNA von *Saccharomyces cerevisiae*. Quelle: The European Ribosomal RNA database (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/>). Mit Pfeilen sowie einer blauen Umrandung markiert sind der Beginn sowie das Ende des sequenzierten Fragmentes von *Planulina wuellerstorfi* PS 698.

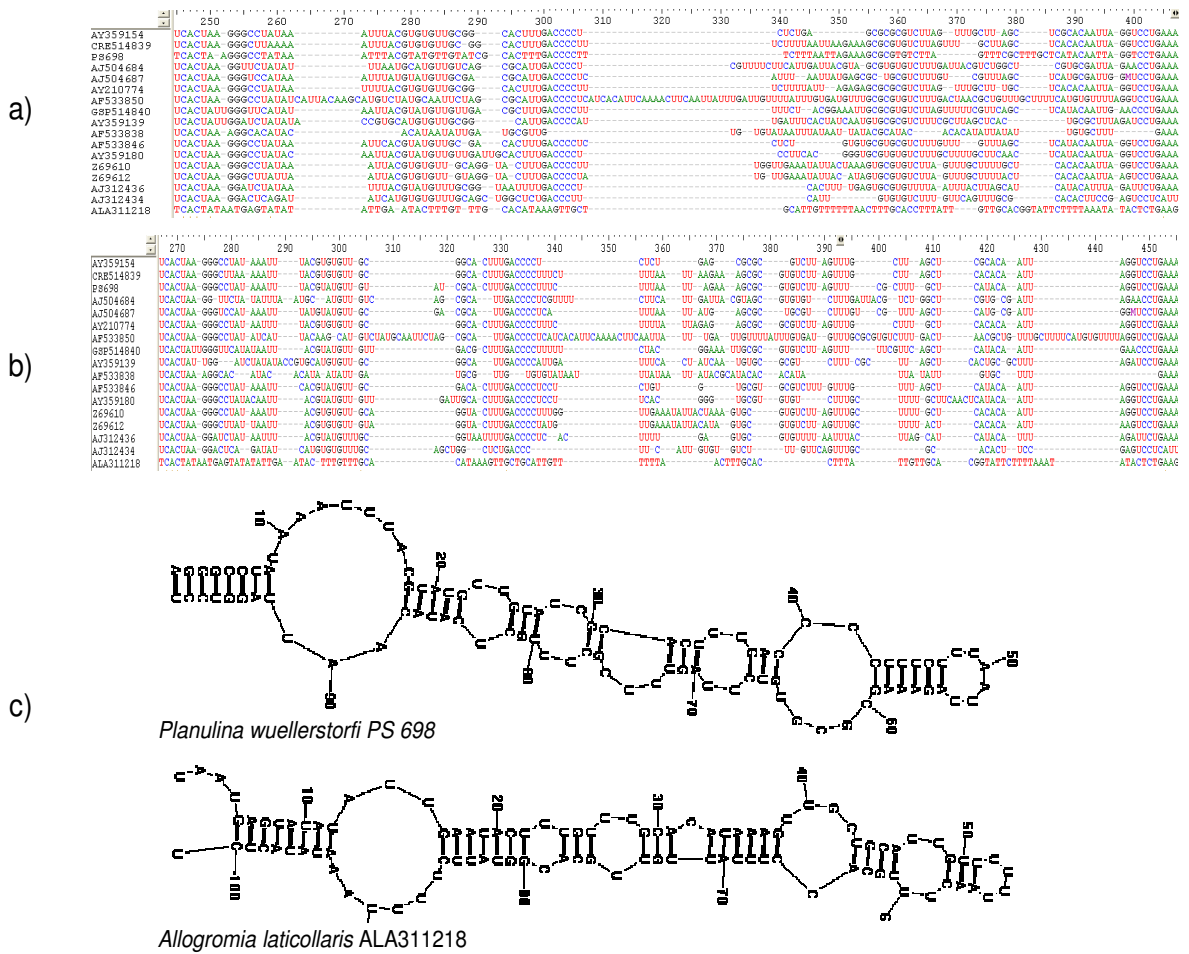


Abb. 14: a) Alignment der variablen Region F2 ohne Sekundärstruktur-Analyse; b) Alignment der variablen Region F2 Alignment nach Sekundärstruktur-Analyse; c) Sekundärstruktur der variablen Region F2 exemplarisch für *Planulina wuellerstorfi*, oben bzw. *Allogromia laticollaris* ALA311218, unten. Blaue Markierung: Region, welche für die Berechnung der Sekundärstruktur herangezogen wurde

Die Faltung bietet die Möglichkeit, homologe Basen verschiedener Sequenzen je nach ihrem Vorliegen in *stems* oder *loops* der Sekundärstrukturen zu identifizieren. So können die variablen Bereiche, welche in den meisten Studien aufgrund ihrer Variabilität nicht mit in die Alignments miteinbezogen wurden, im Alignment verrechnet werden. Die weiteren phylogenetischen Berechnungen erfolgen unter Einbeziehung dieser artspezifisch verschiedenen Regionen ohne den Verlust an phylogenetischer Information dieser Regionen.

Die Berechnungen der Sekundärstrukturen der variablen Bereiche müssen jedoch auch unter dem Aspekt betrachtet werden, dass hierbei nur von einem sequenzierten DNA-Fragment anhand eines mathematischen Algorithmus auf das Vorliegen der gefalteten RNA geschlossen wird. Auch dürfte streng genommen nur aus der vorliegenden Sequenz der RNA auf deren Sekundärstruktur geschlossen werden, jedoch nicht aufgrund der DNA-Sequenz (in der RNA ist Thymin durch Uracil ersetzt, welches

## Material und Methoden

---

andere thermodynamische Eigenschaften besitzt). Die Korrektur des Alignments der variablen Bereiche aufgrund der Sekundärstrukturanalyse wird manuell vorgenommen; hier ergeben sich also auf kleinen Bereichen die gleichen Probleme wie bei einem kompletten manuellen Alignment (keine gap penalties). Durch die Vorgaben der Sekundärstruktur-Berechnung (*stems* und *loops*) kann dieses Alignment jedoch nicht ausschließlich subjektiv erfolgen, sondern es wird hierdurch eine objektive Vorgabe gegeben.

Trotz dieser Einschränkungen ist die Verwendung der Sekundärstruktur-Analyse für das Alignment der variablen Bereiche der SSU rDNA der Foraminiferen einer kompletten Entfernung dieser Bereiche aus dem Alignment für die weitergehende phylogenetische Analyse vorzuziehen. So wird die genetische Information des kompletten sequenzierten Fragmentes mit in die phylogenetische Analyse einbezogen und nicht auf für die phylogenetische Positionierung insbesondere neuer Sequenzen wichtige variable Bereiche verzichtet.

### 2.11.3 Berechnung phylogenetischer Stammbäume

Phylogenetische Berechnungen von Stammbäumen basieren auf zwei grundsätzlich verschiedenen Methoden: Algorithmus- basierte Methoden und Merkmals-basierte Methoden.

Algorithmus-basierte Methoden kombinieren die Berechnung der Stammbäume mit einer Entscheidung für den besten Stammbaum. Diese Methoden haben den Vorteil der geringen Berechnungszeit, da ein ständiges Fortschreiten zum finalen Stammbaum auf dem gewählten Algorithmus basierend erfolgt. Distanzbasierte Methoden sind Algorithmus-basierte Abschätzungen der evolutiven Distanz. Die Stammbäume zeigen das Mittel der Anzahl der Änderungen eines Gen-Locus, welche basierend auf den zugrunde liegenden Sequenzen, seit der Trennung zweier Sequenzen vom letzten gemeinsamen Vorfahren aufgetreten sind. Zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden zur Algorithmus-basierten Berechnung aufgrund der evolutiven Distanz sind die Kimura-2-Parameter-Methode (Kimura 1980) und das Modell nach Jukes & Cantor (1969). Die Kimura-2-Parameter-Methode nimmt hierbei an, dass Transitionen (Austausch zweier Pyrimidin-Basen ( $C \rightarrow T/T \rightarrow C$ ) oder Purin-Basen ( $A \rightarrow G/G \rightarrow A$ )) wahrscheinlicher sind als Transversionen (Austausch einer Pyrimidin-Base durch eine Purin-Base ( $C/T \rightarrow A/G$ ) oder einer Purin-Base durch eine Pyrimidin-Base ( $A/G \rightarrow C/T$ )). Das Modell nach Jukes & Cantor (1969) nimmt an, dass ein Austausch aller vier Basen an einer Position mit der gleichen Wahrscheinlichkeit auftreten kann.

Die Verwendung Merkmal-basierter Methoden für die phylogenetische Analyse hingegen umfasst zwei Schritte. Zunächst wird ein objektives Merkmal definiert, um einen gegebenen Stammbaum zu bewerten. Dieses objektive Merkmal sind die Basenaustausche an einem Gen-Locus bei unterschiedlichen Spezies. Im Folgenden

werden mehrere Stammbäume berechnet, und es wird jedem berechneten Stammbaum eine Punktzahl bezüglich dieses Merkmals zugeordnet. Im zweiten Schritt wird diese Punktzahl mit Hilfe eines Algorithmus für die verschiedenen Stammbäume miteinander verglichen. Ausgegeben wird der Stammbaum der hinsichtlich des Merkmals basierend auf dem gewählten Algorithmus die besten Werte liefert (Maximum oder Minimum-Werte). Die evolutiven Schätzungen, welche im ersten Schritt vorgenommen werden, sind somit abgekoppelt von den Berechnungen im zweiten Schritt.

Es besteht ein grundlegender Unterschied bei den beiden verschiedenen Modellen bei der Verwendung der Algorithmen: bei einer Algorithmus-basierten Methode definiert der Algorithmus das Kriterium zur Berechnung der Stammbäume; bei Verwendung einer Merkmal-basierten Methode werden die Algorithmen genutzt, um das Merkmal zu bewerten. Da Merkmal-basierte Methoden an jeden berechneten/untersuchten Stammbaum Punktzahlen vergeben, erhält man eine Rangliste entsprechend des gesetzten Merkmals. Merkmal-basierte Methoden haben gegenüber Algorithmus-basierten Methoden den Vorteil, dass sie eine Wertung enthalten. Wenn mit einer rein auf einem Algorithmus basierenden Methode einen Stammbaum berechnet wird, kann nichts über die „Stärke“ dieses Stammbaumes ausgesagt werden. Eine Merkmals-basierte Methode sollte hingegen nur einen Stammbaum liefern, der mit den höchsten Wahrscheinlichkeitswerten (maximum likelihood) spezifisch bezüglich des objektiven Merkmals ist.

Die Berechnung phylogenetischer Stammbäume erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem Programm PAUP\* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (\*and other methods), Swofford 1993)) sowie bei großen Datensätzen (>20 Sequenzen) mit PHYML (Guindon & Gascuel 2003). Die Editierung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte mit dem Programm Treeview (Page 1996). Bei der Berechnung phylogenetischer Stammbäume wird eine Sequenz mit möglichst bekannter phylogenetischer Position als „Referenz“ mit verrechnet, welche nicht zu der Gruppe gehört, deren Phylogenie berechnet werden soll. Diese dient als Bezugspunkt für die neuen Sequenzen innerhalb des phylogenetischen Stammbaums. Diese Referenz wird auch als Außengruppe (outgroup sequence) bezeichnet. Der phylogenetische Stammbaum wird dann in Relation zu dieser Außengruppe gesetzt (*gewurzelt, rooted*). Demgegenüber können ungewurzelte (*unrooted*) Stammbäume gestellt werden, bei denen die Phylogenie zwischen den Sequenzen ohne Außengruppe dargestellt wird. Als Außengruppe wurde bei der Berechnung der Stammbäume für *Cibicides/Cibicidoides/Planulina* die SSU rDNA-Sequenz der rotaliiden Foraminiferen-Art *Chilostomella ovoidea* (AY359154) gewählt. Für Berechnungen phylogenetischer Stammbäume innerhalb der *Rotaliida* wurde die SSU rDNA-Sequenz von *Allogromia laticollaris* (*Allogromiidae*, ALA311218) gewählt.

## Material und Methoden

Zur Zeit existieren 56 verschiedenen Evolutionsmodelle (Überblick über eine Auswahl verschiedener Evolutionsmodelle Abb. 15). Um diese innerhalb der Maximum-Likelihood-Methode zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das Programm modeltest Version 3.7 Posada & Crandall (1998) eingesetzt. Mit diesem Programm wird ein likelihood-ratio-test durchgeführt, welcher den zu berechnenden Datensatz analysiert und das am ehesten zu diesem passende Evolutionsmodell ausgibt. Dies hat den Vorteil, dass in der darauf folgenden phylogenetischen Analyse z.B. mit PAUP\* das Ergebnis eines objektiven statistischen Tests zugrunde gelegt und das Modell ausgewählt werden kann, welches dem zu berechnenden Datensatz am ehesten entspricht. Ein Nachteil ist die hohe Rechenintensität bei großen Datensätzen.

Bei großen Datensätzen (>20 Sequenzen) wurde die Maximum-Likelihood-Analyse mit dem Programm PHYML (Guindon & Gascuel 2003) durchgeführt, da eine Analyse von mehr als 20 Sequenzen mit den von modeltest 3.7. vorgeschlagenen Parametern für PAUP\* die zur Verfügung stehende Rechenkapazität überstieg.

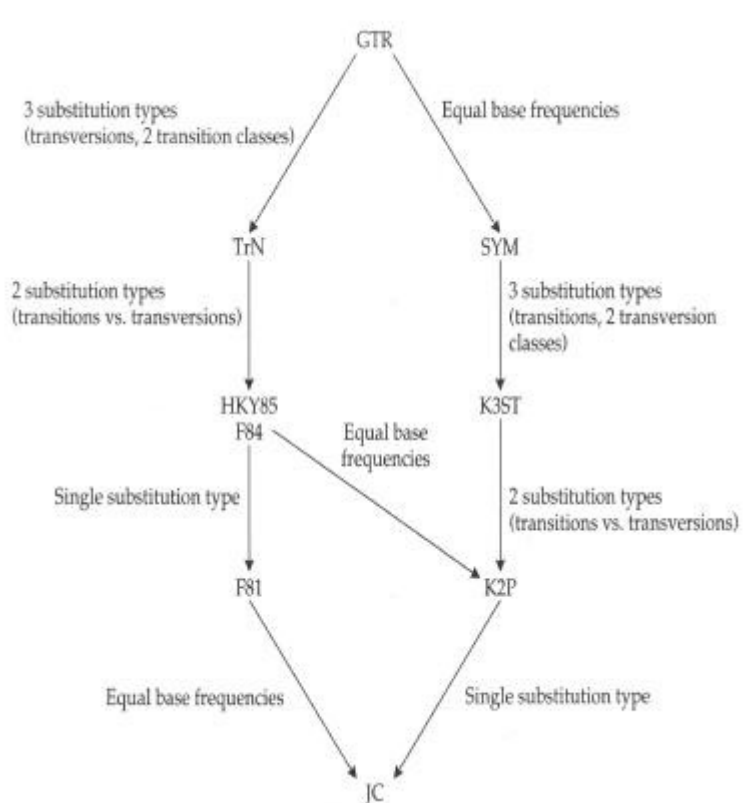


Abb. 15: verschiedene Evolutionsmodelle (aus Swofford et al. 1996) und deren Übergang ineinander mit Zunahme der Restriktionen.



### 2.12 Morphometrische Analyse der als *Planulina wuellerstorfi* identifizierten Individuen

Vor der DNA-Extraktion und damit der Zerstörung der Schale wurde der äußere Habitus der Foraminiferen für morphometrische Analysen mit Hilfe einer Digitalkamera dokumentiert. Anhand dieser Fotos wurden bei allen Individuen, von welchen Sequenzen vorliegen, bestimmte morphologische Daten aufgenommen. Die Fotos wurden hinsichtlich der folgenden Parameter analysiert (Abb. 16):

- 1) Durchmesser
- 2) Anzahl der Kammern im letzten Umgang
- 3) Anzahl der Kammern im letzten Halb-Umgang
- 4) Breite der letzten beiden Kammern
- 5) Wölbung der Ventralseite
  - a. deutlich spirokonvex
  - b. schwach spirokonvex
  - c. plan
  - d. schwach spirokonkav
  - e. deutlich spirokonkav
- 6) Erhaltungszustand der Schale
  - a. frisch - glasig
  - b. angewittert - weiß
- 7) Morphologie der letzten Kammer
  - a. Regulär
  - b. Irregulär (z.B. deutlich vorspringend)

## Material und Methoden

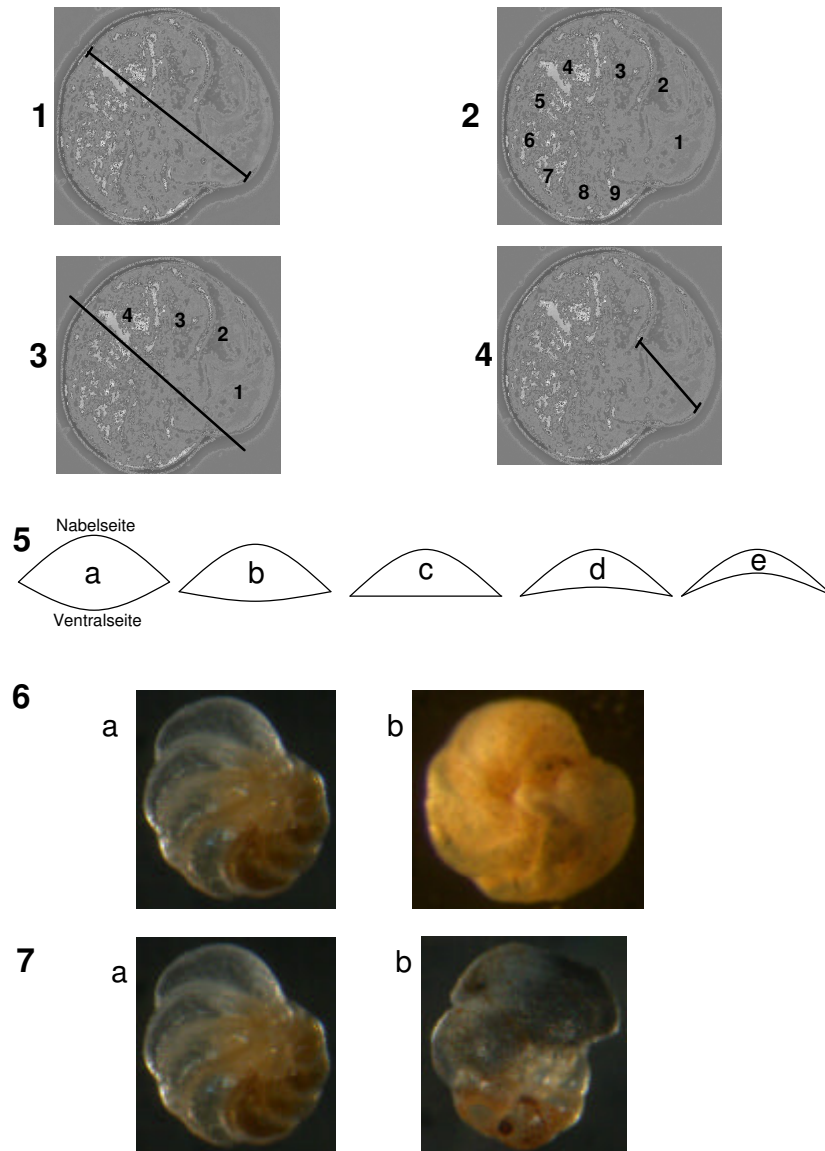


Abb. 16: Graphische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit aufgenommenen morphometrischen Parameter. 1) Durchmesser, 2) Anzahl der Kammern im letzten Umgang, 3) Anzahl der Kammern im letzten Halb-Umgang, 4) Breite der letzten beiden Kammern, 5) Wölbung der Ventralseite, 6) Erhaltungszustand, 7) Morphologie der letzten Kammer

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Vorgehensweise für molekularbiologische Arbeiten mit benthischen rotaliiden Tiefsee-Foraminiferen erfolgreich etabliert. Die Probenahme sowie die Aufbereitung des Probenmaterials für molekularbiologische Arbeiten mit diesen Organismen wurden modifiziert und ein PCR-Protokoll zur Amplifikation von DNA benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen wurde entwickelt. Mit der Etablierung dieser Methodik sowie der Entwicklung neuer Primer für die PCR und die Sequenzierung konnten insgesamt 89 Sequenzen eines ca. 1000 nt umfassenden 3´terminalen Fragmentes der SSU rDNA benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen bestimmt werden. Die Proben wurden mit Hilfe eines Multicorers auf sieben verschiedenen Stationen eines Profils vom ostgrönländischen Schelf bis in die Tiefsee erhalten (Abb. 6, Seite 22). Die Sequenzen wurden basierend auf DNA-Extraktionen einzelner Foraminiferen-Zellen mit der DOC-Methode erhalten.

Tabelle 11 : Übersicht über die amplifizierten und sequenzierten Individuen (gesamt und prozentual) der untersuchten Stationen der Reise ARK XIX/4a

Stations- kennung	Amplifikationen			Sequenzierungen		
	gesamt amplifiziert	erfolgreich amplifiziert	% erfolgreich amplifiziert	erfolgreich sequenziert	% sequenziert von pos. amplifiziert	% sequenziert von gesamt amplifiziert
PS487-1	28	-	-	-	-	-
PS488-1	4	-	-	-	-	-
PS489-1	18	-	-	-	-	-
PS490-1	18	1	5,56	1	100,00	5,56
PS504-1	33	-	-	-	-	-
PS506-1	176	29	16,48	17	58,62	9,66
PS508-1	9	7	77,78	6	85,71	66,67
PS511-1	146	25	17,12	7	28,00	4,79
PS528-1	53	18	33,96	10	55,56	18,87
PS529-1	291	58	19,93	39	67,24	13,40
PS531-1	301	35	11,63	10	25,71	2,99
<b>GESAMT</b>	<b>1077</b>	<b>173</b>		<b>89</b>		

Der Großteil der Individuen, deren SSU rDNA amplifiziert und sequenziert werden konnte, wurde an der Station 529-1 in 2958 m Tiefe gesammelt. Von den Proben dieser Station konnten von 67,2 % der Individuen, bei welchen ein ca. 1000 nt langes Fragment positiv amplifiziert wurde, auch Sequenzen der SSU rDNA gewonnen werden. Insgesamt lag der Sequenzierungserfolg zwischen 25,7 % (Station 531-1) – 85,7 % (Station 508-1) der positiv amplifizierten Individuen. 65 der erhaltenen SSU rDNA-Sequenzen wurden der epibenthisch lebenden Art *Planulina wuellerstorfi*

## Ergebnisse

zugeordnet. Außerdem wurden Sequenzen der benthischen Foraminiferen-Arten *Cibicides lobatulus*, *Pyrgo* sp., *Triloculina* sp., *Dentalina* sp. sowie *Cribrostomoides* sp. erhalten.

### 3.1 Artenverteilung der benthischen Foraminiferen-Gemeinschaft in der östlichen Grönlandsee

Ziel war die Charakterisierung benthischer Foraminiferen-Arten anhand molekularbiologischer Analysen und die Aufklärung der phylogenetischen Zusammenhänge innerhalb der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe. Eine detaillierte Faunen-Analyse wurde nicht durchgeführt. Jedoch ist es von Bedeutung, die qualitative Zusammensetzung der Foraminiferen-Gemeinschaft auf einer Station zu kennen. Diese qualitative Zusammensetzung kann z.B. Hinweise auf die trophische Situation an den einzelnen Stationen liefern. Die verschiedenen Arten, welche auf den verschiedenen Stationen isoliert wurden, zeigen die qualitative Artverteilung (auf Basis der selektierten Individuen) und die Änderung dieser Verteilung auf einem Profil vom ostgrönländischen Schelf bis in die Tiefsee (Abb. 17). Die in Abb. 17 dargestellten Daten beruhen ausschließlich auf der morphologischen Artbestimmung.

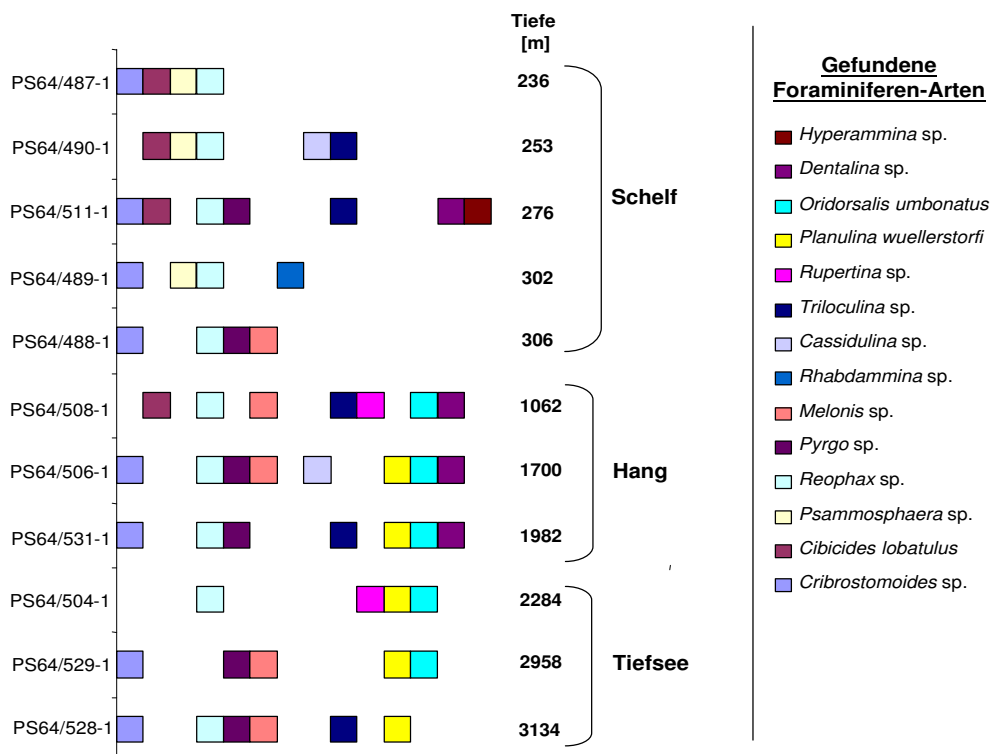


Abb. 17: Vertikalprofil der qualitativen Artenverteilung der Foraminiferen-Gemeinschaft auf den elf untersuchten Stationen der Reise ARK XIX/4a basierend auf morphologischer Artbestimmung

Die textulariide Art *Reophax* sp. wurde auf fast allen Stationen vom Schelf (236 m) bis in die Tiefsee (3134 m) gefunden; auch *Cribrostomoides* sp. konnte auf den meisten untersuchten Stationen isoliert werden. *Psammosphaera* sp. wurde nur auf einigen

Stationen des Schelfs (487-1, 490-1 und 489-1) gefunden. Die rotaliide *Pyrgo* sp. tritt ebenso wie *Triloculina* sp. ubiquitär vom Schelf bis in die Tiefsee auf. *Melonis* sp. (Rotaliida) wurde ebenfalls von den Stationen des Schelfs bis in die Tiefsee nachgewiesen. *Cibicides lobatulus* kann als Vertreter des Schelfs und des oberen Kontinentalhanges angesehen werden; diese Art wurde nicht unter 1000 m Wassertiefe gefunden. *Planulina wuellerstorfi* konnte lediglich aus Proben des unteren Kontinentalhanges (1700 m) sowie der Tiefsee (bis 3134 m) isoliert werden (506-1, 531-1, 504-1, 529-1, 528-1). Auch *Oridorsalis umbonatus* wurde nur in Proben des Kontinentalhanges sowie Stationen der Tiefsee gefunden. *Dentalina* sp. konnte aus einer Probe einer Station des grönländischen Schelfs (511-1) sowie aus Proben des Kontinentalhanges isoliert werden. Es wird also anhand Abb. 17 ersichtlich, dass es eine Zonierung benthischer Foraminiferen-Spezies in der östlichen Grönlandsee gibt. Charakteristische Vertreter der benthischen Foraminiferen-Fauna sind Generalisten wie *Cibrostomoides* sp., *Reophax* sp. und *Pyrgo* sp. sowie die allgemein als Spezialisten angesehenen Arten *Cibicides lobatulus* als Vertreter des Schelfs und des oberen Kontinentalhanges und *Planulina wuellerstorfi* sowie *Oridorsalis umbonatus* am unteren Kontinentalhang bzw. in der Tiefsee.

### **3.2 Überprüfung der Spezifität der entwickelten Primer für die SSU rDNA von Foraminiferen**

Da mit den meisten in der Literatur publizierten Primern keine Amplifikate aus Einzelzell-Extraktionen erhalten werden konnten, wurden eigene Primer für PCR und Sequenzierung entwickelt. Einen Überblick über die thermodynamischen Eigenschaften der entwickelten Primer sowie die Ergebnisse des Abgleiches mit der Datenbank des NCBI zeigt Tabelle 12.

## Ergebnisse

Tabelle 12 : Während der vorliegenden Arbeit entwickelte Primer: wichtigste thermodynamische Eigenschaften sowie die Ergebnisse des NCBI-Datenbank-Ableichs per BLAST. Dargestellt sind jeweils die fünf ersten Treffer. Bei „gewobblen“ Primern wurden alle möglichen Kombinationen des Primers mit der NCBI-Datenbank abgeglichen (1-4). Datenbank-Einträge von Foraminiferen-Sequenzen sind grün markiert, Einträge anderer Organismen sind rot markiert.

Primer-Bezeichnung	Schmelztemperatur [°C]	Mögliche Eigenbindung des Primers	nächste 5 Verwandte nach BLAST
Cibi fwd	52	keine	AY453138.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 548-32 AY453137.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 548-26 AY453135.1 <i>Neogloboquadrina dutertrei</i> isolate 456-14 AY453134.1 <i>Globorotalia crassaformis</i> isolate 452-2 AY453132.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 14-14
Cibi rev	54	keine	AY453136.1 <i>Globigerinita glutinata</i> isolate 457-10 AY453131.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 12-6 AY453130.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 12-5 AY453129.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 11-2 AY453128.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 2-14-9
K4R	53	keine	AY453138.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 548-32 AY453137.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 548-26 AY453135.1 <i>Neogloboquadrina dutertrei</i> isolate 456-14 AY453134.1 <i>Globorotalia crassaformis</i> isolate 452-2 AY453132.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 14-14
K5F	41	keine	AY453136.1 <i>Globigerinita glutinata</i> isolate 457-10 AY359192.1 <i>Virgulinema fragilis</i> clone N71-20 AY359191.1 <i>Virgulinema fragilis</i> clone N71-15 AY359190.1 <i>Virgulinema fragilis</i> clone N71-11 AY359189.1 <i>Uvigerina peregrina</i> clone X99-7
1186R	31-36	mögliche Eigenbindungs-Positionen: 5' GAATTRACAATYGCA 3' 3' ACGYTAACARTTAAG 5' 5' GAATTRACAATYGCA 3' 3' ACGYTAACARTTAAG 5'	1) AC010023.6 <i>Drosophila melanogaster</i> 3L BAC RP98-19G23 AC096692.5 <i>Drosophila melanogaster</i> 3L BAC RP98-48O3 AB012246.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> genomic DNA AE003546.4 <i>Drosophila melanogaster</i> chromosome 3L 2) AY453137.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 548-26 AY453135.1 <i>Neogloboquadrina dutertrei</i> isolate 456-14 AY453134.1 <i>Globorotalia crassaformis</i> isolate 452-2 AY359189.1 <i>Uvigerina peregrina</i> clone X99-7 AY359188.1 <i>Uvigerina peregrina</i> clone X99-11 3) AC124184.3 <i>Mus musculus</i> BAC clone RP23-227N23 AC101874.7 <i>Mus musculus</i> chromos. 7, clone RP23-366A20 AC114410.9 <i>Mus musculus</i> , clone RP23-151K8 AC096561.1 <i>Homo sapiens</i> BAC clone RP11-257D7 AC160012.1 <i>Medicago truncatula</i> chromosome 2 BAC clone 4) AC116953.5 <i>Mus musculus</i> BAC clone RP23-119H17 AY453138.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 548-32 AY453136.1 <i>Globigerinita glutinata</i> isolate 457-10 AY453132.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 14-14 AY453126.1 <i>Neogloboquadrina pachyderma</i> isolate 2-2-2

1) 1. Wobble-Position A, 2. wobble-Pos.C; 2) 1. wobble-Position G, 2. wobble-Position C; 3) 1. wobble-Position A, 2. wobble-Pos.T; 4) 1. wobble-Position G, 2. wobble-Pos.T.

Die Primer Cibi fwd sowie Cibi rev sind Foraminiferen-spezifisch, was durch einen Abgleich mit der NCBI-Datenbank bestätigt wurde. Es handelt sich bei den Organismen, deren Sequenzen die höchste Similarität zu den Primer-Sequenzen aufwiesen, zwar um planktonische Foraminiferen; diese haben sich nach neueren Erkenntnissen basierend auf molekularbiologischen Untersuchungen aber aus den kalkschaligen benthischen Foraminiferen entwickelt (Darling et al. 1997). Es ist daher nicht verwunderlich, dass innerhalb einer konservierten Region die Sequenz-Abschnitte sehr ähnlich sind, und es ist wahrscheinlich, dass die Primer Cibi fwd und

Cibi rev auch für die Amplifikation der SSU rDNA planktischer Foraminiferen geeignet sind. Durch eine Berechnung der Sequenz-Similarität (ClustalX percent identity matrix, Thompson et al. (1994)) der von der NCBI-Datenbank ausgegebenen Sequenzen planktonischer Foraminiferen (Tabelle 12, AY453138.1 *Neogloboquadrina pachyderma*; AY453137.1 *Neogloboquadrina pachyderma*; AY453136.1 *Globigerinita glutinata*) mit der Sequenz von *Planulina wuellerstorfi* PS698 konnte dies bestätigt werden (Tabelle 13 und 18).

Tabelle 13 : Prozentuale Sequenz-Similarität der von der NCBI-Datenbank ausgegebenen Sequenzen mit der Sequenz von *Planulina wuellerstorfi* PS698. Datenbasis: gesamtes Alignment (1131 Positionen)

NCBI Accession Nr.	Sequenz-Similarität			
	AY453136	PS698	AY453138	AY453137
<b>AY453136</b>	-	<b>87%</b>	81%	80%
<b>PS698</b>	87%	-	82%	82%
<b>AY453138</b>	81%	<b>82%</b>	-	99%
<b>AY453137</b>	80%	<b>82%</b>	99%	-

Tabelle 14 : Prozentuale Sequenz-Similarität der von der NCBI-Datenbank ausgegebenen Sequenzen mit der Sequenz von *Planulina wuellerstorfi* PS698. Datenbasis: konservierte Regionen des Alignments (703 Positionen)

NCBI Accession Nr.	Sequenz-Similarität			
	AY453136	PS698	AY453138	AY453137
<b>AY453136</b>	-	<b>94%</b>	89%	88%
<b>PS698</b>	94%	-	91%	91%
<b>AY453138</b>	89%	<b>91%</b>	-	99%
<b>AY453137</b>	88%	<b>91%</b>	99%	-

Basierend auf der gesamten Fragmentlänge (1131 Positionen im Alignment) besteht also zwischen den planktonischen Foraminiferen und *Planulina wuellerstorfi* PS698 eine Sequenz-Similarität von >82 - 87% (fett markierte Werte in Tabelle 13). Werden lediglich die für die Primer-Entwicklung kritischen konservierten Bereiche betrachtet (703 Alignment-Positionen), ergeben sich Sequenz-Similaritäten von 91 – 94 % (fett markierte Werte in Tabelle 14). Durch die für Foraminiferen-Sequenzen hohen Ähnlichkeiten kann also erklärt werden, dass bei einem Datenbank-Abgleich für die entwickelten Primer die Sequenzen planktonischer Foraminiferen als Sequenzen mit den höchsten Similaritätswerten ausgegeben werden.

Für die Vorläufer-PCR aus den DNA-Extraktionen basierend auf Einzelzellen wurden die Primer s14F3 sowie sB (Pawlowski et al. 1996) eingesetzt. Der Primer s14F3 ist

## Ergebnisse

---

ein Foraminiferen-spezifischer Primer, während der Primer sB in einer Region des Fragmentes ansetzt, die auch z.B. für Bacillariophyceae charakteristisch ist. Dieser Primer gilt also als universeller Primer.

Die Primer Cibi fwd und Cibi rev konnten nach erfolgter Temperatur-Optimierung erfolgreich in der nested PCR zur Amplifikation der SSU rDNA benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen eingesetzt werden.

Die Primer K4R, K5F sowie 1186R sollten ausschließlich zur Sequenzierung dienen. Die Ergebnisse im Vergleich mit der NCBI-Datenbank zeigten eine hohe Spezifität der Primer K4R und K5F für die SSU rDNA der Foraminiferen. Bei der Entwicklung des Primers 1186R wurden zwei Positionen (Pos. 6 und 12) mit wobbles versehen (Abb. 10, Seite 33). Anhand des Datenbank-Abgleiches konnte dieser Primer spezifiziert werden. Die Ergebnisse für zwei mögliche „Wobble-Varianten“ lieferten beim Datenbank-Abgleich ausschließlich (Variante 2, Tabelle 12) bzw. hauptsächlich (Variante 4, Tabelle 12) Foraminiferen als Treffer. Diese beiden Kombinationen sind also geeignet, um Foraminiferen-DNA zu amplifizieren. Die anderen beiden Kombinationen 1) und 3), Tabelle 12) zeigten ausschließlich höhere Eukaryonten (z.B. *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*) als genetische Quellen. Alle drei Primer, K4R, K5F sowie 1186R, konnten in der vorliegenden Arbeit erfolgreich für die Sequenzierung eingesetzt werden.

### **3.3 Ergebnisse zur Optimierung der PCR für die SSU rDNA von Einzelzellen benthischer Foraminiferen**

Für die PCR der SSU rDNA von Einzelzellen benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen wurde die PCR mehrfach optimiert. Die Kombination einer proofreading-Polymerase (exo-Vent, New England Biolabs) und einer Taq-Polymerase (RTG PCR Beads, Amersham Biosciences) sowie die Verwendung spezifischer Primer für benthische rotaliide Tiefsee-Foraminiferen führten zu einer erfolgreichen Amplifikation der SSU rDNA dieser Organismen. Die Modifikation des PCR-Protokolls resultierte in entscheidenden Verbesserungen der Amplifikationsausbeute. Diese Modifikationen sollen im Folgenden dargestellt werden.

Ein Vergleich der Polymerase-Systeme zeigte eine verbesserte Amplifikation der exo<sup>-</sup>Vent-Polymerase im Gegensatz zu den RTG Beads in der Vorläufer-PCR. 75% der mit der exo<sup>-</sup>Vent-Polymerase produzierten Amplifikate aus der Vorläufer-PCR konnten nach Aufreinigung in der nested PCR erfolgreich amplifiziert werden, während bei der Reaktion auf Grundlage der RTG Beads lediglich 30% positive Amplifikate erhalten werden konnten.

Während der Optimierung der PCR zeigte sich, dass eine nested PCR notwendig war, um die DNA einzelner Foraminiferen-Zellen amplifizieren zu können. Die Vorläufer-



PCR erfolgte mit den Primern s14F3 und sB mit der *exo<sup>-</sup>* Vent-Polymerase sowie 5 µl DNA-template. Die daraus entstehenden unspezifischen Produkte (Abb. 18a) wurden aufgereinigt (Roche High Pure PCR Purification Kit) und in der folgenden nested PCR mit den Primern Cibi fwd/ Cibi rev und 3 µl template des aufgereinigten PCR-Produktes nochmals amplifiziert. Diese Kombination erbrachte reproduzierbar deutliche positive Signale (Abb. 18b, Tabelle 15).

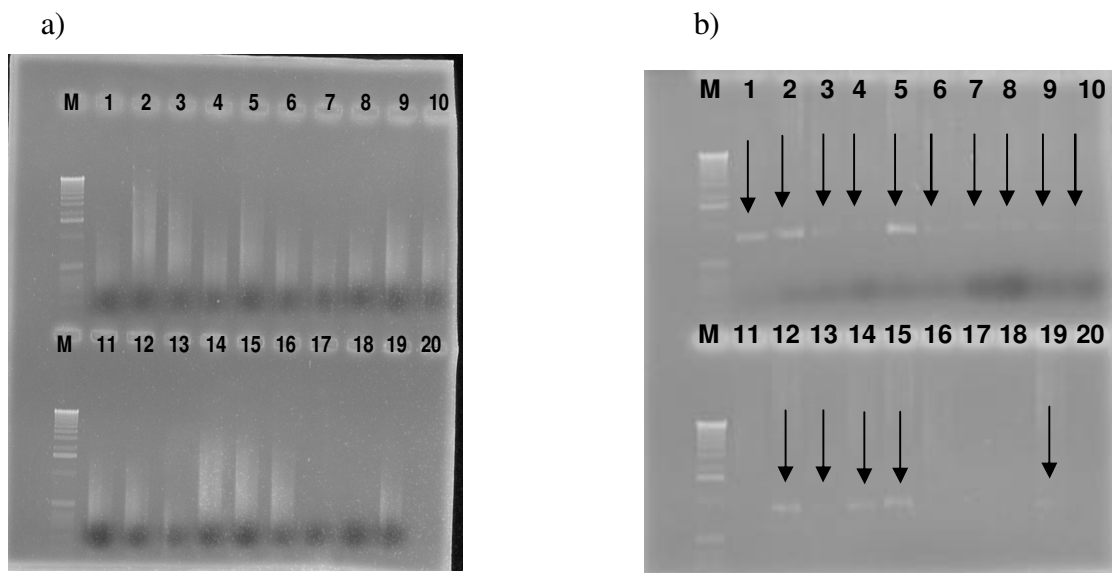


Abb. 18: A) Agarose-Gel-Elektrophorese nach Vorläufer-PCR mit s14F3/sB, *exo<sup>-</sup>* Vent-Polymerase-System; B) Agarose-Gel-Elektrophorese nach erfolgter Aufreinigung mit Roche High Pure PCR Purification Kit und nested Amplifikation mit Cibi fwd/Cibi rev, RTG PCR Beads. Positive Amplifikate sind mit Pfeilen markiert. M: *DNA Molecular Weight Marker X* (Roche, Mannheim).

Tabelle 15 : Probenbezeichnung der in Abb. 18 dargestellten Agarose-Gele

Spur Nr.	Probenbezeichnung	Ergebnis Vorläufer- PCR	Ergebnis nested PCR
1	PS102	- (unspezifisch)	+
2	PS103	- (unspezifisch)	+
3	PS104	- (unspezifisch)	+
4	PS105	- (unspezifisch)	+
5	PS106	- (unspezifisch)	+
6	PS107	- (unspezifisch)	+
7	PS108	- (unspezifisch)	+
8	PS109	- (unspezifisch)	+
9	PS110	- (unspezifisch)	+
10	PS111	- (unspezifisch)	+
11	PS112	- (unspezifisch)	-
12	PS113	- (unspezifisch)	+
13	PS114	- (unspezifisch)	+
14	PS115	- (unspezifisch)	+
15	PS117	- (unspezifisch)	+
16	PS118a	- (unspezifisch)	-
17	PS118b	- (unspezifisch)	-
18	PS119	- (unspezifisch)	-
19	PS120	- (unspezifisch)	+
20	leer	leer	leer

## Ergebnisse

Während der Optimierung der PCR wurde auch ein Vergleich verschiedener Primer-Systeme für die nested PCR durchgeführt. Ein Vergleich der Primer-Paare s14F1/sB und den in der vorliegenden Arbeit entwickelten Primern Cibi fwd/ Cibi rev zeigte, dass die selbst entwickelten Primer zu einem besseren Amplifikations-Ergebnis führten (Abb. 19, Tabelle 16).

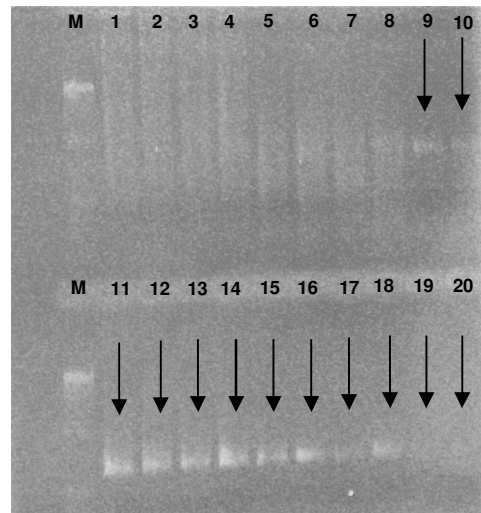


Abb. 19: Agarose-Gel-Elektrophorese nach einer PCR zum Primer-Vergleich der Paare s14F3/sB (1-10) und Cibi fwd/ Cibi rev (11-20) anhand der Proben PS89 und PS91 in verschiedenen Verdünnungen (Tabelle 16). Spur M: *DNA Molecular Weight Marker X* (Roche, Mannheim).

Tabelle 16 : Übersicht der Proben auf dem in Abb. 19 dargestellten Agarose-Gel. A: aufgereinigt; AR: aufgereinigt und reamplifiziert; ARA: aufgereinigt, reamplifiziert und erneut aufgereinigt.

Spur Nr.	Probenbezeichnung	Ergebnis
1	PS89 AR	-
2	PS91 AR	-
3	PS89 ARA	-
4	PS91 ARA	-
5	PS89 AR 1:100	-
6	PS91 AR 1:100	-
7	PS89 ARA 1:100	-
8	PS91 ARA 1:100	-
9	PS89 A 1:100	+
10	PS91 A 1:100	+
11	PS89 AR	+
12	PS91 AR	+
13	PS89 ARA	+
14	PS91 ARA	+
15	PS89 AR 1:100	+
16	PS91 AR 1:100	+
17	PS89 ARA 1:100	+
18	PS91 ARA 1:100	+
19	PS89 A 1:100	+
20	PS91 A 1:100	+

Bei dem  $\text{exo}^-$ -Vent-Polymerase-System wird vom Hersteller (New England Biolabs) ein spezieller Reaktionspuffer angeboten, der in einer bestimmten Konzentration bei der PCR eine optimale Salzkonzentration für die Reaktion gewährleisten soll. Dieser Puffer wurde nach Herstellerangaben (Rezept siehe Anhang C) angesetzt und eine PCR mit DNA der kalkschaligen Flachwasser-Foraminifere *Nonion* sp. aus dem Skagerrak als template durchgeführt. Der Versuch mit dem selbst angesetzten Reaktionspuffer resultierte in einer deutlichen Verbesserung der Signalstärke (Abb. 20). Dieser Puffer wurde im Folgenden für die Vorläufer-PCR mit dem  $\text{exo}^-$ -Vent-Polymerase-System standardmäßig eingesetzt. Anhand der Ergebnisse dieser Optimierungsversuche konnte die PCR für die Amplifikation von Einzelzellen benthischer kalkschaliger Foraminiferen erfolgreich modifiziert werden.

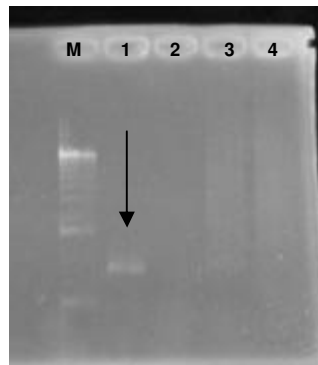


Abb. 20: Agarose-Gel zur Überprüfung der PCR mit selbst angesetztem (Spur 1+2) und vom Hersteller des Polymerase-Systems mitgeliefertem (Spur 3+4) Reaktionspuffer. Spur 1+3: SSU rDNA-Amplifikat von *Nonion* sp. (Skagerrak), 1:100 Verdünnung; Spur 2+4: DNA-freies H<sub>2</sub>O (Negativ-Kontrolle). M: DNA-Molecular Weight Marker X (Roche, Mannheim).

## Ergebnisse

Die Reaktionskomponenten der PCR sowie die verwendeten Primer für die Amplifikation der SSU rDNA rotaliider Tiefsee-Foraminiferen sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17 : Für die Amplifikation von Einzelzellen benthischer kalkschaliger Foraminiferen in der vorliegenden Arbeit verwendete Zusammensetzung der PCR-Komponenten. a) Vorläufer-PCR mit exo- Vent System (New England Biolabs) b) nested PCR mit RTG PCR Beads (Amersham Biosciences)

a)		b)	
Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
PCR-Puffer (New England Biolabs)	5	Primer Cibi fwd	0.75
MgSO <sub>4</sub>	0.5	Primer s14F1	0.75
Primer s14F3 (10 pmol/ $\mu$ l)	1.5	Primer Cibi rev	1.5
Primer sB (10 pmol/ $\mu$ l)	1.5	H <sub>2</sub> O DNA-frei	19
dNTPs	5	Template-DNA	3
Polymerase	0.5		
H <sub>2</sub> O DNA-frei	31		
Template-DNA	5		
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

Als nested-PCR wurde eine Multiplex-PCR mit den Primern Cibi fwd, s14F1 und Cibi rev durchgeführt. Das in der Vorläufer-PCR mit den Primern s14F3 und sB amplifizierte Fragment hat eine Sequenz-Länge von 1057 nt. Bezogen auf die vollständige Sequenz der SSU rDNA von *Ammonia beccarii* (EMBL-Datenbank-Zugangs-Nummer: ABSSURRNA), sind diese Primer 31 nt (Distanz von s14F3 - s14F1), 230 nt (Distanz von s14F3 - Cibi fwd) bzw. 14 nt (Distanz von sB - Cibi rev) innerhalb des Fragmentes positioniert, welches in der Vorläufer-PCR mit s14F3 und sB amplifiziert wird (graphische Darstellung der Positionen der Primer auf der SSU rDNA Abb. 9, Seite 32, Angabe der Positionen Tabelle im Anhang E). Es entstehen so bei einer PCR Fragmente zweier verschiedener Nucleotid-Längen (s14F1- Cibi rev: 1012 nt; Cibi fwd – Cibi rev: 813 nt). Es ist möglich, dass sehr große DNA-Fragmente aufgrund der Einwirkung von Scherkräften oder der Ausbildung von Sekundärstrukturen nicht amplifizierbar sind. Eine Multiplex-PCR, bei welcher sowohl kürzere als auch längere Fragmente amplifiziert werden, kann hier von Vorteil sein. Die Reaktionsbedingungen für die Amplifikation der SSU rDNA benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18 : Verwendete Primer-Systeme und PCR-Programme für die Amplifikation der SSU rDNA benthischer rotaliider Tiefsee-Foraminiferen.

Amplifikation	Primer sense/ antisense	Zyklen Anzahl	Annealing		Elongation		Denaturierung	
			T [°C]	Zeit [sec]	T [°C]	Zeit [sec]	T [°C]	Zeit [sec]
		1					94	120
Voramplifikation mit <i>exo</i> Vent PCR System	s14F3/ sB	35	58	40	72	60	94	30
		1	42	60	72	300		
		1					94	120
nested Multiplex PCR mit RTG PCR Beads	S14F1/ Cibi fwd/Cibi rev	35	58	40	72	60	94	30
		1	42	60	72	300		

### 3.4 Aus den Proben der Reise ARK XIX/4a erhaltene Sequenzen

Nach Modifikation der Template-Menge für die Sequenzierung konnten rotaliide Tiefsee-Foraminiferen aus Einzelzell-Extraktionen sequenziert werden. Die Primer Cibi fwd, sB sowie Cibi rev konnten erfolgreich für die Sequenzierung eingesetzt werden, wobei deutlich wurde, dass die antisense-Primer (Cibi rev, K4R, 1186R) die besseren Resultate lieferten.

Basierend auf der Entwicklung von 1186R und der Kombination mit anderen Primern wurden erste längere Fragmente (400 – 710) sequenziert. Es erfolgte ein erneutes Primer-Design, bei welchem die Primer K4R und K5F entwickelt wurden (Sequenz und Position Tabelle 7, Seite 29). Mit Hilfe dieser neu entwickelten Primer wurden Fragmente von 1000 nt Länge sequenziert. Die Sequenzierung konnte mit der Entwicklung von K4R und K5F von acht Primern pro 1000 nt-Fragment (Cibi fwd, s15R, s17F, s17R, s18R, 1186R, s20R, Cibi rev) auf fünf Primer pro 1000 nt-Fragment optimiert werden (Cibi fwd, K4R, K5F, 1186R, Cibi rev).

In der vorliegenden Arbeit konnten 89 Sequenzen von Tiefsee-Foraminiferen aus der östlichen Grönlandsee von ca. 1000 nt Länge bestimmt werden. Alle Sequenzen stammten aus Probenmaterial der Reise ARK XIX/4a des Forschungsschiffes POLARSTERN.

Ein Überblick über die Stationen, von welchen erfolgreich DNA benthischer Foraminiferen amplifiziert und sequenziert werden konnte, ist in Abb. 21 sowie Tabelle 19 dargestellt.

## Ergebnisse

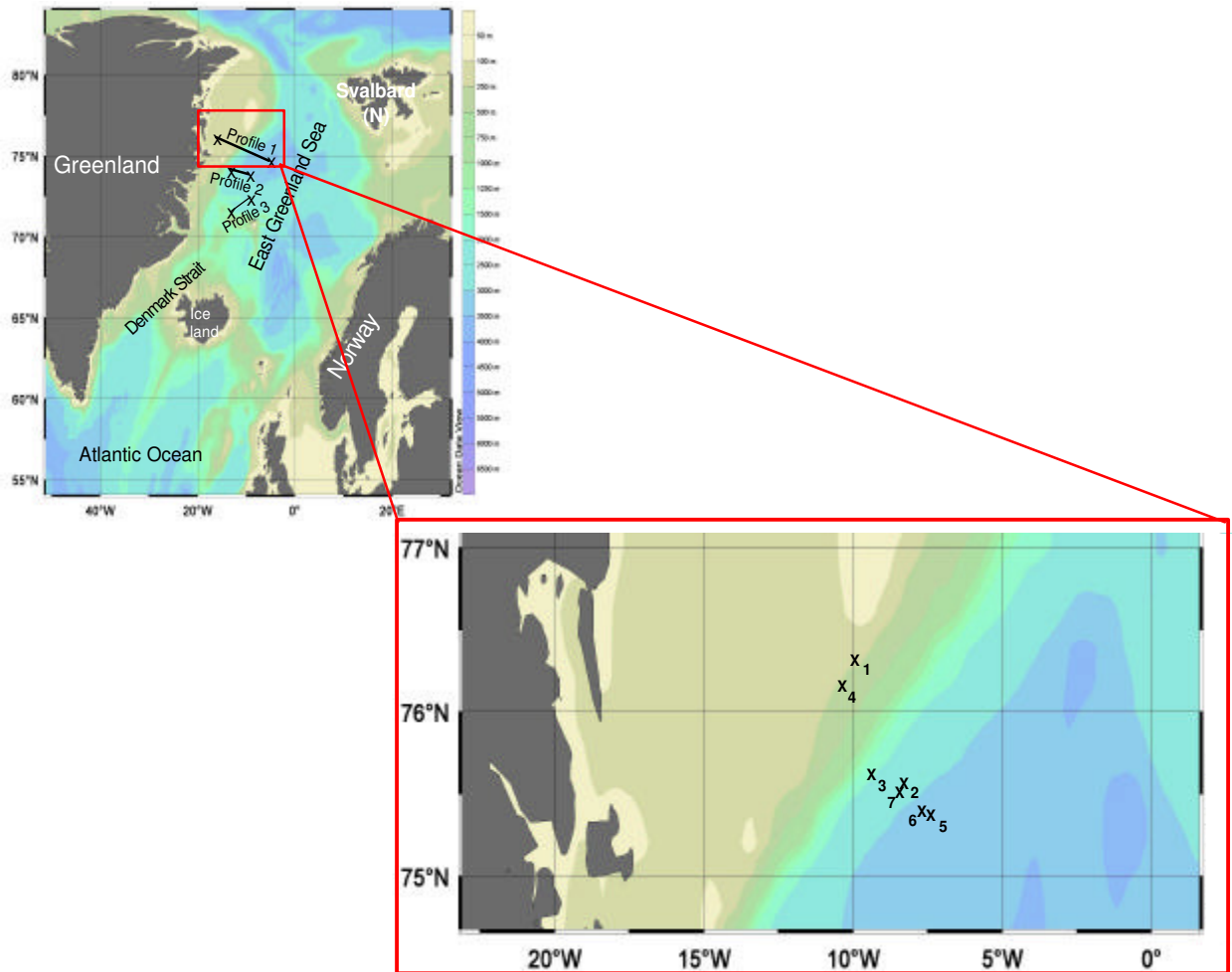


Abb. 21: Übersichtskarte der östlichen Grönlandsee sowie Ausschnitt des Profils 1 der Reise ARK XIX/4a. X1 – X7: Stationen, auf denen DNA-Sequenzen von Foraminiferen gewonnen werden konnten.

Tabelle 19 : Geographische Positionen der Stationen der Reise ARK XIX/4a, auf welchen Foraminiferen-DNA extrahiert und erfolgreich sequenziert wurde.

Stationsbezeichnung	Bezeichnung laut Abb. 21	geographische Position	Tiefe
PS64/490-1	X1	76°23.822 N 09°59.437 W	253
PS64/506-1	X2	75°51.158 N 08°38.838 W	1700
PS64/508-1	X3	75°58.902 N 09°11.849 W	1062
PS64/511-1	X4	76°09.955 N 10°06.943	276
PS64/528-1	X5	75°35.368 N 07°34.591 W	3134
PS64/529-1	X6	75°38.693 N 07°48.121 W	2958
PS64/531-1	X7	75°46.901 N 08°20.833 W	1982

Die DNA-Sequenzen wurden hauptsächlich von Foraminiferen aus Stationen der tiefen Ostgrönlandsee (1700 m – 3134 m) erhalten. Die Sequenzen wurden unter den Zugangsnummern AJ972504 – AJ972592 in der Sequenz-Datenbank des European Molecular Biology Laboratory (EMBL: <http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?+page+srsq2+-noSession>) archiviert. Bisher sind in internationalen Datenbanken eine

Sequenz von *Planulina wuellerstorfi* (AY934741, *Cibicides wuellerstorfi*) sowie eine Sequenz von *Cibicides lobatulus* (AY934742, beide Schweizer et al. (2005)) deponiert.

Es handelt sich in der vorliegenden Arbeit um den ersten zusammenhängenden Datensatz von SSU rDNA-Sequenzen der benthischen Foraminiferen-Spezies *Planulina wuellerstorfi*. Durch die Einzigartigkeit dieses Datensatzes ist es möglich, Berechnungen zur Phylogenie dieser für paläozeanographische Rekonstruktionen wichtigen benthischen Foraminiferen-Spezies durchzuführen.

Ferner soll darauf hingewiesen werden, dass mit den in dieser Arbeit sequenzierten *Planulina wuellerstorfi*-Sequenzen erstmals Sequenzen kalkschaliger Tiefsee-Foraminiferen, die nicht aus Auftriebsgebieten bzw. dem Flachwasser stammen, in internationalen Datenbanken archiviert wurden. Durch die Entwicklung spezifischer Primer für die SSU rDNA benthischer rotaliider Foraminiferen konnte ein Verfahren zur Amplifikation und Sequenzierung der DNA dieser Organismen etabliert werden.

### 3.5 Ergebnisse der phylogenetischen Rekonstruktionen

#### 3.5.1 Berechnung von Sekundärstrukturen

Die mit RNAstructure berechneten Sekundärstrukturen dienten zur manuellen Korrektur des Alignments (graphische Darstellung der Berechnung der Sekundärstrukturen von F1-F3 und V1, V3 und V4 im Anhang F). Ein phylogenetischer Stammbaum mit 17 Sequenzen verschiedener ausgewählter Foraminiferen-Arten (*Allogromia laticollaris*, *Haplophragmoides wilberti*, *Ammotium pseudocassis*, *Textularia* sp., *Trochammina* sp., *Uvigerina peregrina*, *Bulimina aculeata*, *Bolivina variabilis*, *Globobulimina pseudospinescens*, *Globocassidulina* sp., *Hyalinea baltica*, *Rosalina orbicularis*, *Planorbulina mediterraneensis*, *Chilostomella ovoidea*, *Melonis affinis*, *Cibicides refulgens* aus der EMBL-Datenbank sowie die während dieser Arbeit sequenzierte *Planulina wuellerstorfi*-Sequenz PS 698) wurde auf drei verschiedene Weisen berechnet, um den Einfluss der Integration der variablen Regionen auf das Ergebnis der phylogenetischen Analyse zu überprüfen. Die Datensätze wurden zunächst in Modeltest 3.7 analysiert und die phylogenetische Analyse erfolgte jeweils mit dem von Modeltest 3.7. ausgegebenen (AIC) phylogenetischen Modell. Tabelle 20 zeigt das Ergebnis der Analyse der drei Datensätze sowie die zur Berechnung der jeweiligen Stammbäume von Modeltest 3.7 ausgegebenen und in PAUP\* genutzten Parameter.

Für die Berechnung des Stammbaumes in Abb. 22 wurden die variablen Bereiche aus dem Alignment entfernt. Die Sequenzinformation der Eingangsdatensätze für die Berechnung der Stammbäume in Abb. 23 und Abb. 24 ist identisch; für den in Abb. 24 verwendeten Datensatz für den phylogenetischen Stammbaum wurde jedoch eine Sekundärstrukturanalyse der variablen Bereiche vorgenommen. Tabelle 20 zeigt die von Modeltest 3.7. ausgegebenen Modelle zur Berechnung der phylogenetischen Stammbäume sowie die Parameter, mit welchen die Stammbäume in Abb. 22, 23 und 24 berechnet wurden. Für alle Datensätze wurde jeweils das General-Time-Reversible-Modell (GTR) als bestes Modell ausgegeben. Das GTR (Lanavé et al. 1984; Rodriguez et al. 1990; Tavaré 1986) ist das generellste aller Modelle (Abb. 15, Seite 47 (Swofford et al. 1996)). Es werden beim GTR sechs Nucleotid-Substitutionstypen (Nst=6) angenommen. Der phylogenetische Stammbaum in Abb. 22 zeigt das Ergebnis der Berechnung ausschließlich auf Basis der konservierten Regionen. Als Basis dieser phylogenetischen Berechnung dienten 697 definitiv alignbare Positionen der Sequenzen (konservierte Bereiche). Für diese Berechnung blieben die variablen Bereiche unberücksichtigt. Bei allen drei Stammbäumen wurde *Allogromia laticollaris* als Außengruppe gewählt. *Allogromia laticollaris* ist zwar als allogromiide Foraminifere phylogenetisch klar innerhalb der Foraminiferen zu positionieren; Ziel



dieser Berechnung war jedoch eine Auflösung der phylogenetischen Strukturen innerhalb der rotaliiden Foraminiferen, und für diese Zielsetzung ist es durchaus geeignet, eine allogromiide Foraminifere als Außengruppe zu wählen.

Tabelle 20 : Ergebnisse der Modeltest 3.7. – Analysen

In die phylogenetische Analyse eingehender Datensatz: Von Modeltest 3.7. ausgegebenes Modell zur phylogenetischen Analyse (AIC)	Abb. 22 (variable Bereiche entfernt)	Abb. 23 (variable Bereiche berücksichtigt; keine Sekundärstrukturen berechnet)	Abb. 24 (variable Bereiche berücksichtigt; Sekundärstrukturen berechnet)
	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
<b>Modeltest Settings:</b>	Base=(0.2612 0.2073 0.2285) Nst=6 Rmat=(0.9993 4.4000 3.0885 0.5665 6.2366) Rates=gamma Shape=0.6714 Pinvar=0.4901;	Base=(0.2672 0.1641 0.1898) Nst=6 Rmat=(1.5147 4.7147 2.6700 1.6143 7.3230) Rates=gamma Shape=0.5766 Pinvar=0.3474	Base=(0.2674 0.1812 0.1855) Nst=6 Rmat=(1.6743 3.6042 2.3882 1.3147 3.6042) Rates=gamma Shape=0.3731 Pinvar=0.1809

## Ergebnisse

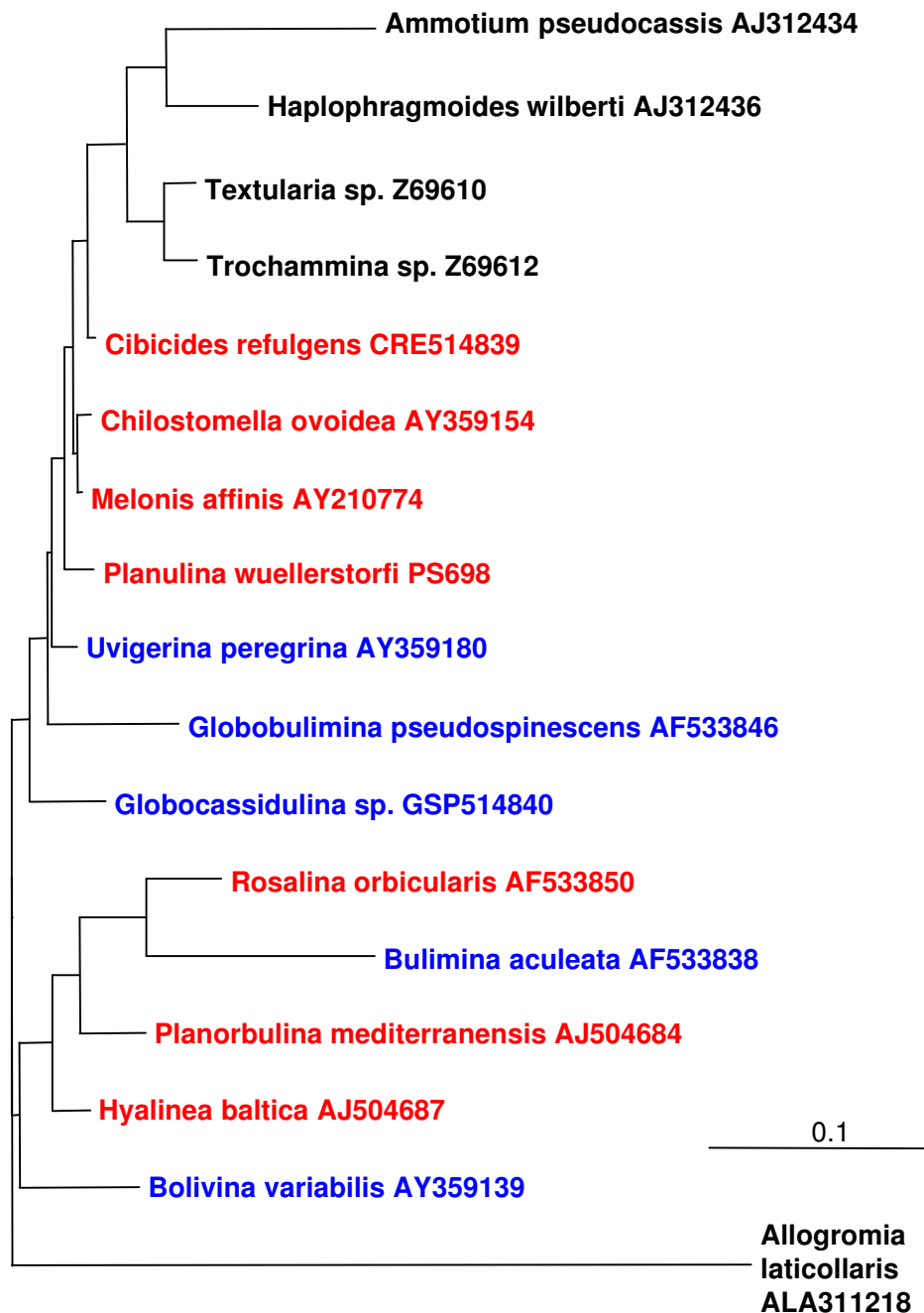


Abb. 22: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Foraminiferen-Arten auf der Basis eines 1000 nt langen Fragmentes der SSU rDNA. Das Alignment wurde mit default Parametern in ClustalX berechnet; variable sowie foraminiferen-spezifische Regionen wurden aus dem Alignment entfernt. Berechnungsmethode: Maximum Likelihood (PAUP\* 4.0), Auswahl des Evolutionsmodells (GTR+G+I) anhand von modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). ML-Parameter Tabelle 20; rot: spirale Rotaliida; blau: elongate Rotaliida; schwarz: Außengruppe *Allogromia laticollaris* sowie Sequenzen der Astrorhizida und Textulariida.

Im phylogenetischen Stammbaum in Abb. 22 werden die astrorhiziden (*Ammotium pseudocassis*, *Haplophragmoides wilberti*) und textulariiden (*Trochammina* sp., *Textularia* sp.) Foraminiferen als Schwester-Taxa dargestellt. Eine weitere Cluster-Bildung ist anhand dieses phylogenetischen Stammbaumes nicht erkennbar; rotaliide

und buliminide Foraminiferen stehen isoliert an den Ästen des Stammbaumes. Diese Topologie ist außer der Positionierung der Astrorhizida bzw. Textulariida in keiner Weise übereinstimmend mit der auf morphologischen Charakteristika basierenden Taxonomie.

Abb. 23 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum, welcher mit den gleichen Sequenzen berechnet wurde, allerdings unter Einbeziehung der variablen Regionen. Die Sekundärstrukturen der variablen Regionen wurden nicht berücksichtigt.

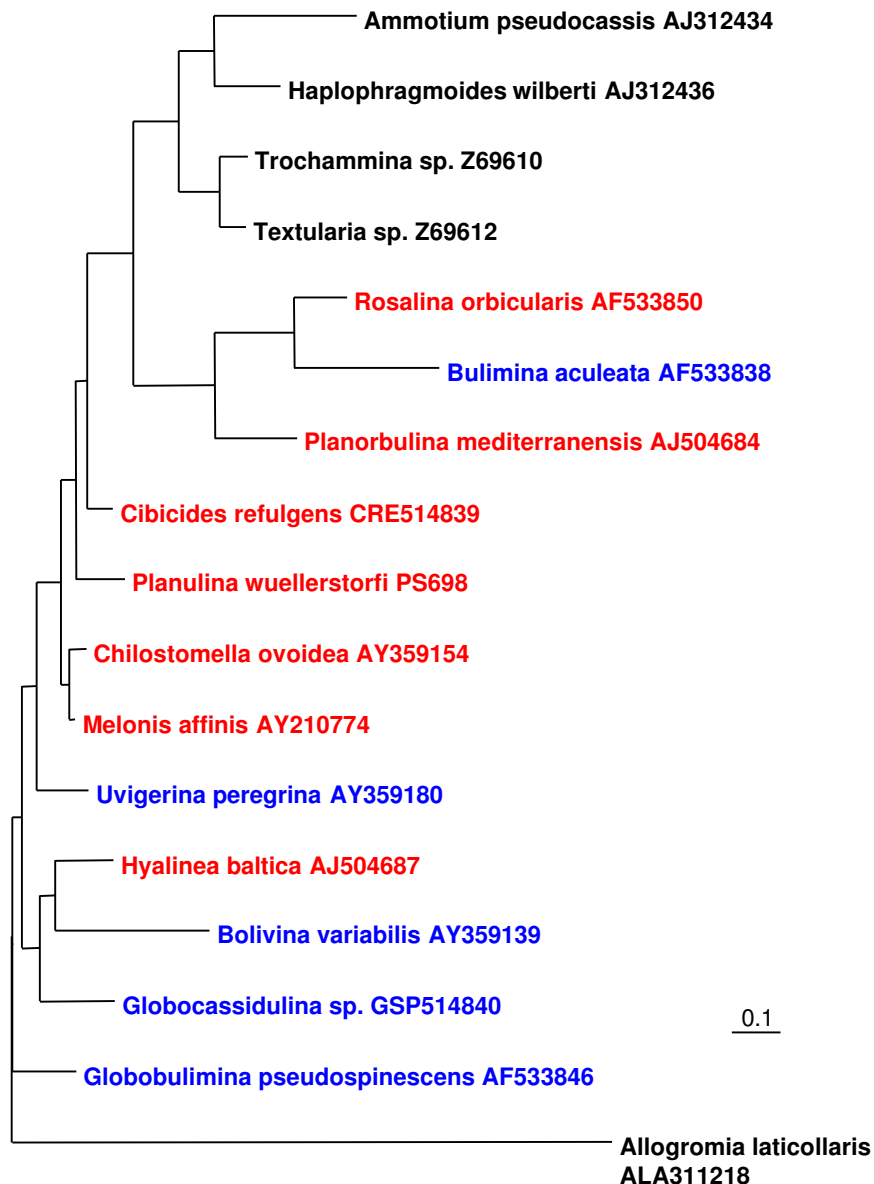


Abb. 23: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Foraminiferen-Arten auf der Basis eines 1000 nt langen Fragmentes der SSU rDNA. Das Alignment wurde mit default Parametern in ClustalX berechnet; es erfolgte keine Sekundärstruktur-Analyse. Berechnungsmethode: Maximum Likelihood (PAUP\* 4.0), Auswahl des Evolutionsmodells (GTR+G+I) anhand von modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). ML-Parameter Tabelle 20; rot: spirale *Rotaliida*; blau: elongate *Rotaliida*; schwarz: Außengruppe *Allogromia laticollaris* sowie Sequenzen der *Astrorhizida* und *Textulariida*.

## Ergebnisse

---

Im phylogenetischen Stammbaum in Abb. 23 wird z.B. *Rosalina orbicularis* als Schwester-Taxon zu *Bulimina aculeata* positioniert und die *Rosalina-Bulimina-Planorbulina*-Gruppe wird als Schwester-Taxon zu den Textulariida und Lituolida gestellt. *Cibicides refulgens* und die in der vorliegenden Arbeit erhaltene Sequenz von *Planulina wuellerstorfi* können keiner Gruppe zugeordnet werden, sondern werden ebenso wie *Uvigerina peregrina* und *Globobulimina pseudospinescens* an isolierten Ästen des Stammbaumes angeordnet. Die Cluster-Bildung innerhalb dieses phylogenetischen Stammbaumes spiegelt ebenfalls in keiner Weise die auf den morphologischen Charakteristika der Schale basierende Taxonomie wieder. Im Fall von *Bulimina aculeata* (elongat, biserial) und *Rosalina orbicularis* (spiral) stehen zwei rotaliide Foraminiferen mit stark unterschiedlicher Morphologie als Schwester-Taxa an einem Ast des Stammbaumes. Diese Topologie auf Basis der molekularen Daten ist eher damit zu erklären, dass die homologen Positionen der verschiedenen Sequenzen innerhalb der variablen sowie der hochvariablen Foraminiferen-spezifischen Bereiche der SSU rDNA bereits im Alignment nicht korrekt ausgewertet werden konnten und die Topologie der Sequenzen damit in der darauf basierenden phylogenetischen Analyse nicht sinnvoll bzw. korrekt berechnet werden konnte. Dies kann aufgrund der Komplexität dieser variablen Bereiche als sehr viel wahrscheinlicher angesehen werden als die Infragestellung der gesamten Morphotaxonomie aufgrund dieses phylogenetischen Baumes.

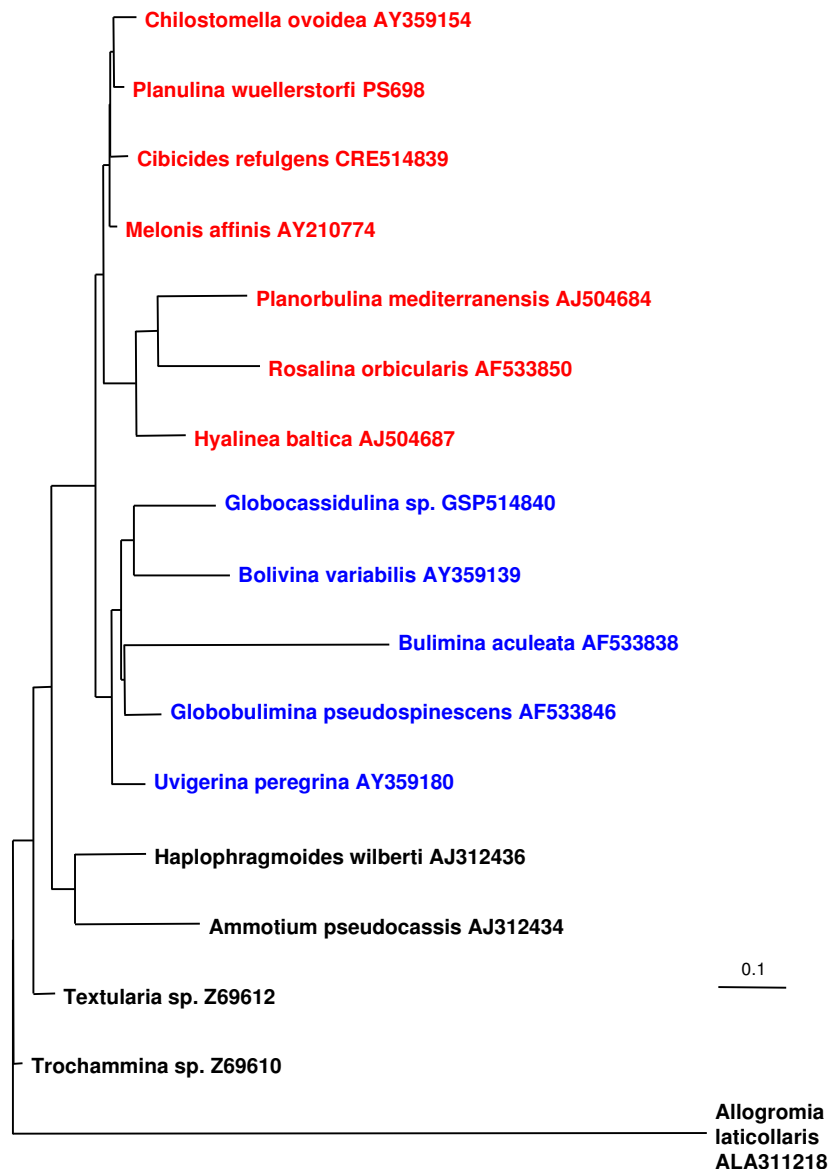


Abb. 24: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Foraminiferen-Arten auf der Basis eines 1000 nt langen Fragmentes der SSU rDNA. Die variablen Bereiche wurden einer Sekundärstruktur-Analyse mit Hilfe von RNAstructure v.4.11 unterzogen. Berechnungsmethode: Maximum Likelihood (PAUP\* 4.0), Auswahl des Evolutionsmodells (GTR) anhand von modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). ML-Parameter Tabelle 20; **rot**: spirale *Rotaliida*; **blau**: elongate *Rotaliida*; **schwarz**: Außengruppe *Allogromia laticollaris* sowie Sequenzen der *Astrorhizida* und *Textulariida*.

Abb. 24 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum, bei welchem die homologen Positionen der variablen Bereiche sowie die hochvariablen Foraminiferen-spezifischen Bereiche mit Hilfe des Programms RNAstructure bestimmt wurden und das Alignment basierend auf der Sekundärstruktur dieser Bereiche manuell korrigiert wurde. *Ammotium pseudocassis* und *Haplophragmoides wilberti* werden als *Astrorhizida* in diesem phylogenetischen Stammbaum als Schwester-Taxon zu den *Rotaliida* gestellt.

## Ergebnisse

---

Innerhalb der *Rotaliida* gibt es eine klare Aufspaltung in spirale und elongate Formen. Spirale Formen wie *Hyalinea baltica*, *Rosalina orbicularis* und *Planorbulina mediterraneensis* werden als Schwester-Taxa zu *Planulina wuellerstorfi*, *Cibicides refulgens*, *Chilostomella ovoidea* sowie *Melonis affinis* positioniert. Eine klare Aufspaltung zwischen rotaliiden und buliminiden Foraminiferen, wie in Abb. 24 gezeigt, ist eher wahrscheinlich als die Cluster-Bildung in Abb. 22 oder 23. Diese Aufspaltung deutet darauf hin, dass die biserialen, elongaten Kammeranordnungen innerhalb der Rotaliida lediglich einmal evolviert sind und daraufhin verschiedene Modifikationen erfahren haben (monophyletischer Ursprung). Für die rotaliiden Foraminiferen kann aufgrund dieses Stammbaumes ebenfalls ein monophyletischer Ursprung angenommen werden. Die Anpassung an verschiedene Lebensräume und deren abiotische sowie biotische Parameter (hydrostatischer Druck, Salinität, Temperatur, Nährstoffsituation, Sedimentbeschaffenheit, Nahrungssituation, Prädatoren) können sich im Laufe der Evolution in genetischen Modifikationen widerspiegeln. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die bei rezenten Rotaliida gefundenen Modifikationen der SSU rDNA-Sequenz eine Anpassung an unterschiedliche Lebensräume darstellen.

Andere phylogenetische Berechnungsmethoden (Maximum Likelihood nach dem F84-Modell, PHYLIP, Maximum Parsimony, evolutive Distanz nach dem Kimura-2-Parameter-Modell, Anhang G) lieferten basierend auf dem Alignment unter Einbeziehung der Sekundärstrukturen eine Bestätigung der phylogenetischen Position von *Planulina wuellerstorfi* innerhalb eines Clusters mit *Cibicides refulgens*, *Chilostomella ovoidea*, *Melonis affinis*.

### 3.5.2 Genetische Variabilität innerhalb der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 65 Sequenzen des 3' terminalen Abschnittes der SSU rDNA von Vertretern der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe aus Probenmaterial der östlichen Grönlandsee (ARK XIX/4a) bestimmt. Die Sequenzen stammten von Proben der Stationen 490-1 (253 m), 506-1 (1700 m), 508-1 (1062 m), 511-1 (276 m), 528-1 (3134 m), 529-1 (2958 m) und 531-1 (1982 m) aus den in Klammern angegebenen Wassertiefen. Diese 65 Sequenzen wurden zunächst in ClustalX in einem Alignment miteinander verrechnet und im Folgenden einer Berechnung eines phylogenetischen Stammbaumes mit der Maximum Likelihood-Methode unterzogen. Um diese Ergebnisse mit Daten aus internationalen Sequenz-Datenbanken abgleichen zu können und detaillierte Aufschlüsse über die Phylogenie der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe zu erhalten, wurden die Datenbank-Sequenzen von *Cibicides refulgens* (CRE514839), *Cibicides wuellerstorfi* (AJ93471),

*Cibicides lobatulus* (AJ93472) sowie der Außengruppe *Chilostomella ovoidea* (AY359154) in das Alignment mit einbezogen. Bei der weiteren Analyse aller Sequenzen, welche morphologisch der Art *Planulina wuellerstorfi* zugeordnet wurden, zeigten sich substantielle Unterschiede innerhalb der sequenzierten Abschnitte der SSU rDNA (Abb. 25). Die Bildung zweier verschiedener Gruppen auf Basis dieser Sequenzunterschiede ist deutlich erkennbar.

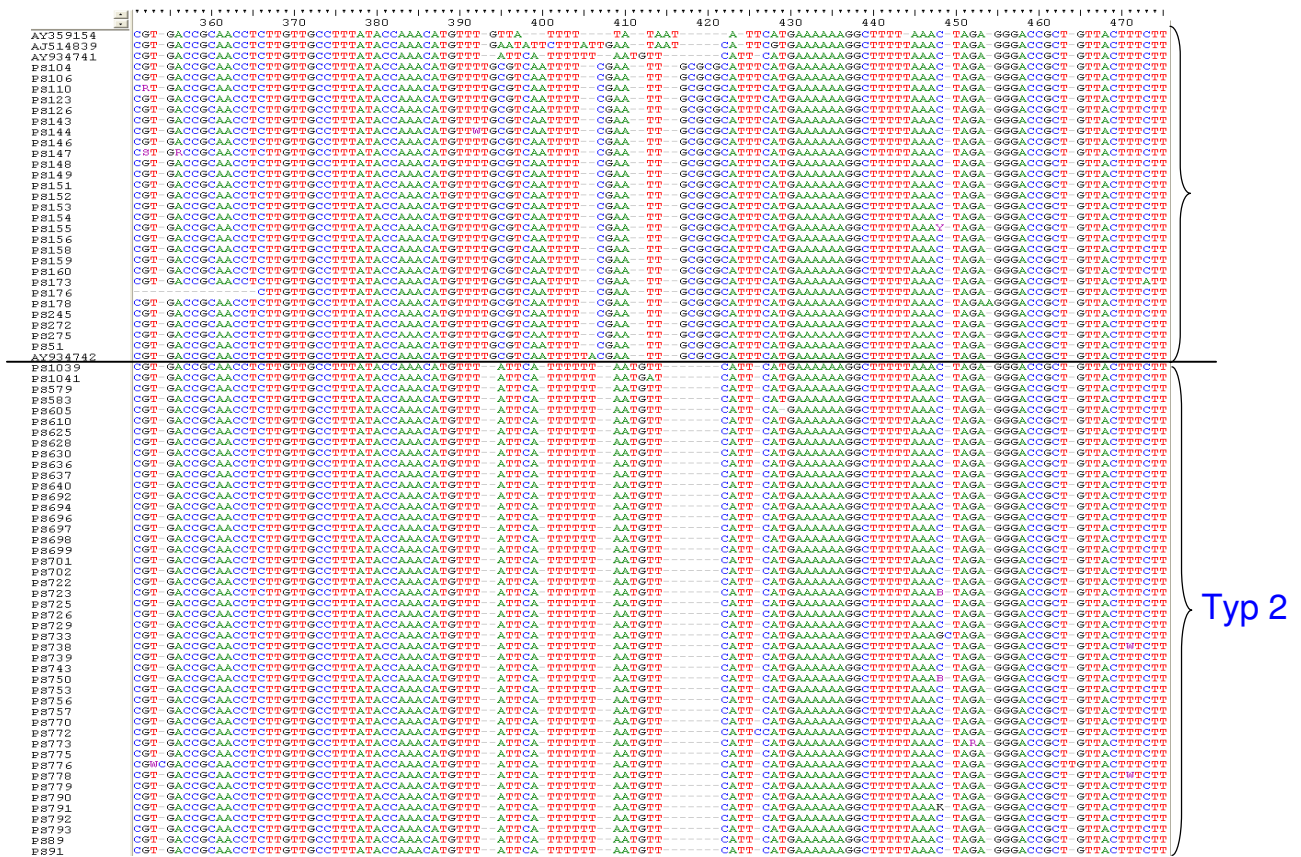


Abb. 25: Alignment von 65 Sequenzen von *Planulina wuellerstorfi*. Hellblaue Markierung: an den Positionen 392 – 423 des Alignments abweichende Sequenzen.

An den Positionen 392 – 423 des Alignments weichen 19 Sequenzen (hellblaue Markierung in Abb. 25) in ihrer SSU rDNA-Sequenz von den anderen in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Sequenzen ab. Diese zeigen hingegen hohe Similaritäten zu der Datenbank-Sequenz von *Cibicides lobatulus* (AY93472). Die Datenbank-Sequenz von *Cibicides wuellerstorfi* hingegen stimmt an diesen Positionen mit den 46 anderen durch die morphologische Bestimmung *Planulina wuellerstorfi* zugeordneten Sequenzen überein. Die Datenbank-Sequenz von *Cibicides refulgens* unterscheidet sich an diesen Positionen im Alignment sowohl deutlich von *Cibicides lobatulus* (AY93472) als auch von *Cibicides wuellerstorfi* (AY93472).

Die Sequenzen der 19 Individuen wiesen darüber hinaus Unterschiede an den Positionen 718 und 719 im Alignment auf. Sie besitzen an den Positionen 718 und 719

## Ergebnisse

---

zwei Insertionen mit Thymin-Basen (insgesamt acht Thymin-Basen), welche die Sequenzen der anderen 46 Individuen nicht aufweisen (sechs Thymin-Basen). Die Datenbank-Sequenzen von *Cibicides lobatulus* (AY93472) und *Cibicides refulgens* (CRE514839) zeigen an diesen Positionen ebenfalls diese Insertionen, während die Datenbank-Sequenz von *Cibicides wuellerstorfi* (AY93472) die beiden zusätzlichen Thymin-Basen nicht aufweist.

Der in Abb. 26 dargestellte phylogenetische Stammbaum wurde auf diesem Alignment basierend erstellt und reflektiert die Aufspaltung in zwei genetische Typen. Alle 19 Sequenzen mit abweichender Sequenz an den Positionen 392-423 sowie den Insertionen an den Positionen 718 und 719 werden in einem Cluster (Abb. 26 hellblau, Typ 1) zusammen gruppiert, welches getrennt ist von einem weiteren Cluster mit den 46 Sequenzen ohne diese Abweichungen (Abb. 26 dunkelblau, Typ 2). Die Datenbank-Sequenz von *Cibicides lobatulus* (AY93472) wird zum ersten Cluster gruppiert, wohingegen die Datenbank-Sequenz von *Cibicides wuellerstorfi* (AY93472) zum zweiten Cluster gruppiert wird. Als Außengruppe wurde *Chilostomella ovoidea* gewählt, welche ebenso wie *Cibicides refulgens* größere phylogenetische Unterschiede zu den beiden im Focus der Analyse stehenden Arten aufweist.



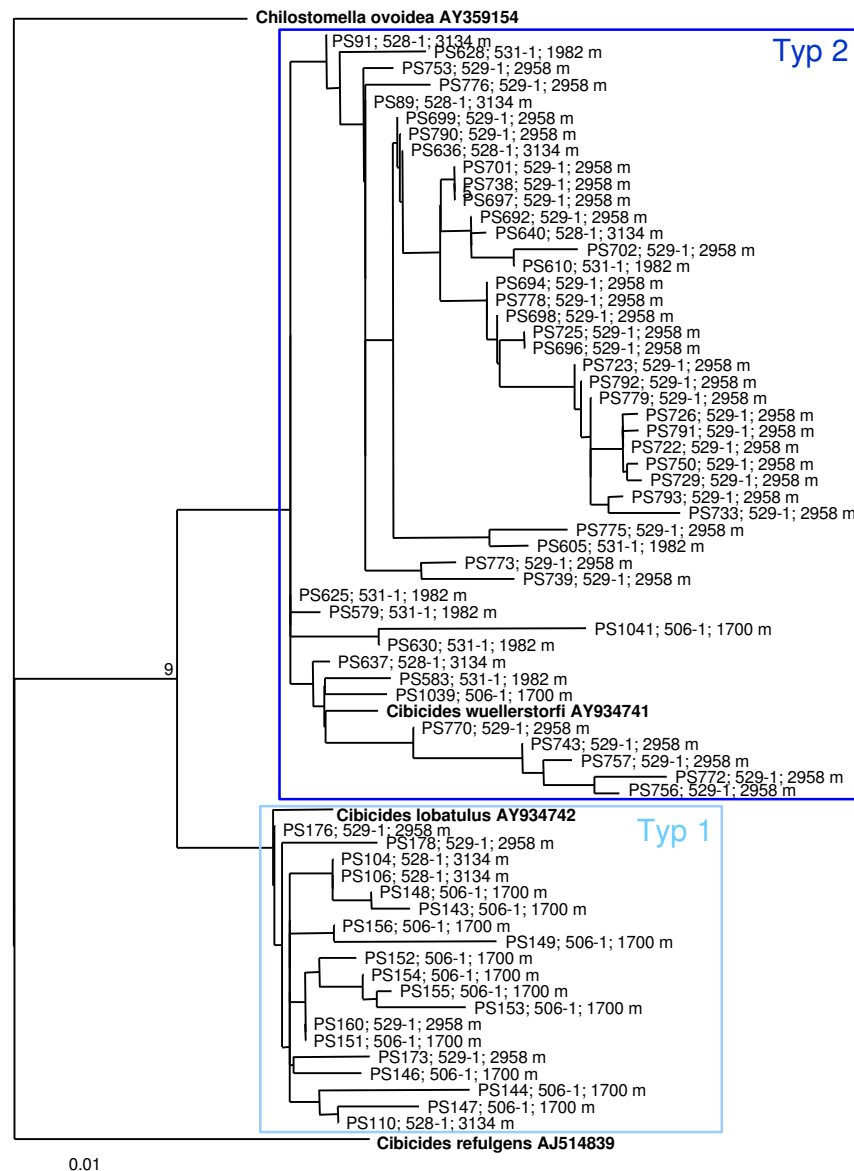


Abb. 26: Phylogenetischer Stammbaum (Maximum Likelihood; PHYML, GTR-Modell, Consensus-Stammbaum aus 10 Bootstrap-Replikaten) aller Sequenzen, welche aufgrund ihrer Morphologie als *Planulina wuellerstorfi* identifiziert werden konnten. Dunkelblauer Rahmen: keine Insertion, 6T; hellblauer Rahmen: Insertion, 8T; Außengruppe: *Chilostomella ovoidea*.

Die 19 Sequenzen des Typ 1, welche nicht mit der Datenbank-Sequenz von *Cibicides wuellerstorfi* sowie mit den Sequenzen des Typ 2 homolog sind, wurden aus Proben der folgenden Stationen isoliert (Wassertiefen in Klammern): 506-1 (1700 m), 528-1 (3134 m) sowie 529-1 (2958 m). Diese Stationen zeigen keine gemeinsamen Besonderheiten; die Station 506-1 liegt am Kontinentallhang, während die Stationen 529-1 und 528-1 in der tiefen Ostgrönlandsee liegen. Auf der Station 531-1 (1982 m) wurden nur SSU rDNA-Sequenzen des Typs 1 erhalten.

Die morphologischen Merkmale zu den erhaltenen Sequenzen sind im Anhang H aufgelistet. Daraus geht hervor, dass die als *Planulina wuellerstorfi* identifizierten Individuen anhand ihrer Morphologie eindeutig dieser Spezies zuzuordnen sind.

## Ergebnisse

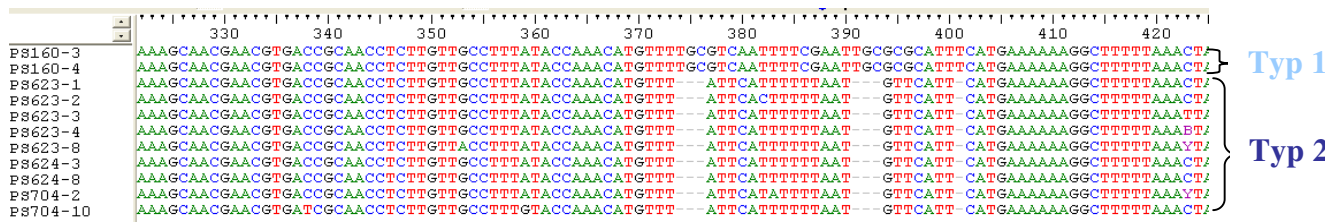
---

Wenn *Planulina wuellerstorfi* über mehrere nicht sequenz-homologe Kopien des Gens für die SSU rDNA verfügt, kann dies zu einer Überschätzung der Variabilität des Gens führen. Auf diese Möglichkeit wird detailliert in Kapitel 3.5.3 eingegangen.

### 3.5.3 Klonierung ausgewählter Individuen von *Planulina wuellerstorfi*

Es wurden vier Klonierungsexperimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob *Planulina wuellerstorfi* über nicht sequenz-homologe Kopien des Gens für die SSU rDNA verfügt. Die Proben PS623 (531-1, 1982 m), PS624 (531-1, 1982 m) und PS704 (529-1, 2958 m) wurden als Vertreter des Typs 1 (46 Sequenzen) ausgewählt und als Vertreter des Typs 2 (19 Sequenzen) wurde die Probe PS160 (529-1, 2958 m) kloniert. Mit den Ergebnissen der Sequenzierung wurde unter Einbeziehung der Sequenzen mehrerer Klone eines Individuums ein auf 1010 nt basierendes Alignment berechnet. Das Ergebnis dieses Alignments ist in Abb. 27 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Fällen verschiedene Klone eines Individuums die gleiche Sequenz auf dem amplifizierten Fragment der SSU rDNA aufweisen.

a)



b)

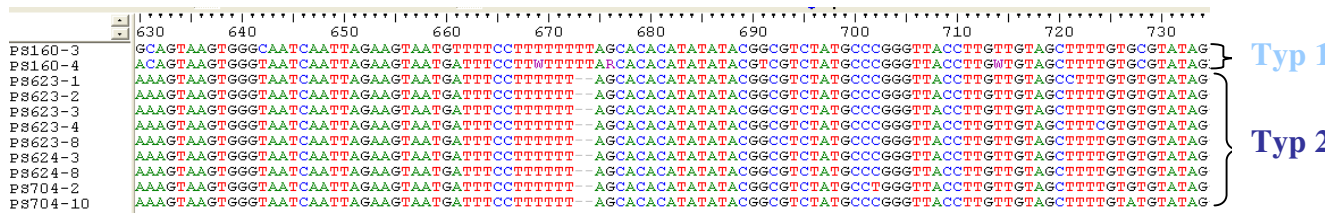


Abb. 27: Alignment der abweichenden Positionen repräsentativer Sequenzen der Typen 1 und 2, die im Alignment in Abb. 25 Sequenzunterschiede aufweisen. a) Position 373 – 401; b) Position 673 und 674.

Die in Abb. 27 dargestellten Alignment-Positionen a) 375 – 401 sowie die Positionen b) 673 und 674 wiesen die einzigen Unterschiede im Alignment auf. Diese Unterschiede reflektieren die beiden verschiedenen Sequenz-Typen (Typ1: PS160; Typ 2: PS623, PS624, PS704). Die Sequenzen verschiedener Klone eines Individuums zeigen jedoch identische Sequenzen. Es konnte also anhand dieses Klonierungsexperimentes erstmals nachgewiesen werden, dass *Planulina wuellerstorfi* lediglich eine funktionelle Kopie der SSU rDNA besitzt. Nach den Ergebnissen der Klonierungsexperimente liegen bei *Planulina wuellerstorfi* keine in ihrer Sequenz verschiedenen Gen-Kopien der SSU rDNA innerhalb eines Individuums vor.

Die gefundenen Sequenz-Unterschiede lassen sich also entweder mit einer fehlerhaften Zuordnung von *Planulina wuellerstorfi* oder mit dem Vorliegen zweier verschiedener Genotypen erklären. Wenn dies der Fall sein sollte, so stellt sich die Frage, ob diese beiden Genotypen sich auch morphologisch unterscheiden lassen.

### 3.6 Ergebnisse der morphometrischen Analyse

Die Daten „Erhaltungszustand“ und „Morphologie der letzten Kammer“ dienen hauptsächlich der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Individuen im ungefärbten Zustand. Die Wölbung der Ventralseite kann Hinweise auf das Mikrohabitat der Foraminifere liefern, da diese sich beim Schalenwachstum dem Substrat, auf welchem die Foraminifere angeheftet lebt, anpasst. Nach der Aufnahme dieser Daten wurde das Verhältnis von Durchmesser und Breite der letzten beiden

## Ergebnisse

Kammern sowie das Verhältnis von Durchmesser und Anzahl der Kammern im letzten Umgang bestimmt. Zusätzlich wurde das Verhältnis von der Breite der letzten beiden Kammern und Anzahl der Kammern im letzten Halbengang untersucht. Diese Verhältnisse wurden für beide anhand der genetischen Daten gefundenen Typen berechnet (1 hellblau, 2 dunkelblau). Die Mittelwerte dieser Verhältnisse sowie die Varianz und die Variationskoeffizienten sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21 : Berechnete Mittelwerte sowie Varianz und Variationskoeffizient dreier verschiedener Relationen morphologischer Parameter der beiden *Planulina wuellerstorfi*-Genotypen.

	Verhältnis morphologischer Parameter					
	Durchmesser/Breite der letzten beiden Kammern		Durchmesser/Anzahl der Kammern im letzten Umgang		Breite der letzten beiden Kammern/Anzahl der Kammern im letzten Halb-Umgang	
Mittelwert	2,48	2,49	1,17	0,62	1,04	0,47
Varianz	0,12	0,13	0,02	0,09	0,07	0,06
Variationskoeffizient [%]	4,99	5,08	2,09	14,26	6,89	11,79

Es wird deutlich, dass bei den genetisch unterscheidbaren Typen das Verhältnis vom Durchmesser zur Breite der letzten beiden Kammern nahezu identisch ist (2,48 bzw. 2,49). Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Typen wurden jedoch bei dem Verhältnis aus Durchmesser und Anzahl der Kammern im letzten Umgang (1,17 bzw. 0,62) sowie Breite der letzten beiden Kammern zu Anzahl der Kammern im letzten Halb-Umgang (1,04 bzw. 0,47) gefunden. Da es sich um Verhältniswerte handelt, wurden die Daten zunächst logarithmisch transformiert und im Folgenden anhand eines Shapiro-Wilk-Tests auf das Vorliegen einer Normalverteilung ( $p > 0.05$ ) getestet (Tabelle 22).

Tabelle 22 : Ergebnis des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung ( $p > 0,05$ ) der beiden logarithmisch transformierten relativen Messwerte der morphologisch untersuchten *Planulina wuellerstorfi*-Genotypen.

Transformierte Daten	Prüfgröße		Irrtumswahrscheinlichkeit	
	W		p	
In (Durchmesser/Anzahl der Kammern im letzten Umgang)	0,96852	0,96051	0,7327	0,13599
In (Breite der letzten beiden Kammern/Anzahl der Kammern im letzten Halbengang)	0,94400	0,95179	0,28500	0,06930

Anhand des Shapiro-Wilk-Tests ist deutlich erkennbar, dass die logarithmierten Daten normalverteilt ( $p > 0.05$ ) sind. Ein anschließender t-Test sollte klären, ob sich die beiden Parameter bei den zwei verschiedenen Typen signifikant voneinander unterscheiden (Tabelle 23).

Tabelle 23 : t-Test zur Ermittlung der Signifikanz der morphologischen Unterscheidung der beiden gefundenen genetischen Typen

	Mittelwert 1	Mittelwert 2	t-Wert	Freiheitsgrade	P	Signifikanz
In (Durchmesser/Anzahl der Kammern im letzten Umgang	0,151	- 0,573	7,212	62	0,000	***
In (Breite der letzten beiden Kammern/ Anzahl der Kammern im letzten Halb- Umgang)	0,004	- 0,849	7,854	61	0,000	***

Diese Analysen zeigen, dass sich die untersuchten Parameter bei den beiden unterschiedlichen Typen signifikant voneinander unterscheiden. Zur graphischen Darstellung wurden beide Parameter gegeneinander aufgetragen und die Datenpunkte typenspezifisch markiert (Abb. 28). Die unterschiedlichen Regressionsgleichungen bestätigen die signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Parametern.

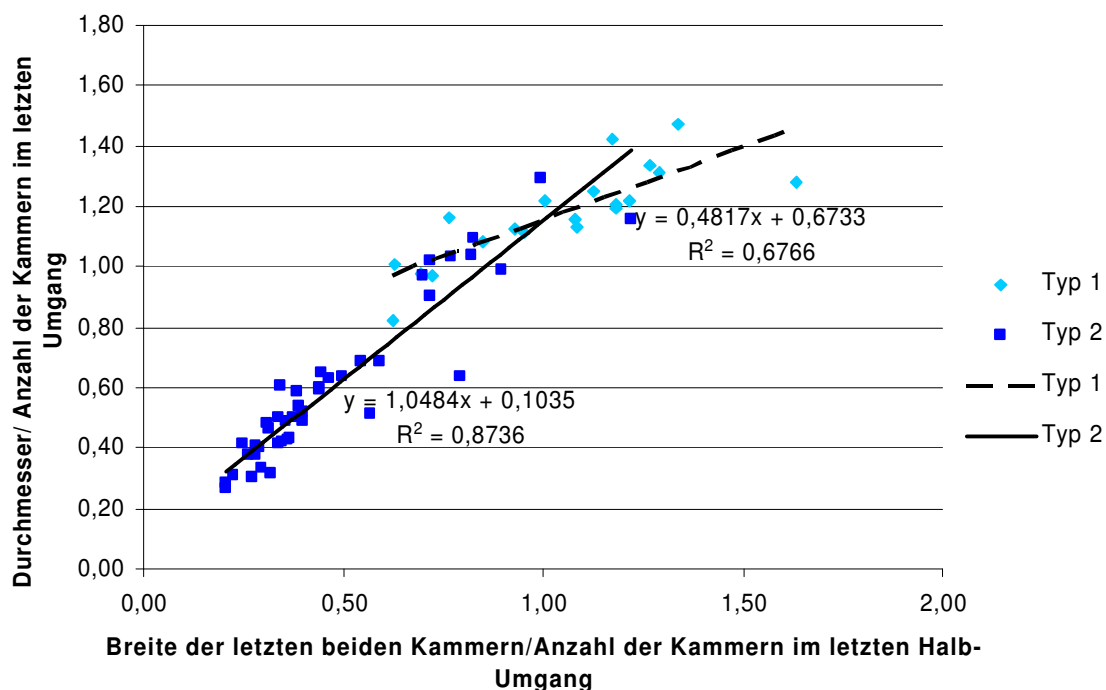
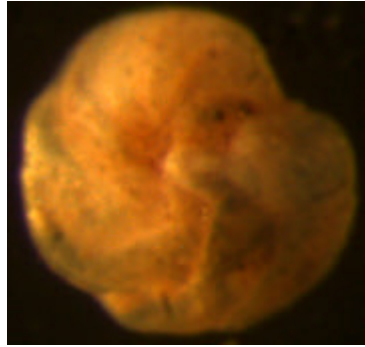


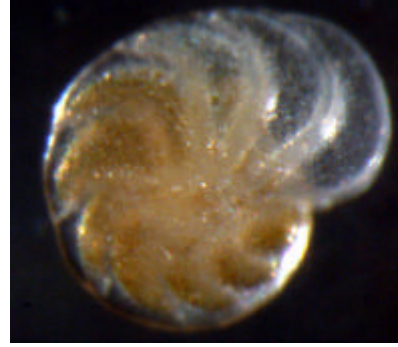
Abb. 28: Typenspezifische Verteilung der untersuchten Parameter Durchmesser/ Anzahl der Kammern im letzten Umgang aufgetragen gegen Breite der letzten beiden Kammern/ Anzahl der Kammern im letzten Halb-Umgang

Durch die morphometrischen Daten konnten die Ergebnisse der genetischen Analyse bestätigt werden. Die Typen 1 und 2 unterscheiden sich bezüglich ihrer Morphologie und ihrer SSU rDNA-Sequenz signifikant voneinander. Je ein Vertreter der beiden unterschiedlichen Morpho- und Genotypen, welche beide von der Station 529-1 in der tiefen Ostgrönlandsee (2958 m) isoliert wurden, sind in Abb. 29 dargestellt.

## Ergebnisse



Typ 1  
PS 160,  
529-1; 2958 m



Typ 2  
PS 793,  
529-1; 2958 m

Abb. 29: Morphologie der beiden unterschiedlichen gefundenen Typen. Als Vertreter des Typ 1 wurde PS 160 gewählt, während als Vertreter der Typ 2 PS 793 gewählt wurde. Beide Individuen stammten von Station 529-1.

Sowohl die Ergebnisse der genetischen als auch der morphometrischen Analyse deuten darauf hin, dass in der tiefen Grönlandsee zwei verschiedene Typen von *Planulina wuellerstorfi* vorkommen. Diese Ergebnisse werden von den Ergebnissen der morphometrischen Analyse der Totfauna der Stationen 529-1 (2958 m) und 531-1 (1982 m) unterstützt (Abb. 30). Der Durchmesser der untersuchten *Planulina wuellerstorfi*-Individuen zeigt auf der Station 529-1 (2958 m) zwei klare Maxima, während bei den Individuen der Station 531-1 (1982 m) lediglich ein Maximum erkennbar ist.

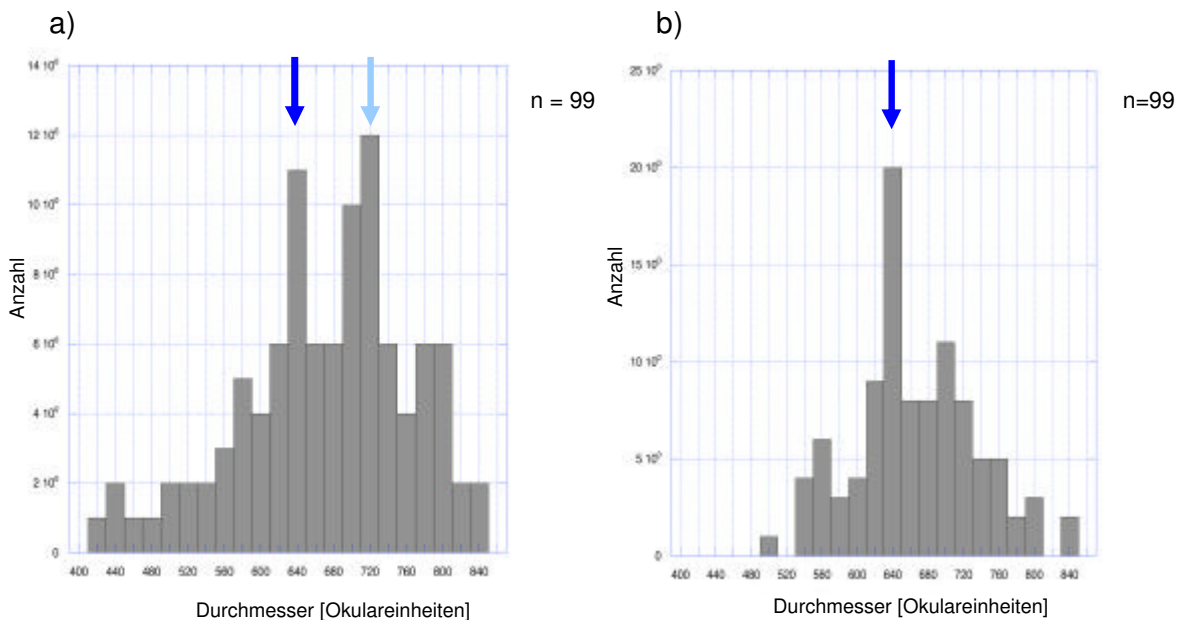


Abb. 30: Morphometrische Analyse von *Planulina wuellerstorfi*-Individuen der Totfauna der Stationen a) 529-1 und b) 531-1. Pfeile markieren die gefundenen maximalen Werte bei der Bestimmung des Durchmessers. Hellblau: Typ 1; Dunkelblau: Typ 2.

### 3.7 Berechnungen molekularer Substitutionsraten innerhalb der *Cibicidoidea/Cibicides/Planulina*-Gruppe auf Basis der SSU rDNA-Sequenzen

Auf der Basis molekularer Daten lassen sich Substitutionsraten berechnen. Hierzu wird angenommen, dass sehr nah verwandte Organismen vergleichbare Stoffwechselraten und DNA-Reparatur-Mechanismen besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden Sequenzen von *Planulina wuellerstorfi* sowie *Cibicides lobatulus* erhalten. In der EMBL-Datenbank sind ebenfalls je eine Sequenz von *Cibicides wuellerstorfi* und *Cibicides lobatulus* deponiert (Schweizer et al. 2005). Basierend auf Fossilfunden ist bekannt, dass sowohl *Planulina wuellerstorfi* als auch *Cibicides lobatulus* im mittleren Miozän (Langhian, 15.97-13.65 Mio. Jahre, Abb. 2, Seite 7) auftraten. Der letzte gemeinsame Vorfahre muss also bis vor ca. 15.97 Mio. Jahren existiert haben, und die Aufspaltung erfolgte zu diesem Zeitpunkt.

Basierend auf molekularen Daten wurden die Distanzen zwischen den Sequenzen von *Planulina wuellerstorfi* (PS 698), *Cibicides wuellerstorfi* (AY934741), *Cibicides lobatulus* (AY934742) und *Cibicides refulgens* (CRE514839) berechnet. Für die Berechnung der Distanz wurde das Kimura-2-Parameter-Modell gewählt, welches annimmt, dass Transitionen (zwischen Purin-Purin- (z.B. A -> G) oder Pyrimidin-Pyrimidin-Basen (z.B. C -> T)) wahrscheinlicher sind als Transversionen (zwischen Purin-Pyrimidin- (z.B. A -> C) oder Pyrimidin-Purin-Basen (z.B. T ->G)). So wurde eine Distanz-Matrix errechnet, welche in Tabelle 24 dargestellt ist.

Tabelle 24 : Paarweise Distanzen zwischen Vertretern der *Cibicides/Cibicidoidea/Planulina*-Gruppe berechnet nach dem Kimura-2-Parameter-Modell. Distanzmatrix basierend auf einem Alignment von 896 Positionen.

NCBI-Accession-Nr.	Paarweise Distanzwerte				
	<b>AY934741</b>	<b>PS698</b>	<b>AY934742</b>	<b>PS106</b>	<b>CRE514839</b>
<b>AY934741</b>	0	0,0054	0,0218	0,0246	0,0269
<b>PS698</b>	0,0054	0	0,0186	0,0175	0,0271
<b>AY934742</b>	0,0218	0,0186	0	0,006	0,0367
<b>PS106</b>	0,0246	0,0175	0,006	0	0,0408
<b>CRE514839</b>	0,0269	0,0271	0,0367	0,0408	0

Nach Li & Graur (1991) kann nach der Formel  $r = K/2T$  ( $K$  = paarweise Distanz zwischen zwei Sequenzen nach dem Kimura-2-Parameter-Modell und  $2T = T_1+T_2$ ) die Mutationsrate zwischen zwei Sequenzen ermittelt werden. Als  $T_1$  bzw.  $T_2$  wurden hier der Beginn bzw. das Ende des *Langhian*-Zeitalters ( $T_1=15.97$  Mio. Jahre,  $T_2=13.65$  Mio. Jahre, Abb. 2, Seite 14) gewählt. Nach der Addition ergibt sich für  $2T$  der Wert 29.62 Mio. Jahre. Die Berechnung der Evolutionsraten wurde sowohl für die Datenbank-Sequenzen als auch für je eine ermittelte repräsentative Sequenz von *Cibicides lobatulus* (PS 123) und *Planulina wuellerstorfi* (PS 698) vorgenommen

## Ergebnisse

(Tabelle 25). Die Sequenz von *Cibicides refulgens* wurde hier zunächst ausgenommen, da aus basierend auf Fossilfunden keine Divergenzzeit angegeben ist. Als Divergenzzeit wird die theoretische Zeitspanne bezeichnet, die zur reproduktiven Isolation führt.

Tabelle 25 : Berechnete Evolutionsraten von Vertretern der *Cibicides/Cibicidoides/ Planulina*-Gruppe nach Li & Graur (1991). Angaben in Substitutionen/Position/Jahr basierend auf einem Alignment von 896 Positionen

NCBI-Accession-Nr.	Berechnete Substitutionsraten			
	AY934741	PS698	AY934742	PS123
AY934741	-	$0,182 \times 10^{-9}$	$0,736 \times 10^{-9}$	<b><math>0,831 \times 10^{-9}</math></b>
PS698		-	$0,628 \times 10^{-9}$	$0,591 \times 10^{-9}$
AY934742			-	$0,203 \times 10^{-9}$
PS106				-

Basierend auf diesen Daten wurde die Divergenzzeit für die Sequenz CRE514839 von *Cibicides refulgens* abgeschätzt. Die ermittelten paarweisen Distanzen ergaben bei allen berechneten Sequenzen zu CRE514839 die größten Entfernungen. Daraus lässt sich schließen, dass die Substitutionsrate mindestens so hoch ist wie die höchste mit Hilfe der bekannten Daten ermittelte Substitutionsrate. Es wurde also die höchste ermittelte Substitutionsrate als Rate zwischen *Cibicides wuellerstorfi/Cibicides lobatulus* und *Cibicides refulgens* ( $0,831 \times 10^{-9}$  Substitutionen/ Position/Jahr) eingesetzt, wobei davon ausgegangen werden kann, dass der tatsächliche Wert aufgrund der höheren berechneten paarweisen Distanzen noch höher liegt als die berechneten 32.5 Mio. Jahre. Es kann außerdem aufgrund der hohen paarweisen Distanzwerte angenommen werden, dass sich die Linien *Cibicides refulgens/Cibicides wuellerstorfi* sowie *Cibicides refulgens/Cibicides lobatulus* vor der Trennung von *Cibicides lobatulus* und *Cibicides wuellerstorfi* getrennt haben, also vor mehr als 15.97 Mio y (=T1). Somit ergibt sich für  $T_{wuellerstorfi/refulgens}$  eine Divergenzzeit von mindestens 16.53 Mio. Jahre und für  $T_{lobatulus/refulgens}$  eine Divergenzzeit von mindestens 30.53 Mio. Jahre. Diese Aufspaltung wird auch von dem auf den paarweisen Distanzwerten basierenden phylogenetischen Stammbaum bestätigt (Abb. 31).



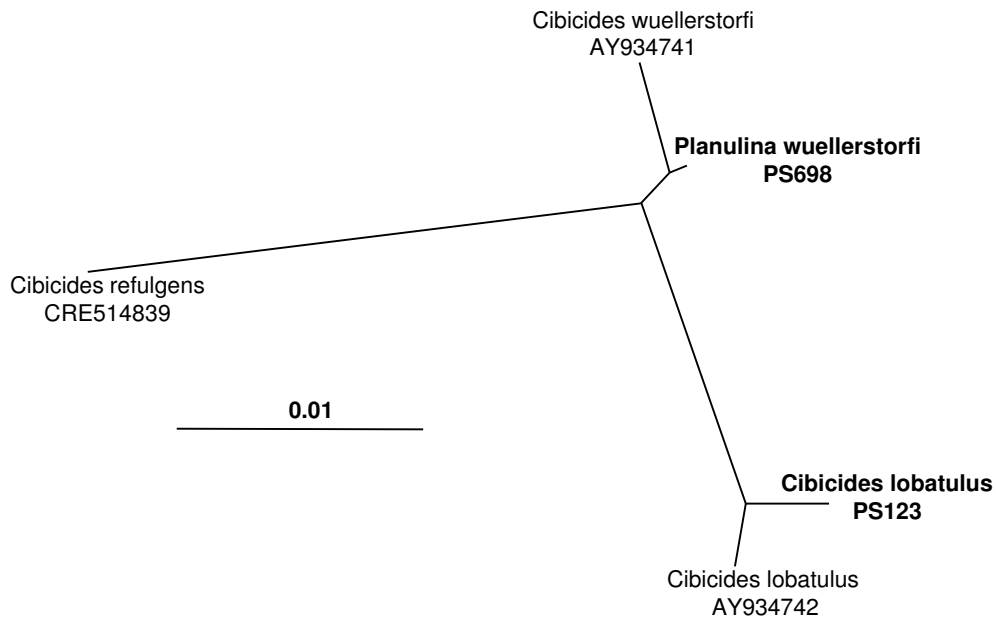


Abb. 31: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf den genetischen Distanzen (DNADIST, PHYLIP, ungewurzelt) zur Darstellung der Phylogenie innerhalb der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe.

### 3.8 Auswertung der SSU rDNA-Sequenzen von *Cibicides lobatulus*

Mit den aufgrund morphologischer Analyse *Cibicides lobatulus* zugeordneten Sequenzen (Tabelle 26) sowie je einem Vertreter des Typs 1 (PS 160) und 2 (PS 793) von *Planulina wuellerstorfi* wurde ein Alignment und ein darauf basierender phylogenetischer Stammbaum nach der Maximum-Likelihood-Methode berechnet (Abb. 32) Die Datenbank-Sequenzen von *Cibicides lobatulus* (AY93472) und *Cibicides wuellerstorfi* (AY93471) wurden ebenfalls in die Berechnung des Stammbaumes einbezogen.

Tabelle 26 : In der vorliegenden Arbeit von Proben der Reise ARK XIX/4a erhaltene SSU rDNA-Sequenzen, die *Cibicides lobatulus* zugeordnet werden konnten

Probenbezeichnung	Station
PS51	PS 490-1; 253 m
PS123	PS 508-1; 1062 m
PS126	PS 508-1; 1062 m
PS158	PS 506-1; 1700 m
PS245	PS 511-1; 276 m
PS246	PS 511-1; 276 m
PS247	PS 511-1; 276 m
PS272	PS 511-1; 276 m
PS275	PS 511-1; 276 m

## Ergebnisse

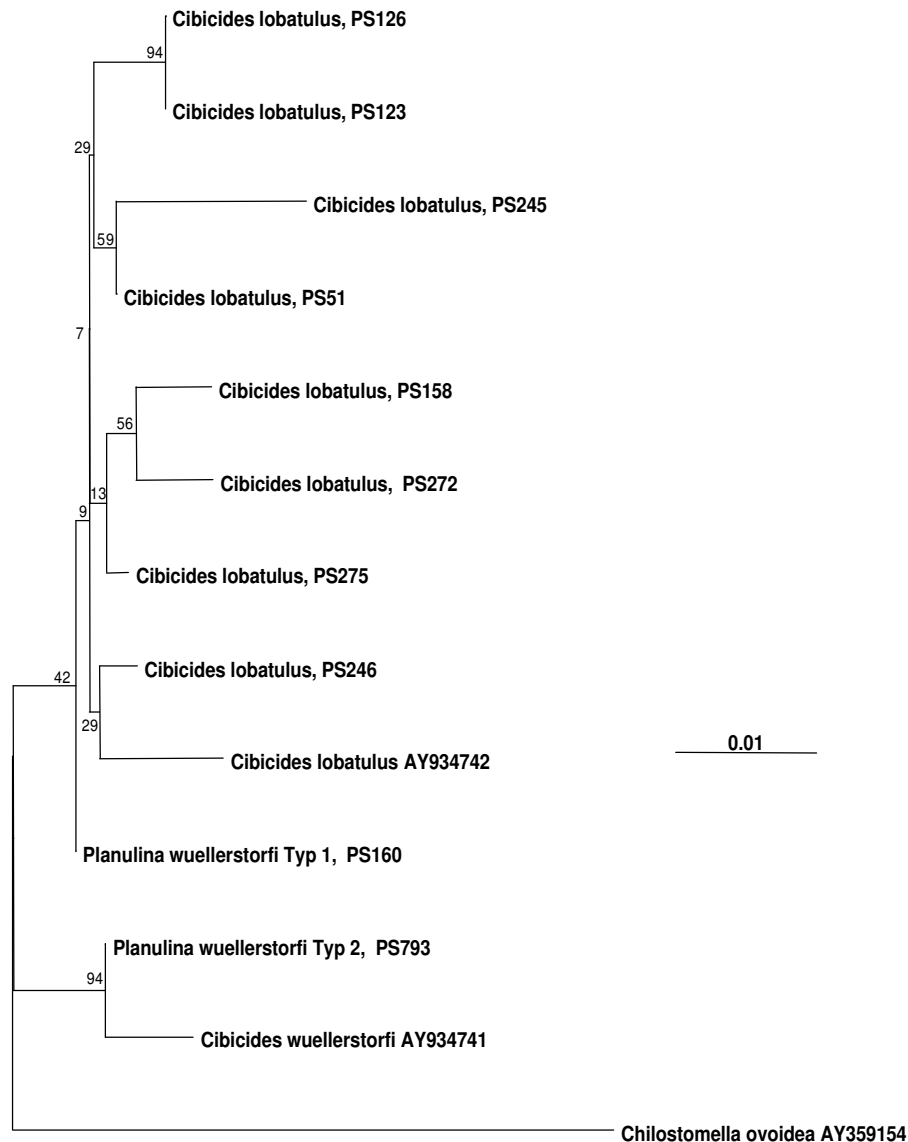


Abb. 32: Phylogenetischer Stammbaum (Maximum Likelihood, PHYML, GTR, 100 bootstrap-Läufe) der Sequenzen der *Cibicides lobatulus* zugeordneten Sequenzen, je einer Sequenz der als *Planulina wuellerstorfi* Typ 1 und Typ 2 identifizierten Individuen und den Datenbank-Sequenzen von *Cibicides lobatulus* und *Cibicides wuellerstorfi*. Als Außengruppe wurde *Chilostomella ovoidea* gewählt.

Der phylogenetische Stammbaum in Abb. 32 zeigt eine deutliche Abgrenzung der Außengruppe *Chilostomella ovoidea* von den Sequenzen der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe. Innerhalb dieser Gruppe zeigt sich eine weitere deutliche Aufspaltung. Die als *Cibicides lobatulus* identifizierten Individuen werden in ein Cluster mit der Datenbank-Sequenz von *Cibicides lobatulus* gestellt. Hiervon deutlich getrennt steht die Datenbank-Sequenz von *Cibicides wuellerstorfi* (AY934741) sowie die *Planulina wuellerstorfi*-Sequenz des Typs 2. Die Sequenz des Typs 1 wird im phylogenetischen Stammbaum abseits der *Cibicides lobatulus*-Sequenzen, jedoch noch deutlicher getrennt von der Sequenz des Typs 1 sowie *Cibicides wuellerstorfi* (AY934741) positioniert.

Es ist also möglich, dass die als Typ 1 identifizierten Individuen tatsächlich der Art *Cibicides lobatulus* zuzuordnen sind. Dafür sprechen die hohen Signifikanzwerte der statistischen Analyse. Dagegen spricht, dass PS 160 als Vertreter des Typs 1 von *Planulina wuellerstorfi* im phylogenetischen Stammbaum abseits der Sequenzen von *Cibicides lobatulus* gruppiert wird. Dies ist auch im phylogenetischen Stammbaum der Abb. 26 zu erkennen, in welchem die Datenbank-Sequenz von *Cibicides lobatulus* innerhalb des gleichen Clusters, jedoch abseits der als Typ 1 identifizierten Individuen gestellt wird. In diesem Fall ist auch eine starke morphologische Variabilität ebenso wie ein sehr variabler Lebensraum (253 m – 3134 m) von *Cibicides lobatulus* postulierbar, da sie morphologisch in diesem Fall leicht mit *Planulina wuellerstorfi* zu verwechseln ist (z.B. PS 160, Abb. 29) und in der östlichen Grönlandsee bis in 3134 m Tiefe parallel zu *Planulina wuellerstorfi* lebend nachweisbar ist.

### 3.9 Phylogenetische Einordnung von *Cribr stomoides* sp. anhand der SSU rDNA-Sequenz

Es wurden aus den Proben der Reise ARK XIX/4a nicht nur von Vertretern der *Cibicides/ Cibicoides/Planulina*-Gruppe, sondern auch von anderen benthischen Foraminiferen-Arten Sequenzen des 3´terminalen Fragmentes der SSU rDNA erhalten (Tabelle 27).

Tabelle 27 : Zusammenstellung der SSU rDNA-Sequenzen der neben nachgewiesenen Vertretern der *Cibicides/Cibicoides/Planulina*-Gruppe erhaltenen Arten

Proben-Bezeichnung	Art	Ordnung	Station /Tiefe
PS121	<i>Dentalina</i> sp.	<i>Rotaliida</i>	508-1/1062 m
PS122	<i>Melonis affinis</i>	<i>Rotaliida</i>	508-1/1062 m
PS124	<i>Triloculina</i> sp.		508-1/1062 m
PS125	<i>Osangulariella umbonifera</i>	<i>Rotaliida</i>	508-1/1062 m
PS141	<i>Dentalina</i> sp.	<i>Rotaliida</i>	506-1/1700 m
PS170	<i>Cribr stomoides</i> sp.	<i>Textulariida</i>	529-1/2958 m
PS171	<i>Cribr stomoides</i> sp.	<i>Textulariida</i>	529-1/2958 m
PS210	<i>Cribr stomoides</i> sp.	<i>Textulariida</i>	531-1/1982 m
PS231	<i>Cribr stomoides</i> sp.	<i>Textulariida</i>	511-1/276 m
PS234	<i>Cribr stomoides</i> sp.	<i>Textulariida</i>	511-1/276 m
PS586	<i>Oridosalis umbonatus</i>	<i>Rotaliida</i>	531-1/1982 m
PS594	<i>Pyrgo</i> sp.		531-1/1982 m

Erstmalig wurden Sequenzen der SSU rDNA der Foraminiferen-Spezies *Dentalina aphelis*, *Oridosalis umbonatus* sowie *Cribr stomoides* sp. erhalten.

Ein phylogenetischer Stammbaum der Sequenzen, welche auf den Stationen 529-1 (2958 m) und 511-1 (276 m) von *Cribr stomoides* sp. erhalten wurden, zeigt die klare Einordnung der SSU rDNA-Sequenzen bei den *Textulariida* (Abb. 33). In diesem

## Ergebnisse

Stammbaum werden *Textularia* sp. und *Trochammina* sp. als Schwester-Taxa zu *Cribrostomoides* sp. positioniert. Basierend auf dem phylogenetischen Stammbaum kann keine Anpassung dieser Art an die Tiefe vermutet werden, da innerhalb des Clusters keine klare Zuordnung der Sequenzen zu den verschiedenen Stationen an erfolgt.

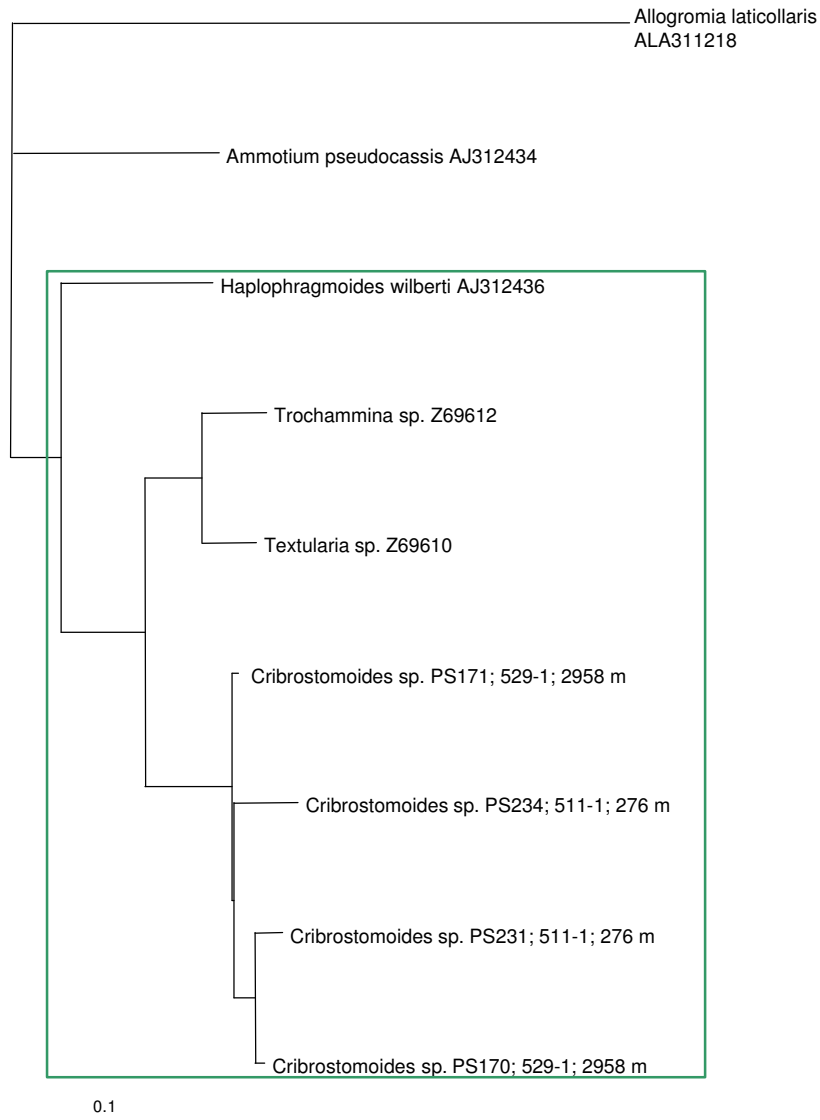


Abb. 33: Phylogenetische Einordnung von *Cribrostomoides* sp. grüner Rahmen: *Textulariida*. Stammbaum berechnet mit PAUP\*; Maximum Likelihood; GTR-Modell.

### 3.10 Ergebnisse der Amplifikation und Sequenzierung der SSU rDNA aus Sediment-Proben der Reisen RV MARION DUFRESNE 122, FS SONNE 164 und FS POLARSTERN ARK XVIII/1a

Aus Sedimentproben der Reise MD122 wurden lediglich Sequenz-Fragmente von allogromiiden oder astrorhiziden Foraminiferen von bis zu 200 nt Länge erhalten (Tabelle 28). Die Länge dieser Fragmente ist nicht ausreichend für phylogenetische Rekonstruktionen. Bei den Reisen SO164 sowie ARK XVIII/1a war der Amplifikationserfolg noch geringer; aus den Proben von ARK XVIII/1a wurden keine

positiven Amplifikate erhalten (Tabelle 28). Eine detaillierte Diskussion der möglichen Ursachen hierfür erfolgt in Kapitel 4.8.

Tabelle 28 : Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse (PCR und Sequenzierung) des aus den verschiedenen untersuchten Seegebieten stammenden Probenmaterials.

Bezeichnung der Ausfahrt	Durchgeführte Analysen			
	Anzahl der DNA-Extraktionen	Anzahl durchgeführter PCRs	Positive Amplifikationen	Positive Sequenzen
MD122 Timor See (Indonesien/Australien)	167	334	26	26
SO 164 (Karibik)	222	444	2	2
ARK XVIII/1a Dänemark-Straße	338	676	0	0

### 4 Diskussion

#### 4.1 Artenverteilung der Foraminiferen-Fauna der östlichen Grönlandsee

In der vorliegenden Arbeit wurden auf den Stationen des Schelfs der östlichen Grönlandsee hauptsächlich die benthischen Foraminiferen-Arten *Cibicides lobatulus*, *Psammosphaera sp.* und *Cribrostomoides sp.* nachgewiesen. Von den Stationen der Tiefsee konnten *Planulina wuellerstorfi* und *Oridorsalis umbonatus* isoliert werden. Dies entspricht der Artenverteilung, die von Altenbach (1992b) gefunden wurde.

Altenbach (1992b) beschreibt *Cibicides lobatulus* als typischen Vertreter größerer arktischer Schelfsedimente. *Cribrostomoides crassimargo* wird als charakteristisch für tonigere Schelfsedimente angegeben (Altenbach 1992b). *Cribrostomoides subglobosum* wird von Altenbach (1992b) als bevorzugt in flacheren Hangregionen mit pelagischer Sedimentation lebend charakterisiert. Thies (1991) und Altenbach (1992b) fanden, dass deren ökologische Nische in steileren Hangregionen von *Reophax sp.* besetzt wird. *Oridorsalis umbonatus* wurde von Green (1960) als Charakterart der abyssalen Foraminiferen-Fauna beschrieben. *Planulina wuellerstorfi* ist nach Weinelt et al. (2001) ebenfalls eine Charakterart der oligotrophen Tiefsee.

Ziel der vorliegenden Arbeit war nicht eine quantitative Charakterisierung der Artverteilung der benthischen Foraminiferen-Fauna in der östlichen Grönlandsee, sondern die molekularbiologische und morphometrische Charakterisierung benthischer rotaliider Taxa mit Focus auf *Planulina wuellerstorfi*. Daher wurde keine detaillierte Faunenanalyse der untersuchten Stationen vorgenommen.

#### 4.2 Ausbeute der PCR und Sequenzierung

Die vergleichsweise geringe Ausbeute an Sequenzen gemessen an der Gesamtanzahl der isolierten Foraminiferen ist methodisch begründet. Ein wichtiger Punkt ist die äußerst geringe DNA-Menge, die aufgrund der Fragestellung aus einzelnen Foraminiferen-Zellen isoliert wurde.

Ein weiteres wesentliches Kriterium ist auch die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Individuen im ungefärbten Zustand. Auch wenn ein Individuum die in Kapitel 1.3.1 beschriebenen charakteristischen Merkmale aufwies und aufgrund dieser als lebend klassifiziert wurde, führte dies nicht in jedem Fall zu einem positiven Amplifikationsergebnis und ein positives Amplifikationsergebnis bedeutete nicht notwendigerweise eine erfolgreiche Sequenzierung. Letzteres kann mit den

notwendigen Aufreinigungen der erfolgten PCRs erklärt werden, da diese Aufreinigungen auch immer einen Verlust an DNA bedeuten. Sie sind jedoch notwendig, um unerwünschte Reaktionskomponenten zu entfernen, welche die nachfolgende Reaktion stören könnten.

Auch die Nährstoffsituation an den Untersuchungsstandorten muss berücksichtigt werden. Die meisten Studien, in welchen molekularbiologische Analysen benthischer Foraminiferen durchgeführt wurden, basieren auf Probenmaterial, welches entweder im Flachwasser oder in Auftriebsgebieten gewonnen wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die oligotrophe, stark saisonal beeinflusste ostgrönländische Tiefsee als Untersuchungsgebiet beprobt. Die im Focus der vorliegenden Arbeit stehende Spezies *Planulina wuellerstorfi* ist jedoch eine an geringe Stoff-Flüsse angepasste Foraminiferen-Art; es kann also angenommen werden, dass die ostgrönländische Tiefsee ein bevorzugtes Habitat dieser Spezies ist. Allerdings sind die Siedlungsdichten lebender *P. wuellerstorfi*-Individuen hier jedoch vermutlich nicht vergleichbar mit den Siedlungsdichten anderer Foraminiferen-Spezies in Auftriebsgebieten oder im Flachwasser, wo höhere Nährstoffkonzentrationen und damit höhere Siedlungsdichten benthischer Foraminiferen zu erwarten sind. Untersuchungen auf sieben Stationen nördlich und südlich der Dänemarkstraße ergaben basierend auf mit Bengal-Rot gefärbten Proben der Reise ARK XVIII/1a Anteile lebender *Planulina wuellerstorfi*-Individuen von 0.36% - 8.8% der Totfauna (Andrea Lorenz, pers. Mitteilung). Eine Ausnahme bildete die Station PS62/020-1 mit 20%. Diese Siedlungsdichten sind mit der saisonalen Eisbedeckung in diesen Regionen erklärbar. Ähnliche Verhältnisse können auch für die östliche Grönlandsee angenommen werden.

Durch diese verschiedenen Faktoren ist der geringe Amplifikations- und Sequenzierungserfolg in der vorliegenden Arbeit zu erklären.

### **4.3 Genetische Variabilität innerhalb der *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*-Gruppe**

Einige der morphologisch als *Planulina wuellerstorfi* bestimmten Individuen zeigten deutliche Sequenz-Unterschiede im Bereich der Alignment-Positionen 392 – 423. Außerdem sind bei diesen Sequenzen an den Positionen 718 und 719 zwei zusätzliche Thymin-Basen eingefügt. Es gibt mehrere Interpretationsansätze für die Erklärung der gefundenen genetischen Variabilitäten.

Eine Möglichkeit zur Erklärung dieses Ergebnisses besteht in der fehlerhaften morphologischen Bestimmung der Typ 1-Individuen als *Planulina wuellerstorfi*. Dies würde die signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen der morphometrischen Analyse erklären, welche in diesem Fall Typ 1 als *Cibicides lobatulus* und Typ 2 als

## Diskussion

---

*Planulina wuellerstorfi* klassifiziert. Auch die phylogenetische Analyse der Sequenzen der morphologisch als *Cibicides lobatulus* (Abb. 32, Seite 81) identifizierten Individuen untermauern die Vermutung, dass es sich bei den Individuen des Typ 1 um *Cibicides lobatulus* handelt. Diese Vermutung wird auch bekräftigt durch die hohe Similarität der Sequenzen des Typs 1 zu den Sequenzen von *Cibicides lobatulus*. Wenn nun eine fehlerhafte Zuordnung der Typ 1-Individuen vorliegt und es sich hierbei um *Cibicides lobatulus*-Individuen handeln sollte, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Art erstmals lebend bis in Tiefen von 3134 m in Koexistenz mit *Planulina wuellerstorfi* nachgewiesen.

Gegen das Vorkommen zweier verschiedener Arten auf den tiefen Stationen der östlichen Grönlandsee (528-1, 529-1, 531-1) sprechen die bisherigen Literaturdaten und die Lebensweise von *Cibicides lobatulus* und *Planulina wuellerstorfi*. Sowohl von *Planulina wuellerstorfi* als auch von *Cibicides lobatulus* ist bekannt, dass beide Arten eine epibenthische Lebensweise aufweisen (Corliss 1985). *Planulina wuellerstorfi* wurde jedoch auch in der Infauna nachgewiesen (Rathburn & Corliss 1994; Wollenburg & Mackensen 1998). Bisher gibt es allerdings keine Hinweise in der Literatur, dass beide Arten außer in einem schmalen Überschneidungsbereich bei ca. 1000 m Tiefe zusammen auftreten. *Cibicides lobatulus* wird in der östlichen Grönlandsee bis ca. 1000 m Tiefe gefunden (Altenbach 1992b), während *Planulina wuellerstorfi* als typische Tiefsee-Spezies (ab 1000 m Tiefe) angesehen werden kann. Sowohl von Altenbach (1992b) als auch von Holbourn & Henderson (2002) wird *Cibicides lobatulus* als neritische Art charakterisiert (< 1000 m). Altenbach (1992b) beschreibt *Cibicides lobatulus* weiterhin als typischen Vertreter arktischer Schelfsedimente. Die in der vorliegenden Arbeit aufgrund morphologischer Merkmale als *Cibicides lobatulus* identifizierten Individuen wurden auf den Stationen 490-1, 506-1, 508-1 und 511-1 gefunden, welche einem Tiefenbereich von 253 m bis 1700 m entsprechen. Diese Ergebnisse stehen also in Einklang mit den Literaturdaten. Lutze & Salomon (1987) und Thies (1991) zeigten eine klare Korrelation größerer benthischer Foraminiferen mit der Tiefe und dem Kohlenstoff-Fluss. Es ist unwahrscheinlich, dass die Verteilung der Foraminiferen-Arten direkt abhängig von der Tiefe ist. Eine indirekte Abhängigkeit vom hydrostatischen Druck ist möglich, da dieser linear mit der Tiefe zunimmt. Bei Bakterien sind barophile Arten bekannt, welche erst ab einem bestimmten hydrostatischen Druck kultivierbar sind und welche auch in großen Tiefen isoliert wurden (Li et al. 1998; Yayanos 1986). Bei Foraminiferen sind bisher keine barophilen Arten bekannt; dahingehende Untersuchungen wurden vermutlich wegen des hohen experimentellen Aufwandes bisher nicht durchgeführt. Die von Lutze & Salomon (1987) sowie Thies (1991) gefundene Korrelation mit dem organischen Kohlenstoff-Fluss erscheint für die Verteilung der beiden verschiedenen Foraminiferen-Spezies *Cibicides lobatulus* und *Planulina wuellerstorfi* wahrscheinlich.



Weinelt et al. (2001) beschreiben einen charakteristischen Grenzwert von 2 - 2.5g  $C_{org}/m^2/Jahr$ , welcher in der Grönlandsee in 1200 – 1600 m Tiefe erreicht wird und die an oligotrophe Tiefseebedingungen angepasste Foraminiferen-Gemeinschaft von der an höhere organische Kohlenstoff-Flüsse angepassten neritischen Gemeinschaft trennt. Die morphologisch als *Cibicides lobatulus* identifizierten Individuen konnten bei der vorliegenden Untersuchung nicht tiefer als 1700 m gefunden werden. Diese Tiefe stimmt mit der Tiefe des von Weinelt et al. (2001) beschriebenen Grenzwertes fast überein.

Altenbach (1992b) charakterisiert *Cibicides lobatulus* als auf Hartsubstraten, Algen und größeren sessilen und vagilen Metazoen, oft in Bereichen grober Sedimente mit starker Strömung siedelnde Foraminiferen-Art. Die Gehäuse von *Cibicides lobatulus* können aufgrund des von dieser Art bevorzugten Habitats in größere Wassertiefen umgelagert werden. Dies erklärt noch nicht das Vorkommen von lebenden *Cibicides lobatulus*-Individuen in diesen großen Tiefen (was ja durch die Detektion der SSU rDNA-Sequenz impliziert ist), da in der Literatur lediglich von leeren Gehäusen, also toten Foraminiferen die Rede ist, welche sich nicht mehr aktiv festheften und somit einem physikalischen Transport entziehen können. DNA wird durch ubiquitär vorkommende DNAsen sehr schnell zersetzt. Ein enzymatischer oder bakterieller Abbau des organischen Materials wird nach dem Tod des Organismus wesentlich schneller vonstatten gehen als der Transport durch Strömungen und die erneute Sedimentation des leeren Gehäuses. Basierend darauf kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei der amplifizierten DNA um genetisches Material aus einem lebenden Organismus handelt.

Es kann weiterhin aufgrund der ökologischen Präferenzen sowie der Konkurrenz durch besser angepasste Spezies an den niedrigen Kohlenstoff-Fluss in der Tiefsee (*Planulina wuellerstorfi*) vermutet werden, dass *Cibicides lobatulus* in diesen großen Tiefen nicht lebend vorkommt. Die in ihrer SSU rDNA Sequenz abweichenden Typ 1 identifizierten Individuen wurden aus vergleichsweise großen Tiefen (ca. 2000 m und ca. 3000 m) isoliert. In diesen Tiefen ist eine Koexistenz der beiden Arten aus den angeführten Gründen nicht sehr wahrscheinlich und bisher in der Literatur auch nicht belegt.

Es kann als sicher angesehen werden, dass die Sequenz-Unterschiede nicht auf methodischen Fehlern (z.B. falsch eingebaute Nucleotide bei der PCR, Sequenzierfehler) beruhen, da sie reproduzierbar bei mehreren Individuen detektiert werden konnten. Auch die Amplifikation bakterieller DNA kann ausgeschlossen werden, da mit speziell für die Amplifikation benthischer rotaliider Foraminiferen entwickelten Primern gearbeitet wurde. Auch hätte eine Amplifikation bakterieller DNA innerhalb des Foraminiferen-Gehäuses in der Detektion verschiedener Sequenzen

## Diskussion

---

resultiert, die bei mehreren verschiedenen Individuen vermutlich nicht identisch gewesen wäre.

Wenn hingegen davon ausgegangen wird, dass die morphologische Bestimmung richtig war, dann deuten die Sequenzunterschiede auf zwei verschiedene genetische Typen von *Planulina wuellerstorfi* hin. Dies wird insbesondere durch die deutliche morphologische Unterscheidbarkeit von Typ 1 und Typ 2 von *Cibicides lobatulus* gestützt. Eine morphologische Variation innerhalb *Planulina wuellerstorfi* wurde bereits mehrfach festgestellt und mit unterschiedlichen Mikrohabitat-Präferenzen erklärt (Schwager 1866; Rathburn & Corliss 1994). Die morphologische Variabilität kann jedoch auch durch eine genetische Variabilität innerhalb einer Art erklärt werden.

Die abweichenden Sequenzen könnten durch das Phänomen der kryptischen Speziation innerhalb von *Cibicides/Cibicidoides/Planulina* erklärt werden.

Die Folge einer kryptischen Speziation wäre, dass sich zwei Arten allein durch morphologische Merkmale nicht mehr oder nur noch sehr schwer unterscheiden lassen; eine Unterscheidung der beiden „kryptischen“ Arten kann hier nur noch durch die Sequenzierung der DNA erfolgen. Kryptische Speziation ist für diverse planktonische Organismen (Foraminiferen, Coccolithophoriden, Übersicht Einleitung, Tabelle 3) bereits belegt. Erstmals wurde eine kryptische Speziation bei *Globigerinoides ruber* mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen (Darling et al. 1997; de Vargas et al. 1997). Auch für die als kosmopolitisch vorkommend geltende planktonische Foraminiferen-Art *Orbulina universa* konnten de Vargas et al. (1999) eine kryptische Speziation belegen. Für *Orbulina universa* wird angenommen, dass es sich um eine Speziation entlang von trophischen Gradienten handelt. De Vargas et al. (1999) definierten drei verschiedene Genotypen von *Orbulina*, von welchen angenommen wird, dass diese an verschiedene Nährstoffkonzentrationen in verschiedenen Regionen des Atlantiks angepasst sind. Es wurden auch auf einer Station mehrere parallel vorkommende *O. universa*-Genotypen gefunden; die ökologische Toleranz der verschiedenen Genotypen geht also ineinander über.

Da basierend auf SSU rDNA-Untersuchungen und phylogenetischen Analysen angenommen wird, dass sich die planktonischen Foraminiferen aus den kalkschaligen benthischen Foraminiferen entwickelt haben (Darling et al. 1997), ist eine kryptische Speziation innerhalb der benthischen Foraminiferen durchaus denkbar. Planktonische Foraminiferen sind innerhalb ihres Lebensraumes deutlich stärkeren ökologischen Schwankungen unterworfen als benthische Foraminiferen. Auch sind planktonische Foraminiferen mobil durch die Meeresströmungen, mit welchen sie bewegt werden; benthische Foraminiferen bewegen sich auch aktiv entlang chemischer Gradienten fort (Duijnsteet et al. 2003). Der Aktionsradius einer benthischen Foraminifere ist allerdings nicht vergleichbar mit dem einer planktonischen Foraminifere. Da planktonische

Foraminiferen also stärkeren Variationen im Lebensraum unterworfen sind als benthische Foraminiferen, kann angenommen werden, dass diese Organismen auch eine generell höhere Mutationsrate aufweisen als benthische Foraminiferen, die wiederum in kryptischer Speziation resultieren kann. So ist es erklärbar, dass bei fast allen planktonischen Foraminiferen-Arten kryptische Speziation als Anpassung an bestimmte abiotische Bedingungen stattfand; extrem starke morphologische Änderungen sind aber aufgrund der gleich bleibenden Lebensweise (Ernährung, Fortbewegung im Pelagial) nicht notwendig. Nach der Detektion der unterschiedlichen Genotypen erfolgte eine erneute morphologische Begutachtung (SEM-Analyse, de Vargas et al. (1999)) der *O. universa*-Individuen, und es wurden Unterschiede in der Porengröße der Schale zwischen den einzelnen Genotypen gefunden. Mit Hilfe der genetischen Untersuchungen wurde hier also ein weiteres Merkmal zur genaueren morphologischen Bestimmung einer Art erhalten. Höhere Mutationsraten durch starke Änderungen der abiotischen Umweltfaktoren wie z.B. eine erhöhte UV-Strahlung könnten allenfalls genetische Variationen bei benthischen Foraminiferen des Flachwassers erklären. In der aphotischen Zone ist dieser Mechanismus der Selektion sicherlich nicht von Relevanz. Hydrostatischer Druck, Nahrungsangebot, die Intensität von Bodenströmungen und unterschiedliche Präferenzen bei der Wahl des Mikrohabitats können hier als wahrscheinlichere Selektionsfaktoren angesehen werden. Die beiden verschiedenen Sequenz-Typen wurden in der vorliegenden Arbeit auf drei Stationen detektiert: 506-1, 528-1 und 529-1. Diese liegen zwischen 1700 m und 3134 m Tiefe. Die Proben der Station 531-1 stammen aus 1982 m Tiefe; hier wurde jedoch lediglich der dominierende Sequenz-Typ 2 nachgewiesen. Sowohl oberhalb (Station 506-1; 1700 m) als auch unterhalb (Station 529-1; 2958 m und 528-1; 3134 m) dieser Tiefe wurden beide Typen nachgewiesen. Der hydrostatische Druck erscheint daher unwahrscheinlich als entscheidender Selektionsfaktor.

Das Nahrungsangebot ist auf allen untersuchten Stationen vergleichbar. Auch die laterale Bodenströmung sollte auf ein und derselben Station gleich sein. Unterschiedliche Mikrohabitat-Präferenzen könnten eine Erklärung für das Vorliegen kryptischer Speziation innerhalb *Cibicides/Cibicidoides/Planulina* darstellen. Es ist bekannt, dass *Planulina wuellerstorfi* auch im Sediment lebt (Rathburn & Corliss 1994). Anpassungen von Foraminiferen und aktive Wanderungen zu den für sie optimalen Umweltbedingungen (z.B. Sauerstoff-Konzentration) innerhalb des Sediments konnten bereits für einige Foraminiferen-Arten nachgewiesen werden (Duijnsteet et al. 2003). In diesem Fall sind die Foraminiferen unterschiedlichen Umweltbedingungen in ihren Mikrohabitaten ausgesetzt. Unterschiedliche Mikrohabitat-Präferenzen an einem Standort können also eine mögliche Erklärung für das Vorliegen verschiedener Sequenz-Typen an einem Standort sein.

## Diskussion

---

Basierend auf den Ergebnissen der genetischen Analyse wurde eine morphometrische Analyse der sequenzierten *P. wuellerstorfi*-Individuen anhand der im Vorfeld der DNA-Extraktion aufgenommenen Fotos durchgeführt. Außerdem wurde die Totfauna der Stationen 529-1 und 531-1 einer detaillierten morphologischen Analyse der gefundenen *Planulina wuellerstorfi*-Individuen unterzogen. Die Analyse erbrachte Hinweise auf zwei Morphotypen auf der Station 529-1, welche sich durch die Verhältnisse von Durchmesser/Kammerzahl im letzten Umgang sowie Breite der letzten beiden Kammern/Anzahl der Kammern im letzten Halb-Umgang signifikant voneinander unterscheiden lassen. Auf der Station 531-1 wurde dagegen bei detaillierter morphometrischer Analyse nur ein Morphotyp detektiert. Diese Ergebnisse können ebenfalls mit Mikrohabitat-Präferenzen erklärt werden. Es ist denkbar, dass epibenthisch lebende *P. wuellerstorfi* direkt in der lateralen Bodenströmung leben und der Nahrungserwerb durch Filtration hier gegenüber den unmittelbar auf der Sedimentoberfläche lebenden *P. wuellerstorfi* erleichtert ist. So ist eine höhere Kammerzahl im äußeren Umgang auf eine höhere Wachstumsrate zurückzuführen.

Morphologisch wurden beide Typen als *P. wuellerstorfi* identifiziert. Es scheint also innerhalb von *Planulina wuellerstorfi* eine genetische Variabilität zu bestehen, welche sich nach detaillierter morphometrischer Analyse auch in der Morphologie widerspiegelt. Eine Anpassung an die vorliegenden Umweltbedingungen kann zu verschiedenen Morphologien führen; die Anheftung an Steine oder Muscheln und die Exposition in die laterale Bodenströmung kann ebenfalls zur Variation der Morphologie führen.

Das Vorliegen morphologisch unterschiedlicher Generationen einer Art (durch sexuelle/asexuelle Reproduktion) kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse weitestgehend ausgeschlossen werden, da diese innerhalb eines relativ konservierten Gens wie dem für die SSU rRNA die gleiche Sequenz zeigen müssten.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bereits für verschiedene planktonische Foraminiferen- und Coccolithophoriden-Arten publiziert (de Vargas et al. 1999; de Vargas et al. 2004; Saez et al. 2003). Saez et al. (2003) analysierten das *tufA*-Gen verschiedener Coccolithophoriden-Arten. Bei *Calcidiscus leptoporus* wurden verschiedene Genotypen gefunden, die den verschiedenen Morphotypen entsprachen. Jedoch wurde noch ein weiterer genetischer Typ detektiert und nach detaillierter morphometrischer Analyse konnte ein weiteres Merkmal zur Unterscheidung der verschiedenen Typen gefunden werden.

Diese Untersuchungen zeigen also deutlich, dass genetische Analysen von zentraler Bedeutung für die Charakterisierung von Arten und für die Detektion kryptischer Speziation sind.

#### 4.4 Genetische Analyse hinsichtlich des Vorliegens verschiedener SSU rDNA-Kopien innerhalb eines Individuums von *Planulina wuellerstorfi*

In der vorliegenden Arbeit wurden Klonierungsexperimente mit amplifizierter SSU rDNA von insgesamt vier Individuen von *Planulina wuellerstorfi* durchgeführt. Innerhalb eines Individuums von *Planulina wuellerstorfi* wurden auf einer Fragmentlänge von ca. 1000 nt keine Sequenzvariationen innerhalb der Klone eines Individuums detektiert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass *Planulina wuellerstorfi* lediglich eine funktionelle Sequenz des SSU rRNA-Gens besitzt.

Im Gegensatz dazu wurde für die LSU rDNA-Sequenz eine Variabilität von bis zu 5.2% auf einem 415 nt langen Fragment innerhalb eines Individuums von *Ammonia* sp. nachgewiesen (Holzmann et al. 1996a). Die Autoren nehmen an, dass es sich hier um verschiedene funktionelle Kopien der LSU rDNA handelt.

Da das Gen für die gesamte ribosomale RNA sehr konserviert ist und z.B. bei *Homo sapiens* auf fünf verschiedenen Chromosomen oder beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* in mehreren hundert Wiederholungen auf einem Chromosom (Futuyma 1990) vorliegt, ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein einzelliger Organismus nicht-funktionelle Kopien eines Gens mit derart zentraler Bedeutung enthält. Die Analyse einer variablen Region des Gens verschiedener Spezies könnte diese hohen Sequenz-Variabilitäten erklären; eine solche Variabilität innerhalb eines Individuums ist jedoch nicht anders als mit verschiedenen funktionellen Kopien erklärbar.

#### 4.5 Phylogenetische Einordnung der SSU rDNA-Sequenzen von *Cribr stomoides* sp.

Erstmalig wurden Sequenzen der benthischen Foraminiferen-Gattungen *Dentalina* sp., *Pyrgo* sp., *Oridorsalis umbonatus* und *Cribr stomoides* sp. erhalten. Morphologisch wurde die Gattung *Dentalina* sp. im Arktischen Ozean in Tiefen von 900 m – 4000 m nachgewiesen (Altenbach 1992b); *Pyrgo* sp. kommt ebenfalls ubiquitär vor. Von *Cribr stomoides* sp. sind im arktischen Ozean zwei verschiedene Arten bekannt. Es handelt sich hier einerseits um *Cribr stomoides crassimargo*, welche einen Lebensraum von ca. 200 – 300 m besiedelt sowie um *Cribr stomoides subglobosum*, welche als charakteristische Tiefsee-Art bekannt ist (600 – 3000 m, (Altenbach 1992b)). Der berechnete phylogenetische Stammbaum in Abb. 33, Seite 83 ist nicht in Übereinstimmung mit diesen Literaturangaben. Die in den Stammbaum integrierten Sequenzen stammen von zwei verschiedenen Stationen (529-1; 2958 m und 511-1; 276 m). Sequenzen beider Stationen werden zusammen gruppiert; es ist keine klare

Tiefenzonierung erkennbar. Eine Erklärungsmöglichkeit ist die morphologische Anpassung an unterschiedliche Habitate (Schelf und Tiefsee) oder an Mikrohabitate, im Fall von *Cribrostomoides* sp. ohne genetische Modifikation.

#### 4.6 Molekulare Substitutionsraten innerhalb der Gruppe *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*

Es wurden Sequenzen von *Cibicides lobatulus* und *Planulina wuellerstorfi* nachgewiesen. Die Entstehung beider Arten wird basierend auf fossilen Funden auf das mittlere Miozän datiert (Holbourn & Henderson 2002). Der Aufspaltungszeitpunkt im mittleren Langhian (15.97 – 13.65 Mio Jahre) ist aus dem auf Fossilfunden basierenden Datensatz bekannt. Anhand der paarweisen Distanzen zwischen diesen beiden Arten wurden für die SSU in der vorliegenden Arbeit Substitutionsraten bestimmt, die mit  $0.6 - 0.8 \times 10^{-9}$  Substitutionen/Position/Jahr in der gleichen Größenordnung liegen wie die von Pawlowski et al. (1997) berechneten Substitutionsraten für *Ammonia* ( $0.5 \times 10^{-9}$  Substitutionen/Position/Jahr). Basierend auf diesen Substitutionsraten kann eine molekulare Uhr angenommen werden, wie es bereits in einer Studie von de Vargas et al. (1997) für die planktonischen Foraminiferen-Familien *Globigerinidae* und *Globorotaliidae* durchgeführt wurde. Auf der Basis einer solchen molekularen Uhr lassen sich Divergenz-Zeiten von Arten berechnen. Diese Berechnungen wurden in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um die Divergenzzeit von *Cibicides refulgens* von *Planulina wuellerstorfi* und *Cibicides lobatulus* abschätzen zu können. Die Substitutionsrate  $r$  lässt sich nur berechnen, wenn die Divergenzzeit zweier Arten ( $T_1$  und  $T_2$ ) aus dem fossilen Datensatz bekannt ist. Dies ist für *Cibicides refulgens* nicht der Fall, also wurde aufgrund der höheren paarweisen Distanzwerte die maximale Substitutionsrate zwischen *Cibicides lobatulus* und *Planulina wuellerstorfi* angenommen. Diese Annahme ist legitim, da davon ausgegangen werden kann, dass bei so eng verwandten Organismen der Metabolismus und die DNA-Reparatur-Mechanismen vergleichbar sind, der Wert kann aber nur als Schätzung fungieren. Bei der Ermittlung der Divergenzzeit für *Cibicides refulgens* ergeben sich auf der Basis dieser Annahme Divergenz-Zeiten von 16.53 Mio. Jahre – 30.53 Mio Jahre, was eine enorme Varianz bedeutet. Diese Varianz illustriert das generelle Problem bei der Berechnung von Divergenz-Zeiten auf Basis molekularer Uhren.

Die SSU rDNA wird in vielen Studien zur Berechnung von Divergenz-Zeiten und Evolutionsraten genutzt. Es gibt allerdings bisher keine Hinweise, dass die SSU rDNA für die Annahme einer molekularen Uhr geeignet ist (Syvanen 2002). Die Annahme einer konstanten Evolution kann ebenfalls als sehr kritisch angesehen werden. Es ist weiterhin bekannt, dass es eine Heterogenität der Mutationsraten zwischen verschiedenen Nucleotid-Positionen, verschiedenen Genen, verschiedenen Regionen des Genoms sowie verschiedener Genome (z.B. Kern-Genom, Plastiden-Genom,

Mitochondrien-Genom) innerhalb einer Organismen-Linie gibt (Hillis et al. 1996; Li & Graur 1991). Hillis et al. (1996) zählen mehrere Faktoren auf, welche die Annahme einer universellen molekularen Uhr erschweren. Es werden Unterschiede im Metabolismus, welcher die Mechanismen zur Reparatur der DNA einschließt, unterschiedliche Exposition zu Mutagenen sowie Unterschiede in den Generationszeiten verschiedener Taxa genannt. Es wird angenommen, dass die Substitutionsrate innerhalb verschiedener Foraminiferen-Linien schwanken kann (Pawlowski et al. 1997); innerhalb einer sehr engen taxonomischen Gruppe (z.B. *Cibicides/Cibicidoides/Planulina*) sind diese Raten vermutlich konstant. Daher schlug Li (1993) eine „lokale“ molekulare Uhr vor, die lediglich auf eng miteinander verwandte Taxa angewandt werden kann, da diese sich nicht so stark in den oben genannten Aspekten unterscheiden wie weiter entfernt verwandte Taxa. Weiterhin werden für die Kalibrierung der molekularen Uhr sowie die Berechnung von Substitutionsraten wie auch in der vorliegenden Arbeit meist paarweise Distanzen innerhalb einer phylogenetischen Linie verwendet (de Vargas et al. 1997). Diese Daten sind jedoch nicht unabhängig voneinander, da sie auf Gemeinsamkeiten der Sequenzen innerhalb des phylogenetischen Stammbaums basieren (Lynch & Jarrell 1993). Auch die Kalibrierung anhand des fossilen Datensatzes ist problematisch, da idealerweise exakt datierte Fossilien genau vor und nach der Trennung zweier Linien vorliegen müssten, was jedoch schwierig ist und zur ungenauen Datierung der Trennung der Arten führen kann (Marshall 1990).

### 4.7 Molekulare und Morphologische Daten

Heute werden für die Taxonomie von Foraminiferen sowohl morphologische als auch molekulare Daten verwendet. Ein wichtiges Kriterium für genetische Analysen ist, ob das untersuchte Merkmal genug Variation zeigt, um die wissenschaftliche Fragestellung beantworten zu können. So sind z.B. die *rbcL*-Sequenzen der Coccolithophoriden-Arten *Emiliana huxleyi* und *Gephyrocapsa oceanica* gleich (Fujiwara et al. 2001); die Sequenzierung und phylogenetische Analyse der großen Untereinheit der RUBISCO (*rbcL*) kann in diesem Fall also nicht zur Unterscheidung der beiden Arten herangezogen werden. Molekulare Analysen von planktonischen Foraminiferen und Coccolithophoriden haben bei diversen Arten kryptische Speziation gezeigt (Tabelle 3, Seite 12); aufgrund molekularer Daten konnten neue morphologische Merkmale gefunden werden, um diese vorher kryptischen Spezies voneinander zu unterscheiden (de Vargas et al. 1999; Saez et al. 2003). Die Entwicklung der molekularen Systematik hat die morphologische Systematik nicht widerlegt; sie kann aber z.B. bei mangelnder oder nicht unmittelbar erkennbarer morphologischer Variation eines Merkmals wie im Fall von *Orbulina universa* (de

## Diskussion

---

Vargas et al. 1999) oder *Calcidiscus leptoporus* (Saez et al. 2003) zu klären helfen, ob es sich um eine oder um zwei verschiedene Arten handelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein solch kombinierter Ansatz zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse bei einer rotaliiden Foraminifere, welche an oligotrophe Tiefsee-Bedingungen angepasst lebt, durchgeführt. Es wurden Hinweise auf kryptische Speziation innerhalb *Cibicides/Cibicidoides/Planulina* gefunden.

### **4.8 Diskussion der Analyse des Probenmaterials der Fahrten RV Marion Dufresne 122, FS SONNE 164, FS POLARSTERN ARK XVIII/1a**

Neben dem Probenmaterial der Reise ARK XIX/4a stand auch Probenmaterial von drei weiteren Ausfahrten (RV Marion Dufresne 122, FS SONNE 164, FS POLARSTERN ARK XVIII/1a) zur Verfügung. Dieses Probenmaterial wurde mit molekularbiologischen Methoden untersucht, allerdings erbrachten diese Amplifikationen keine positiven Resultate. Während der Reise ARK XIX/4a wurden die Proben unmittelbar nach der Probenahme mit kaltem Oberflächenwasser gesiebt und danach entweder sofort weiteren Analysen (Dokumentation der Morphologie, DNA-Extraktion, PCR) unterzogen oder bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die positiven Amplifikations-Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Behandlung nach der Probennahme zur Erhaltung positiver Amplifikate beigetragen hat. Sowohl während SO164 als auch während ARK XVIII/1a wurden die Proben nach der Probenahme entweder sofort ungesiebt eingefroren (SO164) oder ebenso wie die Proben der Reise ARK XIX/4a behandelt (ARK XVIII/1a). Die schlechten Amplifikations-Ergebnisse dieser Reisen haben also vermutlich andere Ursachen. Die Proben der Reise MD122 wurden nicht unmittelbar nach der Probennahme bei -20°C gelagert. Diese Proben wurden zwar ebenfalls mit Oberflächenwasser gesiebt; dieses Oberflächenwasser hatte allerdings 25-30°C (Timor See, Tropen). Es ist anzunehmen, dass die DNA der Foraminiferen durch DNAsen durch die verlängerte Lagerung bei hohen Temperaturen zerstört wurde. Auch das Sieben mit warmem Oberflächenwasser könnte für die an Temperaturen von 2 – 4°C angepassten Tiefsee-Foraminiferen zur Zerstörung der DNA geführt haben. Effekte des hydrostatischen Drucks können nahezu ausgeschlossen werden, da bei der Analyse der Proben der Reise ARK XIX/4a Foraminiferen aus ca. 3000 m Tiefe positive Amplifikate lieferten.

*Planulina wuellerstorfi* lebt als epibenthische Foraminiferen-Art, welche sich durch Suspensionsfiltration ernährt, angepasst an erhöhte Bodenströmungen (Altenbach 1992b). Für den Ostgrönlandstrom, der durch die Dänemarkstraße in den tiefen Nordatlantik fließt, werden Strömungsgeschwindigkeiten von 4 – 30 cm/sec angegeben (Aagaard & Coachman 1968; Bersch 1995; Foldvik et al. 1988). Diese hohen



Strömungsgeschwindigkeiten und eine Erodierung der Sedimentoberfläche könnte eine Rolle spielen. *Planulina wuellerstorfi* lebt jedoch bevorzugt epibenthisch fest angeheftet an z.B. Steinen, sollte also hohe Strömungsgeschwindigkeiten tolerieren können. Untersuchungen auf sieben Stationen nördlich und südlich der Dänemarkstraße ergaben basierend auf mit Bengal-Rot gefärbten Proben der Reise ARK XVIII/1a Anteile lebender *Planulina wuellerstorfi*-Individuen von 0.36% - 8.8% der Totfauna (Andrea Lorenz, pers. Mitteilung). Eine Ausnahme bildete die Station PS62/020-1 mit 20%. Diese geringen Siedlungsdichten können den geringen Amplifikationserfolg erklären.

Die Proben der Reise SO164 erbrachten ebenfalls keine positiven Amplifikate. Für das Untersuchungsgebiet dieser Reise, der Karibischen See, werden basierend auf Bengal-Rot gefärbten Proben Siedlungsdichten benthischer Foraminiferen von 20-30 lebenden Individuen pro 10 cm<sup>2</sup> angegeben (W. Kuhnt, pers. Mitteilung). Es handelt sich bei der Karibischen See um ein extrem oligotrophes Seegebiet mit einer Primär-Produktion von

0-0.4 kg C/m<sup>2</sup>/y (SeaWIFS Satellite Data). Die im Focus dieser Arbeit stehende benthische Foraminiferen-Spezies *Planulina wuellerstorfi* lebt angepasst an oligotrophe Bedingungen in der Tiefsee (Weinelt et al. 2001). Auch ist *Planulina wuellerstorfi* durch ihre epibenthische Lebensweise und die Ernährung durch Suspensionsfiltration eher auf laterale Bodenströmungen und die Resuspension organischen Materials aus dem Sediment angewiesen als auf eine starke benthopelagische Kopplung und damit vertikalen Transport der Nahrung. Es ist also anzunehmen, dass diese Art in der tiefen Karibischen See zu finden ist. Die Siedlungsdichten wurden aufgrund von Färbungen der Proben mit Bengal-Rot und anschließender Zählung erhalten. Diese Methode der Bestimmung der Lebendfauna ist in der Literatur nicht ohne Kritik (Altenbach 1992b; Bernhard 2000; Bernhard et al. 2004; Lutze & Altenbach 1991). Bernhard et al. (2004) verglichen die Ergebnisse der Färbung mit Bengal-Rot mit dem immunologischen Farbstoff CMFDA Cell Tracker Green und fanden, dass lediglich 50-70% der Zellen, welche mit Bengalrot gefärbt waren, auch mit Cell Tracker Green gefärbt werden konnten. Die Autoren schlossen daraus, dass auf Bengal-Rot-Zählungen basierende Siedlungsdichten eventuell eine Überschätzung um 30-50% darstellen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der Inhibierung der PCR nicht mit einem Farbstoff zur Unterscheidung lebender und toter Foraminiferen gearbeitet. Wenn basierend auf den Ergebnissen von Bernhard et al. (2003) lediglich 50% der für die Karibik angegebenen Siedlungsdichte angenommen und die schwierige Selektion lebender Individuen aus ungefärbten Proben berücksichtigt wird, ist der geringe Amplifikationserfolg verständlich.

### 5 Literatur

Aagaard, K. and L.K. Coachman 1968. The East Greenland Current north of Denmark Strait, Part I. *Arctic* 21: 181-200.

Altenbach, A.V. 1992a. Short-Term Processes and Patterns in the Foraminiferal Response to Organic Flux Rates. *Marine Micropaleontology* 19: 119-129.

Altenbach, A.V. 1992b. Verbreitungsmuster benthischer Foraminiferen im Arktischen Ozean und in glazialen und interglazialen Sedimenten des Europäischen Nordmeeres. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Altenbach, A.V., U. Pflaumann, R. Schiebel, A. Thies, S. Timm, and M. Trauth 1999. Scaling percentages and distributional patterns of benthic foraminifera with flux rates of organic carbon. *Journal of Foraminiferal Research* 29: 173-185.

Bandy, O.L. 1967. Benthic Foraminifera as environmental indices, p. 1-29. In [eds.], O.L. Bandy and J.C. Ingle *Paleoecology*. American Geological Institute short Course Lecture Notes.

Bernhard, J.M. 2000. Distinguishing live from dead foraminifera: Methods review and proper applications. *Micropaleontology* 46: 38-46.

Bernhard, J.M. 2003. Potential Symbionts in Bathyal Foraminifera. *Science* 299: 861.

Bernhard, J.M., D.R. Ostermann, J.K. Blanks, and D. Williams 2004. Stable isotopic signature and abundance comparison using two methods to identify live benthic foraminifera: a test between Rose Bengal and Cell tracker Green. 8th international conference on paleoceanography. 5-9-2004.

Bersch, M. 1995. On the circulation of the Northeastern North Atlantic. *Deep-Sea Research I* 42: 1583-1607.

Boltovskoy, E., D.B. Scott, and F.S. Medioli 1991. Morphological Variations of Benthic Foraminiferal Tests in Response to Changes in Ecological Parameters - A Review. *Journal of Paleontology* 65: 175-185.

Chandler, G.T., D.F. Williams, H.J. Spero, and X.D. Gao 1996. Sediment microhabitat effects on carbon stable isotopic signatures of microcosm-cultured benthic foraminifera. *Limnology and Oceanography* 41: 680-688.

Corliss, B.H. 1985. Microhabitats of Benthic Foraminifera Within Deep-Sea Sediments. *Nature* 314: 435-438.

- Cornish-Bowden, A. 1985. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Research* 13: 3021-3030.
- Culver, S. 1991. Early Cambrian Foraminifera from West Africa. *Science* 254 (5032), 689-691.
- Darling, K.F., D.Kroon, C.M.Wade, and A.J.L.Brown 1996. Molecular phylogeny of the planktic foraminifera. *Journal of Foraminiferal Research* 26: 324-330.
- Darling, K.F., C.M.Wade, D.Kroon, and A.J.L.Brown 1997. Planktic foraminiferal molecular evolution and their polyphyletic origins from benthic taxa. *Marine Micropaleontology* 30: 251-266.
- Darling, K.F., C.M.Wade, D.Kroon, A.J.L.Brown, and J.Bijma 1999. The diversity and distribution of modern planktic foraminiferal small subunit ribosomal RNA genotypes and their potential as tracers of present and past ocean circulations. *Paleoceanography* 14: 3-12.
- Darling, K.F., C.M.Wade, I.A.Stewart, D.Kroon, R.Dingle, and A.J.L.Brown 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature* 405: 43-47.
- Darling, K.F., M.Kucera, C.M.Wade, P.von Langen, and D.Pak 2003. Seasonal distribution of genetic types of planktonic foraminifer morphospecies in the Santa Barbara Channel and its paleoceanographic implications. *Paleoceanography* 18.
- de Vargas, C., L.Zaninetti, H.Hilbrecht, and J.Pawlowski 1997. Phylogeny and Rates of Molecular Evolution of Planktonic Foraminifera: SSU rDNA Sequences Compared to the Fossil Record. *J.Mol.Evol.* 45: 285-294.
- de Vargas, C., R.D.Norris, L.Zaninetti, S.W.Gibb, and J.Pawlowski 1999. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96: 2864-2868.
- de Vargas, C., S.Renaud, H.Hilbrecht, and J.Pawlowski 2001. Pleistocene adaptive radiation in *Globorotalia truncatulinoides*: genetic, morphologic, and environmental evidence. *Paleobiology* 27: 104-125.
- de Vargas, C., A.G.Sáez, L.K.Medlin, and H.R.Thierstein 2004. Super-Species in the calcareous plankton, p. 271-298. *In* [eds.], H.R.Thierstein and J.R.Young *Coccolithophores - From Molecular Processes to Global Impact*. Springer.
- Duijnste, I.A.P., S.R.Ernst, and G.J.van der Zwaan 2003. Effect of anoxia on the vertical migration of benthic foraminifera. *Marine Ecology-Progress Series* 246: 85-94.

## Literatur

---

Ertan, K.T., V.Hemleben, and C.Hemleben 2004. Molecular evolution of some selected benthic foraminifera as inferred from sequences of the small subunit ribosomal DNA. *Marine Micropaleontology* 53: 367-388.

Foldvik, K., K.Aagaard, and T.Torresen 1988. On the velocity field of the East Greenland Current. *Deep-Sea Research I* 35: 1335-1354.

Fujiwara, S., M.Tsuzuki, M.Kawachi, N.Minaka, and I.Inouye 2001. Molecular phylogeny of the Haptophyta based on the *rbcL* and sequence variation in the spacer region of the RUBISCO operon. *J.Phycol.* 37: 121-129.

Futuyma, D.J. 1990. *Evolutionsbiologie*. Birkhäuser Verlag.

Galt, J.A. 1967. Current measurements in the Canada Basin of the Arctic Ocean, Summer 1965. 17S. Washington USA, University of Washington. Technical Report.

Gooday, A.J. and A.E.Rathburn 1999. Temporal variability in living deep-sea benthic foraminifera: a review. *Earth-Science Reviews* 46: 187-212.

Gooday, A.J. 2002. Biological Responses to Seasonally Varying Fluxes of Organic Matter to the Ocean Floor: A Review. *Journal of Oceanography* 58: 305-332.

Görög, A. 1994. Early Jurassic planktonic foraminifera from Hungary. *Micropaleontology* 40, 255-260.

Guindon, S. and O.Gascuel 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5), 696-704.

Hansen, H.J. 1979. Test structure and evolution in the Foraminifera. *Lethaia* 12, 173-182.

Hargrave, B.T. 1973. Coupling carbon flow through some pelagic and benthic communities. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 30(9), 1317-1326.

Havach, S.M., G.T.Chandler, A.Wilson-Finelli, and T.J.Shaw 2001. Experimental determination of trace element partition coefficients in cultured benthic foraminifera. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65: 1277-1283.

Haynes, J.R. 1981. *Foraminifera*. MacMillan Publishers.

Heinz, P., C.Hemleben, and H.Kitazato 2002. Time-response of cultured deep-sea benthic foraminifera to different algal diets. *Deep-Sea Research Part I- Oceanographic Research Papers* 49: 517-537.

Hillis,D.M., B.K.Mable, and C.Moritz 1996. Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future, p. 515-543. In [eds.], D.M.Hillis, B.K.Mable, and C.Moritz Molecular Systematics. Sinauer Associates Inc.

Holbourn,A.E. and A.S.Henderson 2002. Re-illustration and revised taxonomy for selected deep-sea benthic foraminifers. *Palaeontologia Electronica* 4(2), 1-34.  
Ref Type: Electronic Citation

Holzmann,M., J.Hohenegger, P.Hallock, W.E.Piller, and J.Pawlowski 2001. Molecular phylogeny of large miliolid foraminifera (Soritacea Ehrenberg 1839). *Marine Micropaleontology* 43: 57-74.

Holzmann,M., W.Piller, and J.Pawlowski 1996a. Sequence variations in the large-subunit ribosomal RNA gene of *Ammonia* (Foraminifera, Protozoa) and their evolutionary implications. *Journal of Molecular Evolution* 43: 145-151.

Holzmann,M. 2000. Species concept in foraminifera: *Ammonia* as a case study. *Micropaleontology* 46: 21-37.

Holzmann,M. and J.Pawlowski 1996. Preservation of Foraminifera for DNA extraction and PCR amplification. *Journal of Foraminiferal Research* 26: 264-267.

Holzmann,M. and J.Pawlowski 1997. Molecular, Morphological and Ecological Evidence for species recognition in *Ammonia* (Foraminifera). *Journal of Foraminiferal Research* 27: 311-318.

Holzmann,M. and J.Pawlowski 2000. Taxonomic relationships in the genus *Ammonia* (Foraminifera) based on ribosomal DNA sequences. *Journal of Micropaleontology* 19: 85-95.

Holzmann,M., W.Piller, and J.Pawlowski 1996b. Sequence variations in the Large-Subunit Ribosomal RNA Gene of *Ammonia* (Foraminifera, Protozoa) and Their Evolutionary Implications. *J.Mol.Evol.* 43: 145-151.

Holzmann,M., W.E.Piller, L.Zaninetti, R.Fenner, R.Martini, R.Serandrei-Barbero, and J.Pawlowski 1998. Molecular versus morphologic variability in *Ammonia spp.* (Foraminifera, Protozoa) from the lagoon of Venice, Italy. *Revue de Micropaléontologie* 41: 59-69.

Huber,B.T., J.Bijma, and K.Darling 1997. Cryptic speciation in the living planktonic foraminifer *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Paleobiology* 23: 33-62.

Hunkins,K., E.M.Thorndike, and G.Mathieu 1969. Nepheloid layers and bottom currents in the Arctic Ocean. *Journal of Geophysical Research-Oceans* 74, 6995-7008.

## Literatur

---

Jones,R.W. 1994. The Challenger Foraminifera. Oxford Science Publications-The Natural History Museum.

Jukes,T.H. and C.R.Cantor 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. *In* [ed.], H.N.Munro Mammalian protein metabolism. Academic Press.

Kimoto,K., X.Xu, N.Ahagon, H.Nishizawa, and Y.Nakamura 2003. Culturing protocol and maintenance for living calcareous plankton - preliminary results from the culturing experiment. JAMSTECR 48: 155-164.

Kimura,M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626.

Kimura,M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2), 111-120.

Kimura,M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press.

Kitazato,H., Y.Shirayama, T.Nakatsuka, S.Fujiwara, M.Shimanaga, Y.Kato, Y.Okada, J.Kanda, A.Yamaoka, T.Masuzawa, and K.Suzuki 2000. Seasonal phytodetritus deposition and responses of bathyal benthic 47 foraminiferal populations in Sagami Bay, Japan: preliminary results from "Project Sagami 1996-1999". *Marine Micropaleontology* 40: 135-149.

Lanavé,C., G.Preparata, C.Saccone, and G.Serio 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution* 20, 86-93.

Langer,M.R., J.H.Lipps, and W.E.Piller 1993a. Molecular Paleobiology of Protists - Amplification and Direct Sequencing of Foraminiferal Dna. *Micropaleontology* 39: 63-68.

Langer,M.R., J.H.Lipps, and W.E.Piller 1993b. Molecular paleobiology of protists-amplification and direct sequencing of foraminiferal DNA. *Micropaleontology* 39(1), 63-68..

Li,L.N., C.Kato, and K.Horikoshi 1998. Distribution of the pressure-regulated operons in deep-sea bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 159(2), 159-166.

Li,W.H. 1993. So, what about the molecular clock hypothesis. *Current Opinion in Genetics and Development* 3, 896-901.

Li,W.H. and D.Graur 1991. Fundamentals of molecular evolution. Sunderland, Massachussets USA, Sinauer Associates Inc.

Loeblich,A.R. and H.Tappan. 1988. Foraminiferal genera and their classification. Van Nostrand Reinhold Co.

Lutze,G.F. and A.V.Altenbach 1991. Technik und Signifikanz der Lebendfärbung benthischer Foraminiferen mit Bengalrot. (A128), 251-265. Geologisches-Paläontologisches Institut der Universität Kiel. Geologisches Jahrbuch.

Lutze,G.F. and B.Salomon 1987. Foraminiferen-Verteilung zwischen Norwegen und Grönland: ein Ost-West-Profil. 6, 69-78. Kiel, Universität Kiel. Berichte aus dem Sonderforschungsbereich 313.

Lutze,G.F. and H.Thiel 1989. Epibenthic Foraminifera from elevated microhabitats - *Cibicidoides wuellerstorfi* and *Planulina arimiensis*. Journal of Foraminiferal Research 19(2), 153-158.

Lynch,M. and P.E.Jarrell 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. Genetics 135, 1197-1208.

Mackensen,A., S.Schumacher, J.Radke, and D.N.Schmidt 2000. Microhabitat preferences and stable carbon isotopes of endobenthic foraminifera: clue to quantitative reconstruction of oceanic new production? Marine Micropaleontology 40: 233-258.

Marshall,C.R 1990. The fossil record and estimating divergence times between lineages: maximum divergence times and the importance of reliable phylogenies. Journal of Molecular Evolution 30, 400-408.

Mathews,D.H., M.Zuker, and D.H.Turner 1997. RNAstructure (4.11).

McCarthy,C. Chromas 1996. 1.45. (1.45).

Meisterfeld,R., M.Holzmann, and J.Pawlowski 2001. Morphological and Molecular Characterization of a New Terrestrial Allogromiid Species: *Edaphoallogromia australica* gen. et spec. nov. (Foraminifera) from Northern Queensland (Australia). Protist 152: 185-192.

Mullis,K.B. and F.A.Faloona 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155, 335-350.

Nigam,R. and D.A.Caron 2000. Does temperature affect dimorphic reproduction in benthic foraminifera? A culture experiment on *Rosalina leei*. CURRENT SCIENCE 79: 1105-1106.

Page,R.D.M. 1996. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.

Pawlowski,J. and J.J.Lee 1991. Taxonomic Notes on Some Tiny, Shallow-Water Foraminifera from the Northern Gulf of Elat (Red-Sea). Micropaleontology 37: 149-162.

Pawlowski,J., I.Bolivar, J.Fahrni, and L.Zaninetti 1994a. Taxonomic Identification of Foraminifera Using Ribosomal DNA-Sequences. Micropaleontology 40: 373-377.

## Literatur

---

Pawlowski, J., I. Bolivar, J. Guiardmaffia, and M. Gouy 1994b. Phylogenetic Position of Foraminifera Inferred from LSU Ribosomal-RNA Gene-Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11: 929-938.

Pawlowski, J., I. Bolivar, J. Fahrni, and L. Zaninetti 1995. DNA analysis of "*Ammonia beccarii*" morphotypes: one or more species? *Marine Micropaleontology* 26: 171-178.

Pawlowski, J., I. Bolivar, J. F. Fahrni, T. Cavalier-Smith, and M. Gouy 1996. Early origin of foraminifera suggested by SSU rRNA gene sequences. *Molecular Biology and Evolution* 13: 445-450.

Pawlowski, J., I. Bolivar, J. F. Fahrni, C. de Vargas, M. Gouy, and L. Zaninetti 1997. Extreme differences in rates of molecular evolution of foraminifera revealed by comparison of ribosomal DNA sequences and the fossil record. *Molecular Biology and Evolution* 14: 498-505.

Pawlowski, J., I. Bolivar, J. F. Fahrni, C. de Vargas, and S. S. Bowser 1999. Molecular evidence that *Reticulomyxa filosa* is a freshwater naked Foraminifer. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 612-617.

Pawlowski, J. 2000. Introduction to the molecular systematics of foraminifera. *Micropaleontology* 46: 1-12.

Pawlowski, J., M. Holzmann, J. F. Fahrni, and P. Hallock 2001a. Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 1. Chlorophytes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 362-367.

Pawlowski, J., M. Holzmann, J. F. Fahrni, X. Pochon, and J. J. Lee 2001b. Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 2. Dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 368-373.

Pawlowski, J., J. F. Fahrni, U. Brykczynska, A. Habura, and S. S. Bowser 2002. Molecular data reveal high taxonomic diversity of allogromiid Foraminifera in Explorers Cove (McMurdo Sound, Antarctica). *Polar Biology* 25: 96-105.

Pawlowski, J., M. Holzmann, C. Berney, J. Fahrni, A. J. Gooday, T. Cedhagen, A. Habura, and S. S. Bowser 2003a. The evolution of early Foraminifera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 11494-11498.

Pawlowski, J., M. Holzmann, J. Fahrni, and S. L. Richardson 2003b. Small subunit ribosomal DNA suggests that the xenophyophorean *Syringammina corbicula* is a foraminiferan. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50: 483-487.

Piepenburg, D., A. Brandt, K. von Juterzenka, M. Mayer, K. Schnack, D. Seiler, U. Witte, and M. Spindler 2001. Patterns and determinants of the distribution and structure of benthic faunal assemblages in the Northern North Atlantic, p. 179-



198. In [eds.], P.Schäfer, W.Ritzrau, M.Schlüter, and J.Thiede The Northern North atlantic: A changing environment. Springer.
- Posada,D. and K.A.Crandall 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9), 817-818.
- Rathburn,A.E. and B.H.Corliss 1994. The Ecology of Living (Stained) Deep-Sea Benthic Foraminifera from the Sulu Sea. *Paleoceanography* 9: 87-150.
- Rodriguez,F., J.L.Oliver, A.Marin, and J.R.Medina 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142, 485-501.
- Röttger,R., M.Fladung, R.Schmaljohann, M.Spindler, and H.Zacharias 1986. A new hypothesis: the so-called megalospheric schizont of the larger foraminifer, *Heterostegina depressa* d'Orbigny, 1826, is a seperate species. *Journal of Foraminiferal Research* 16: 141-149.
- Rubtsov,P.M., M.M.Musakhanov, V.M.Zakharyev, A.S.Krayev, K.G.Skryabin, and A.A.Bayev 1980. The structure of the yeast ribosomal RNA genes 1.the complete nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* 8(23), 5779-5794.
- Saez,A.G., I.Probert, M.Geisen, P.Quinn, J.R.Young, and L.K.Medlin 2003. Pseudo-cryptic speciation in coccolithophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(12), 7153-7168.
- Sanger,F., S.Nicklen, and A.R.Coulson 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12), 5463-5467.
- Schäfer,P., J.Thiede, S.Gerlach, G.Graf, E.Suess, and B.Zeitschel 2001. The Environment of the Northern North Atlantic Ocean: Modern Depositional processes and their historical documentation, p. 1-17. In [eds.], P.Schäfer, W.Ritzrau, M.Schlüter, and J.Thiede The Northern North Atlantic: A changing environment. Springer.
- Schwager,C. 1866. Fossile Foraminiferen von Kar Nikobar. Reise der Oesterreichischen Fregatte Novara um die Erde in den Jahren 1857, 1858, 1859 unter den Befehlen des Commodore B. von Wuellerstorf-Urbair.Geologischer Theil, Geologische Beobachtung no.2. *Palaeontologische Mittheilung* 2(1), 187-268.
- Schweizer,M., J.Pawlowski, I.A.P.Duijnste, T.J.Kouwenhoven, and G.J.van der Zwaan 2005. Molecular phylogeny of the foraminiferal genus *Uvigerina* based on ribosomal DNA sequences. *Marine Micropaleontology* 57(3-4), 51-67.
- Sorhannus,U. 1996. Higher Ribosomal RNA Substitution Rates in Bacillariophyceae and Dasycladales than in Mollusca, Echinodermata, and Actinistia-Tetrapoda. *Mol.Biol.Evol.* 13: 1032-1038.

## Literatur

---

Swofford,D.L. 1993. PAUP- a computer program for phylogenetic inference using maximum parsimony. *Journal of General Physiology* 102(6), A9.

Swofford,D.L., G.J.Olsen, P.J.Waddell, and D.M.Hillis 1996. Phylogenetic Inference, p. 407-514. *In* [eds.], D.M.Hillis, C.Moritz, and B.K.Mable *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc.

Syvanen,M. 2002. Rates of Ribosomal RNA evolution are uniquely accelerated in eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution* 55(1), 85-91.

Tappan,H. and A.R.Loeblich 1988. Foraminiferal evolution, diversification and extinction. *J.Paleontology* 62: 695-714.

Tavaré,S. 1986. Some probabilistic and statistical problems of the analysis of DNA sequences. *Lec.Math.Life Sci.* 17, 57-86.

Thalman,H.E. 1939. Bibliography and index to new genera, species and varieties of foraminifera for the year 1936. *Journal of Paleontology* 13(4), 429-465.

Thies,A. 1991. Benthos-Foraminiferen im europäischen Nordmeer. 31, 1-97. Kiel, Universität Kiel. *Berichte aus dem Sonderforschungsbereich* 313.

Thompson,J.D., D.G.Higgins, and T.J.Gibson 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

van de Peer,Y. 2000. The European Small Subunit Ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research* 28(1), 175-176.

Walker,G. and E.Jacob 1798. *In* [ed.], F.Kannmacher *Adams' Essays on the Microscope*. Dillon and Keating.

Weinelt,M., W.Kuhnt, M.Sarnthein, A.Altenbach, O.Costello, H.Erlenkeuser, U.Pflaumann, J.Simstich, U.Struck, A.Thies, M.H.Trauth, and E.Vogelsang 2001. Paleoceanographic Proxies in the Northern North Atlantic, p. 319-352. *In* [eds.], P.Schäfer, W.Ritzrau, M.Schlüter, and J.Thiede *The Northern North Atlantic: A Changing Environment*. Springer.

Westheide,W. and R.Rieger. 2004. *Spezielle Zoologie Teil 1: Einzeller und wirbellose Tiere*. Spektrum Akademischer Verlag.

Wollenburg,J.E. and A.Mackensen 1998. On the vertical distribution of living (Rose Bengal stained) Foraminifers in the Arctic Ocean. *Journal of Foraminiferal Research* 28: 268-285.

Wray,C.G., J.J.Lee, and R.Desalle 1993. Extraction and Enzymatic Characterization of Foraminiferal Dna. *Micropaleontology* 39: 69-73.

Yayanos,A.A. 1986. Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83(24), 9542-9546.

Zuckerandl,E. and L.Pauling 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins, p. 97-166. *In* [eds.], V.Bryson and H.J.Vogel *Evolving genes and proteins*. Academic Press.

## Danksagung

---

Ich möchte mich besonders bei Prof. Dr. J.F. Imhoff für die Betreuung der Arbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die ständige Gesprächsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Kuhnt danke ich für die Hilfe bei der Morphometrie und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Jörg Sülting möchte ich mich ganz herzlich für ein immer offenes Ohr, für Motivationsschübe, die Diskussionen und viel viel Freude an der Arbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Frank Lappe für die ständige Hilfsbereitschaft und die zuverlässige Betreuung des Sequenzierers.

Vera Thiel, Mirjam Perner, Marcus Tank und Sven Neulinger danke ich für ungezählte gemeinsame Mittagessen, die im richtigen Augenblick zur Entspannung beigetragen haben.

Andrea Lorenz danke ich für anregende Diskussionen der Thematik unter verschiedenen Gesichtspunkten.

Bei Christoph Kierdorf möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Teilnahme an der Reise ARK XIX/4a ermöglicht hat.

Herzlicher Dank an Michael und Isabel Schunck für Hilfe bis zur letzten Minute und eine unvergleichliche Freundschaft.

Sylvia Walter danke ich dafür, dass sie immer im richtigen Moment die richtigen Worte findet.

Meinem Freund Heiko möchte ich für die immer richtige Einschätzung meines Gemütszustandes und besonders viel Rücksicht auf mein Nervenkostüm danken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung innerhalb der Forschergruppe „Einfluss von Ozeanpassagen auf Klima, Ozeanzirkulation und Evolution“ FOR 451, Teilprojekt C1.

Abschließend möchte ich mich bei all jenen bedanken, deren namentliche Nennung diesen Rahmen sprengen würde, die jedoch durch ihre Diskussionsbereitschaft oder durch tatkräftige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AIC	Akaike Information Criterion
ARK	Arktis-Reise des Forschungsschiffes POLARSTERN
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CTAB	N-Cetyl-N´N´N´-Trimethyl-Ammonium-Bromid
ddNTP	di-desoxy-Nucleotid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	desoxy-Nucleotid-Triphosphat
DOC	Deoxycholol
EGC	East Greenland Current
ETS	external transcribed spacer
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FS	Forschungsschiff
G	Guanin
GIN Seas	Greenland Iceland Norwegian Seas
GTR	General Time Reversible
ITS	internal transcribed spacer
LSU	large subunit
MD	Forschungsschiff Marion Dufresne
MUC	Multicorer
NCBI	National Center for Biological Information
nt	Nucleotide
NTS	non transcribed spacer
PAUP	Phylogenetic Analysis using Parsimony
PCR	Polymerase Chain Reaction
POC	particulate organic carbon
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribonucleinsäure
RV	research vessel
SO	Forschungsschiff SONNE
SSU	small subunit
T	Thymin
TOC	total organic carbon
u	unit (Einheit für die Prozessivität der Polymerase)
U	Uracil

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt habe

Abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer habe ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Diese Arbeit wurde noch nicht zur Veröffentlichung eingereicht oder einer anderen Universität im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Ich habe noch keine früheren Promotionsversuche unternommen.

---

Martina Blümel

## **Lebenslauf**

Vorname: Martina

Name: Blümel

Geburtsdatum: 19.12.1975

Geburtsort: Bonn

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1982-1986: Gemeinschaftsgrundschule Swisttal-Odendorf

1986-1995: Privates St. Joseph Gymnasium

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1995-2001: Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Abschluss: Diplom

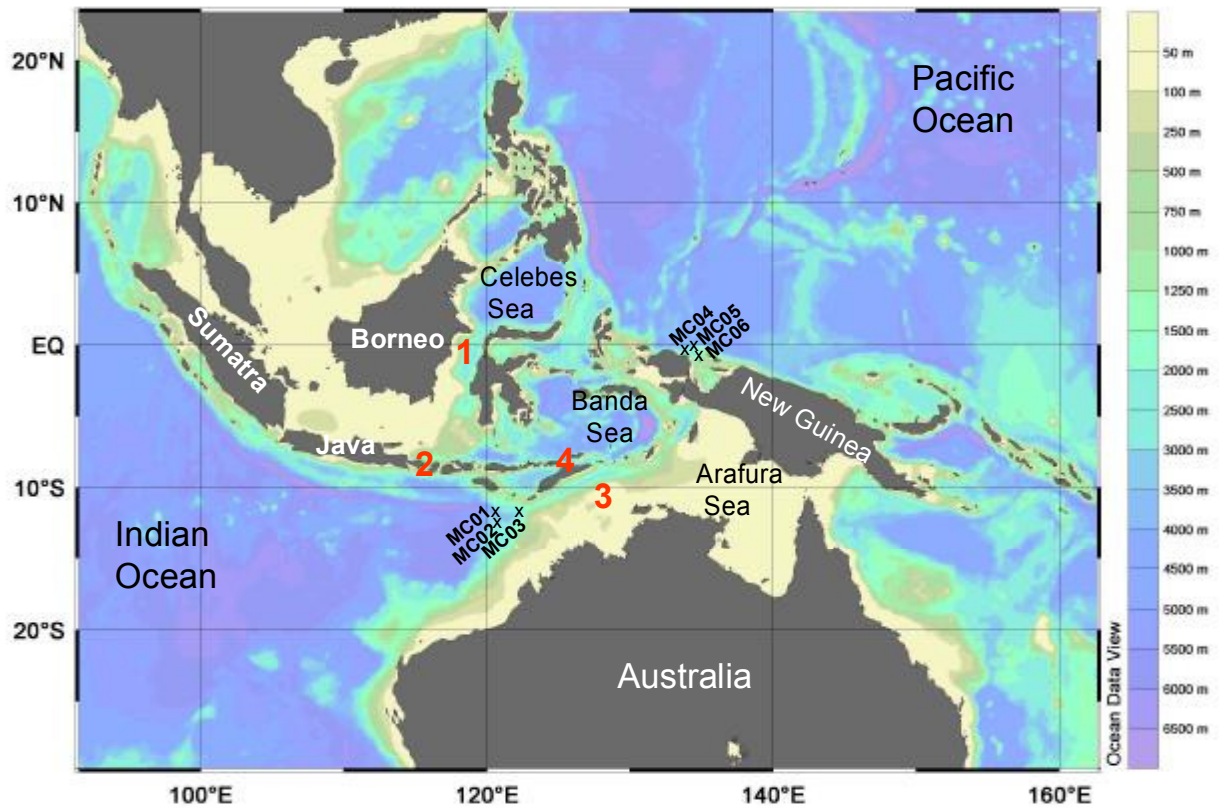
seit 15.12.2001: Doktorandin am Leibniz-Institut für Meereswissenschaften (IFM-GEOMAR) an der Universität Kiel

Thema der Promotion: Molekularbiologische Untersuchungen an benthischen Tiefsee-Foraminiferen der östlichen Grönlandsee

## 6 Anhang

### A) Karten der Untersuchungsgebiete der Reisen MD122, SO164, ARKXIX/4a

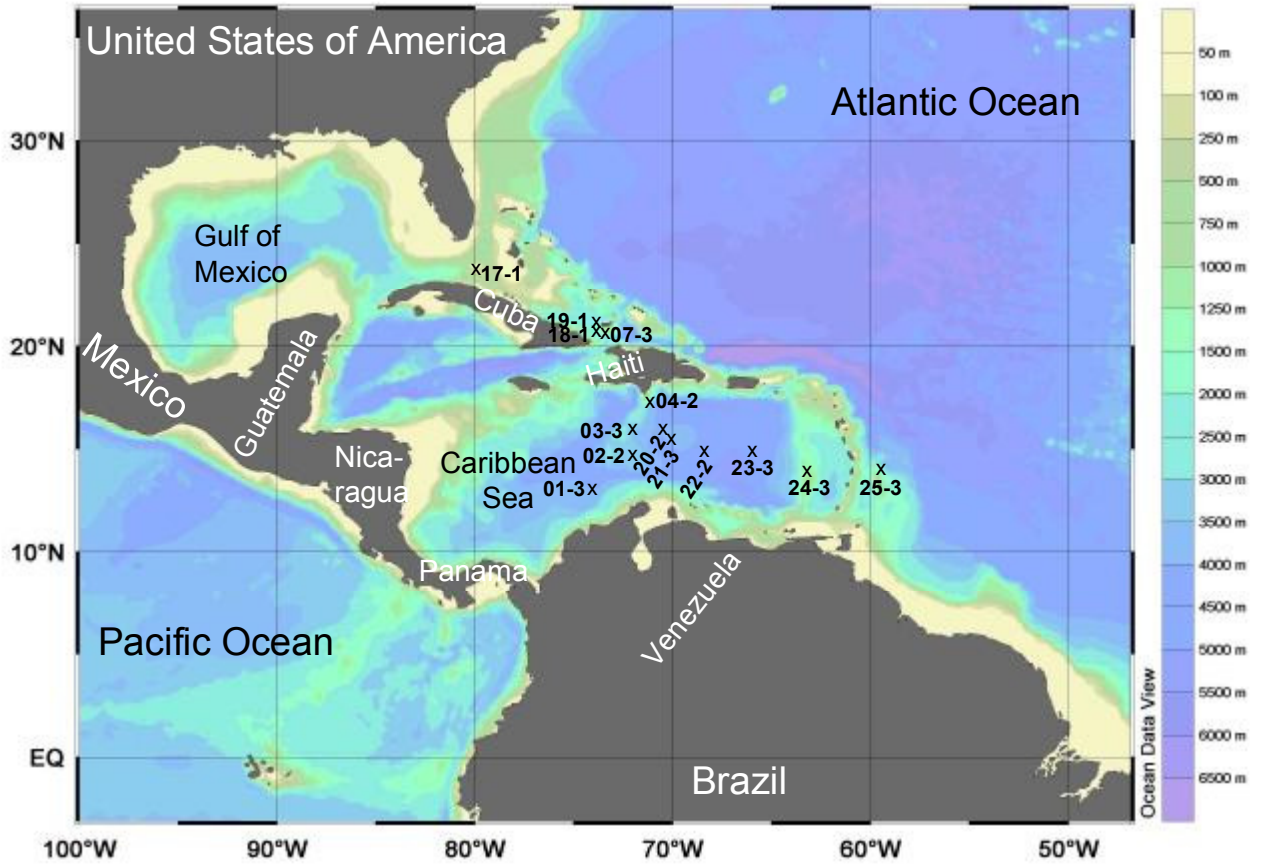
#### 1) RV MARION DUFRESNE REISE MD122



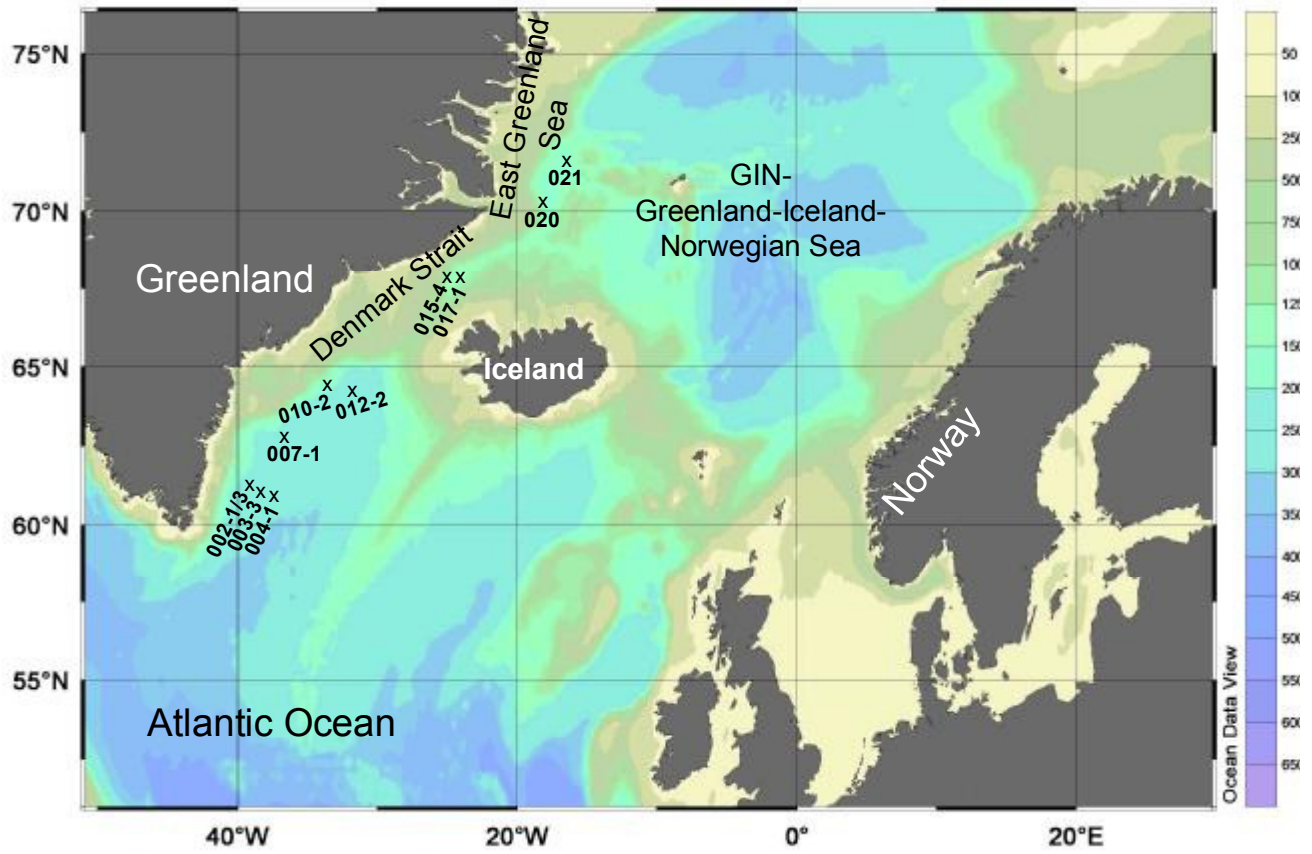
- 1: Makassar Straße
- 2: Straße von Lombok
- 3: Timor Passage
- 4: Straße von Ombai



2) FS SONNE REISE SO164



3) FS POLARSTERN Reise ARK XVIII/1a



**B) Geographische Positionen der Stationen der für die vorliegende Arbeit verwendeten Proben aller Ausfahrten sowie Probenbezeichnung, Tiefe und Übersicht über das Gerät, welches zur Probenahme eingesetzt wurde**

<b>Cruise</b>	<b>Station No.</b>	<b>Position</b>	<b>Depth [m]</b>	<b>Gear</b>
<b><u>MD122</u></b>	MC01	12°43.03 S 121°26.84 E	2320	MUC
	MC02	13°04.87 S 121°47.22 E	1777	MUC
	MC03	12°53.79 S 122°44.58 E	561	MUC
	MC04	0°21.87 S 134°06.48 E	3070	MUC
	MC05	0°48.31 S 134°28.79 E	1188	MUC
	MC06	0°15.88 S 134°14.55 E	2110	MUC
<b><u>SO164</u></b>	01-3	13°50.195 N 74°09.028 W	4025	MUC
	02-2	15°18.290 N 72°47.07 W	2977	MUC
	03-3	16°32.400 N 72°12.31 W	2743	MUC
	04-2	17°16.380 N 71°39.09 W	1021	MUC
	07-3	21°19.460 N 74°08.760 W	2722	MUC
	17-1	24°04.71 N 80°53.32 W	957	GKG
	18-1	21°13.61 N 74°21.00 W	1619	MUC
	19-1	21°14.72 N 74°21.00 W	1705	GC
	20-2	16°45.49 N 71°29.22 W	3358	MUC
	21-3	16°06.00 N 70°30.00 W	3995	MUC
	22-2	15°24.00 N 68°12.00 W	4509	MUC
	23-3	15°34.01 N 65°08.09 W	4334	MUC
	24-3	14°11.89 N 63°25.43 W	1541	MUC
	25-3	14°41.25 N 59°44.48 W	2720	MUC
<b><u>ARK XVIII/1a</u></b>	PS62/002-1	61°47.699 N 39°22.430 W	1887	MUC
	PS62/002-3	61°47.685 N 39°22.423 W	1891	GKG
	PS62/003-3	61°42.062 N 39°04.065 W	2157	GKG
	PS62/004-1	67°31.549 N 38°07.391 W	2564	MUC
	PS62/007-1	62°42.913 N 37°40.288 W	2133	GKG
	PS62/010-2	64°59.766 N 32°54.535 W	1698	GKG
	PS62/012-2	64°37.459 N 31°41.593 W	2402	GKG
	PS62/015-4	67°55.841 N 25°25.748 W	980	GKG
	PS62/017-1	67°51.058 N 24°34.917 W	1458	GKG
	PS62/020	70°59.935 N 18°54.903 W	1322	MUC
	PS62/021	71°30.150 N 16°50.230 W	1704	MUC

Anhang B: Geographische Positionen der Stationen und zur Probenahme eingesetztes Gerät

Cruise	Station No.	Position	Depth [m]	Gear
<b>ARKXIX/4a</b>				
Profile 1	PS64/487-1	76°8.939 N 17°16.975 W	236	MUC
Profile 1	PS64/488-1	76°10.966 N 15°10.858 W	306	MUC
Profile 1	PS64/489-1	76°14.138 N 11.00.106 W	302	MUC
Profile 1	PS64/490-1	76°23.822 N 09°59.437 W	253	MUC
Profile 1	PS64/504-1	75°43.242 N 08°05.400 W	2284	MUC
Profile 1	PS64/506-1	75°51.158 N 08°38.838 W	1700	MUC
Profile 1	PS64/508-1	75°58.902 N 09°11.849 W	1062	MUC
Profile 1	PS64/511-1	76°09.955 N 10°06.943 W	276	MUC
Profile 1	PS64/516-1	76°28.488 N 11°24.863 W	313	MUC
Profile 1	PS64/526-1	75°27.824 N 06°59.073 W	3374	MUC
Profile 1	PS64/528-1	75°35.368 N 07°34.591 W	3134	MUC
Profile 1	PS64/529-1	75°38.693 N 07°48.121 W	2958	MUC
Profile 1	PS64/531-1	75°46.901 N 08°20.833 W	1982	MUC
Profile 1	PS64/533-1	75°54.584 N 08°54.525 W	1443	MUC
Profile 2	PS64/573-1	74°45.900 N 16°43.913 W	377	MUC
Profile 2	PS64/581-2	74°28.605 N 14°26.346 W	259	MUC
Profile 2	PS64/582-1	74°26.527 N 14°11.670 W	561	MUC
Profile 2	PS64/583-2	74°23.864 N 13°53.619 W	1399	MUC
Profile 2	PS64/584-1	74°22.157 N 13°39.596 W	1850	MUC
Profile 2	PS64/585-2	74°19.718 N 13°23.607 W	2254	MUC
Profile 2	PS64/586-1	74°18.086 N 13°06.959 W	2492	MUC
Profile 3	PS64/628-2	73°08.852 N 12°36.684 W	2702	MUC
Profile 3	PS64/706-1	72°42.618 N 16°36.141 W	910	MUC
Profile 3	PS64/707-2	72°41.501 N 16°28.599 W	1223	MUC
Profile 3	PS64/708-1	72°40.614 N 16°13.579 W	1600	MUC
Profile 3	PS64/710-2	72°37.476 N 15°40.268 W	1892	MUC

## C) Verwendete Puffer und Lösungen

### 1) DNA-Extraktion

#### DOC-METHODE LYSIS-PUFFER

Tris:	50 mM	pH 8.6
EDTA:	2 mM	
Triton X-100:	0.1% (v/v)	
Na-Deoxycholat:	0.5% (w/v)	

### 2) PCR

#### 10 X THERMOPOL PUFFER FÜR EXO- VENT-POLYMERASE:

KCl:	100 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM
Tris	200 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
Triton X-100	1% (v/v)

### 3) Elektrophorese

#### 10 X TBE-PUFFER

Tris	1 M
Borsäure	0.83 M
EDTA	10 mM

#### DNA-MARKER

DNA-Standard	20 µl
Agarosegel-Farbmarker	20 µl
1x TBE-Puffer	100 µl

#### AGAROSEGEL-FARBMARKER

Bromphenolblau	0.1 % (w/v)
Glycerin	50 ml
H <sub>2</sub> O dest.	50 ml

### 4) Klonierungsexperimente

#### LB-MEDIUM

NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1l

pH 7.0

nach Autoklavieren Abkühlung auf ca. 40°C. Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin

### 5) Sequenzierung

#### 5X PUFFER FÜR SEQUENZIERUNG

Tris-HCl:	400 mM
MgCl <sub>2</sub> :	10 mM

pH 9

**D) IUPAC Nucleotide Ambiguity Code**

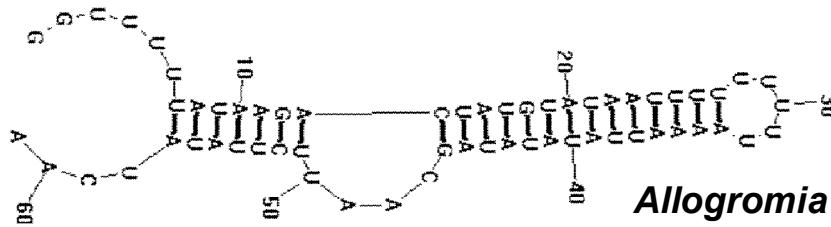
<b>Symbol</b>	<b>Bedeutung</b>
A	A
C	C
G	G
T	T
U	U
M	A oder C
R	A oder G
W	A oder T
S	C oder G
Y	C oder T
K	G oder T
V	A oder C oder G
H	A oder C oder T
D	A oder G oder T
B	C oder G oder T
X	G oder A oder T oder C
N	G oder A oder T oder C

**E) In der vorliegenden Arbeit für die PCR sowie die Sequenzierung eingesetzte Primer (Literatur und in dieser Arbeit entwickelte Primer)**

Primer-Bezeichnung	Lese-richtung	Sequenz	Position in SSU von <i>Rattus norvegicus</i> (K01593)	Position in SSU von <i>Ammonia becarii</i> (X86094)	Anwendung	Gen	Referenz
2TA	sense	cac atc agc tgc agt gag			PCR	LSU	Pawlowski et al., 1994
1F	antisense	act ctc tct ttc act cc			PCR	LSU	Pawlowski et al., 1996
Foram-K4R	antisense	tgt gca gcc cgg aac atc t	1332-1320	2351-2333	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
Foram-K5F	sense	agt ggg taa tca att aga	1460-1480	2467-2499	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
853F-Rotaliidae	sense	aca ggt ctg tga tgc cct	1295-1312	2314-2331	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
884F-Rotaliidae	sense	ggg ctg cac acg tgc tac aa	1323-1342	2342-2361	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
1186R-Rotaliidae	antisense	gaa tt(ag) aca at(ct) gca	1602-1585	2610-2592	Sequenzierung	SSU	diese Arbeit
Eukarya 32 F	sense	gct taa ttt gac tca ac(ag) cgg	1240-1260	2257-2277	PCR	SSU	diese Arbeit
Eukarya 188F	sense	ggg gca tgg cgg ttc tta g	1331-1349	2350-2368	PCR	SSU	diese Arbeit
Eukarya 964R	antisense	ggg gtg tac aaa ggg cag g	1706-1688	2726-2708	PCR	SSU	diese Arbeit
s14F1	sense	aag ggc acc aca aga acg c	769-787	1838-1856	PCR Sequenzierung	SSU	Pawlowski et al., 1996
U/T20r1	antisense	(t/c)ga tgc ctt gtt acg act tct ctt tc	1822-1847	2827-2852	PCR	SSU	Ertan et al., 2004
Cibi-fwd	sense	tgt ctg ctt aat tgc gtt tca cta	996-1015	2037-2060	PCR Sequenzierung	SSU	In Kooperation mit Dr. Topac Ertan, Tübingen diese Arbeit
Cibi-rev	antisense	atg cct tgt tac gac ttc tct ttc	1845-1822	2850-2827	PCR Sequenzierung	SSU	2 bp kürzer als U/T20r1 In Kooperation mit Dr. Topac Ertan, Tübingen diese Arbeit
s17F	sense	gca acg aac gtg acc g	1120-1135	2159-2174	PCR Sequenzierung	SSU	Reverse complement-Sequenz von s17; Pawlowski et al., 1996
s15F	sense	gtg gtg cat ggc cgt	1329-1343	?	PCR Sequenzierung	SSU	Pawlowski et al., 1996
s18F	sense	ggc aat aac agg tct gtg atg c	1288-1309	2307-2327	PCR Sequenzierung	SSU	
s20	sense	ttg tac aca ccg ccc gtc	1696-1713	2716-2733	PCR Sequenzierung	SSU	Reverse-complement-Sequenz von s20R; Pawlowski et al., 1996
M13F	sense	gta aaa cga cgg cca g	auf Vektor pCR 4 TOPO 355-370		Klonierung Sequenzierung	pCR4 TOPO Vektor	Yanisch-Perron et al., 1985
s15a	antisense	cta aga acg gcc atg cac cac c	975-959		PCR Sequenzierung	SSU	modifiziert nach s15: Pawlowski et al., 1996
sB	sense	tga tcc atc (ag)gc agg ttc acc tac	1848-1871	2853-2876	PCR	ITS	Reverse-complement-Sequenz von sBR: Sogin, 1990
s20R	antisense	gac ggg cgg tgt gta caa	1713-1696	2733-2716	PCR Sequenzierung	SSU	Pawlowski et al., 1996
s14F3	sense	acg ca(ac) gtg tga aac ttg	-	1807-1824	PCR Sequenzierung	SSU	Pawlowski et al., 1996
s17	antisense	cgg tca cgt tgc ttg c	1135-1120	2174-2159	PCR Sequenzierung	SSU	Pawlowski et al., 1996
s18R	antisense	gca tca cag acc tgt tat tg	1309-1290	2328-2309	PCR Sequenzierung	SSU	
sBR	antisense	gta ggt gaa cct gca gaa gga tca	1871-1848	2876-2853	PCR Sequenzierung	SSU	Sogin, 1990
2TAIC	antisense	ctc act cga gct gat gtg			PCR	ITS	Pawlowski et al., 1996
M13R	antisense	cag gaa aca gct atg ac	auf Vektor pCR 4 TOPO 205-221		Klonierung Sequenzierung	pCR4 TOPO Vektor	Yanisch-Perron et al., 1985

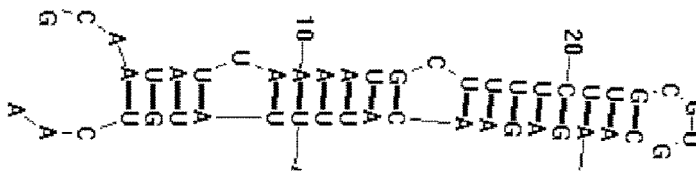
**F) mit RNAstructure v.4.11. berechnete Sekundärstrukturen der variablen Regionen ausgewählter Foraminiferen verschiedener taxonomischer Gruppen**

**F1**



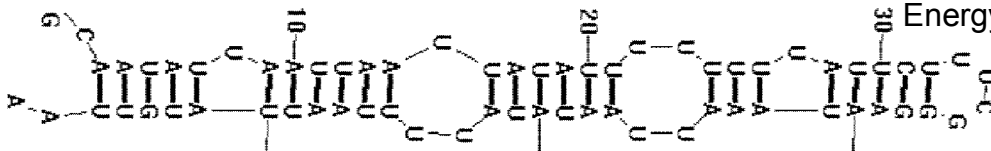
Energy: -15.8

***Allogromia laticollaris***



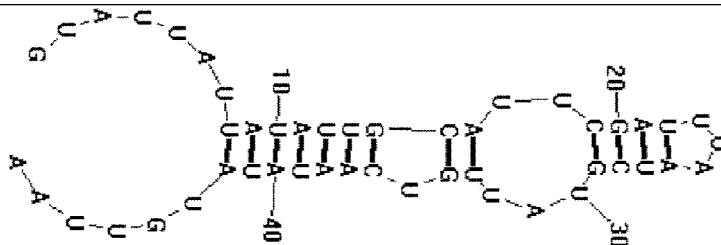
Energy: -11.7

***Ammotium pseudocassis***



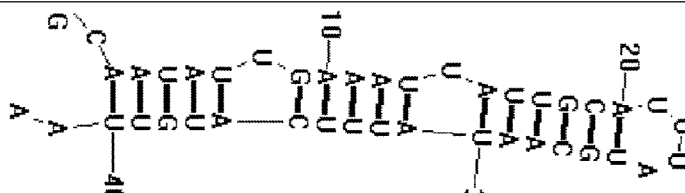
Energy: -11.2

***Haplophragmoides wilberti***



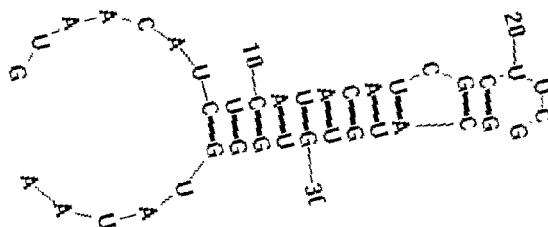
Energy: -7.1

***Textularia sp.***



Energy: -10.7

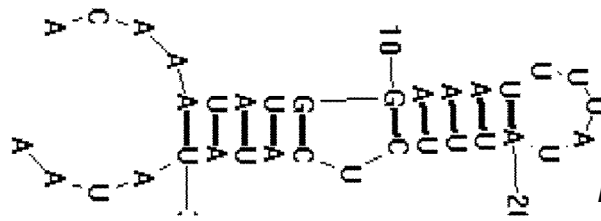
***Trochammina sp.***



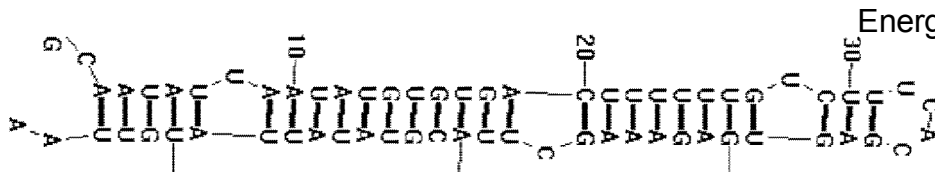
Energy: -12.2

***Bolivina variabilis***

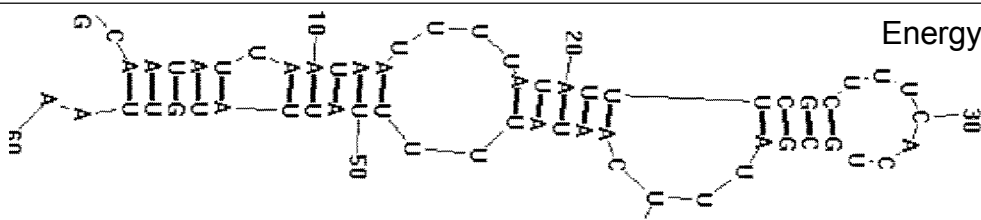




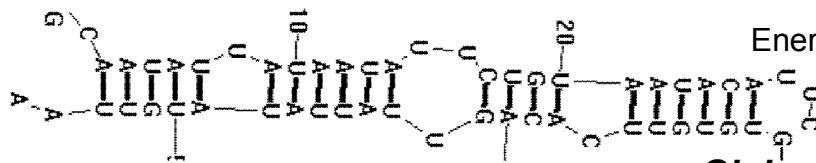
*Bulimina aculeata*



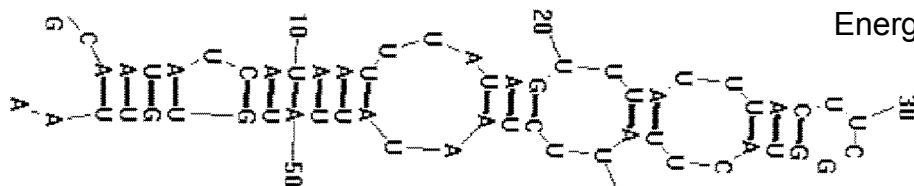
*Uvigerina peregrina*



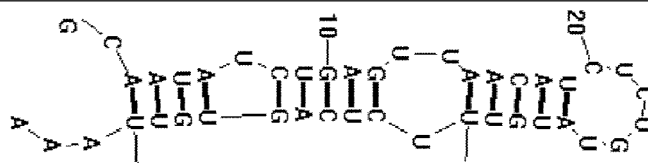
*Globobulimina pseudospinescens*



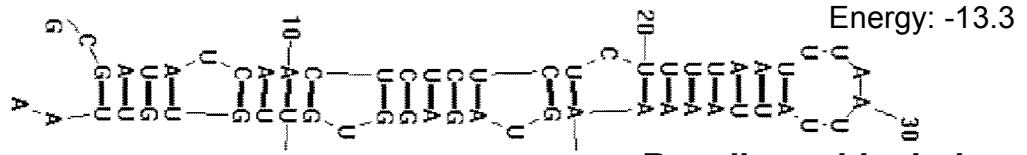
*Globocassidulina sp.*



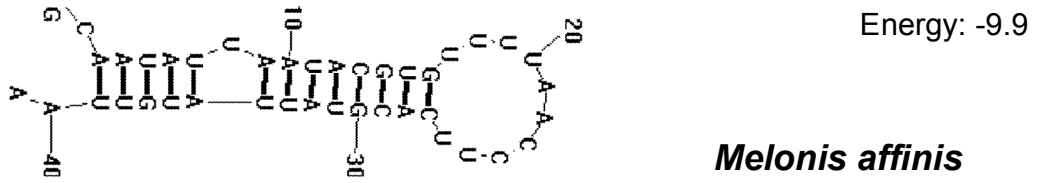
*Hyalinea baltica*



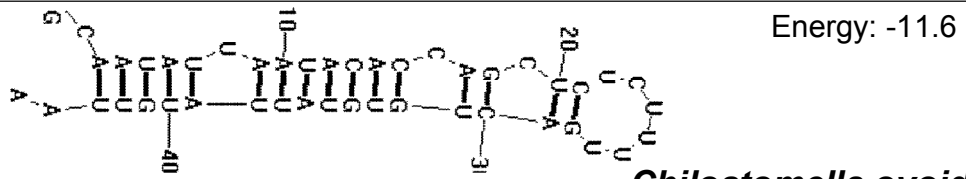
*Planorbulina mediterranensis*



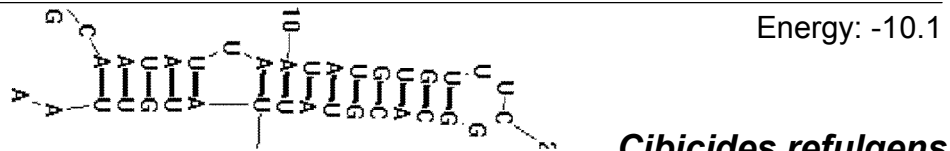
***Rosalina orbicularis***



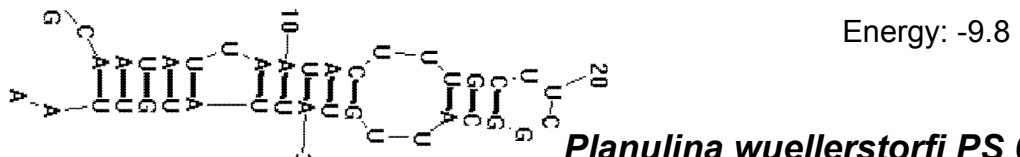
***Melonis affinis***



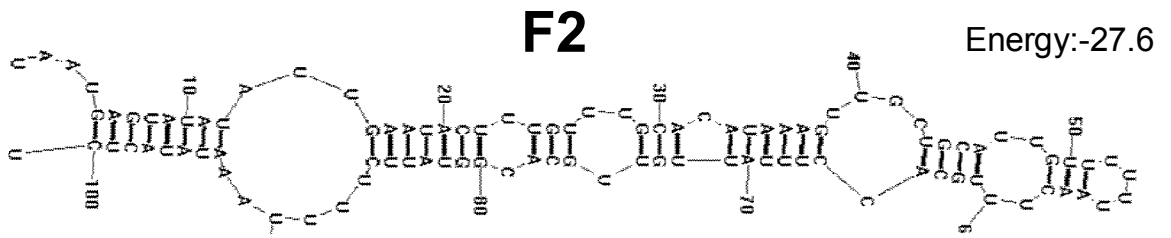
***Chilostomella ovoidea***



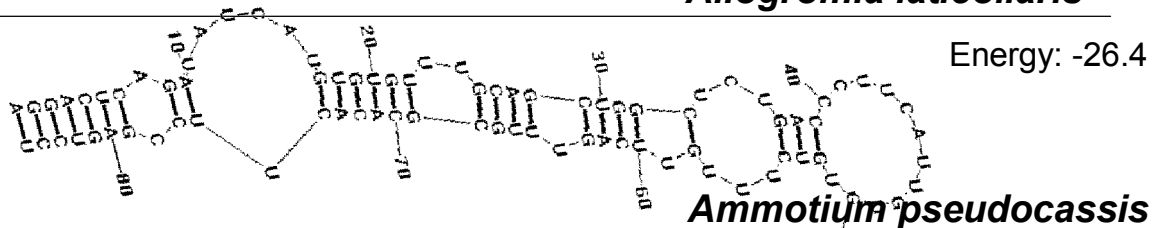
***Cibicides refulgens***



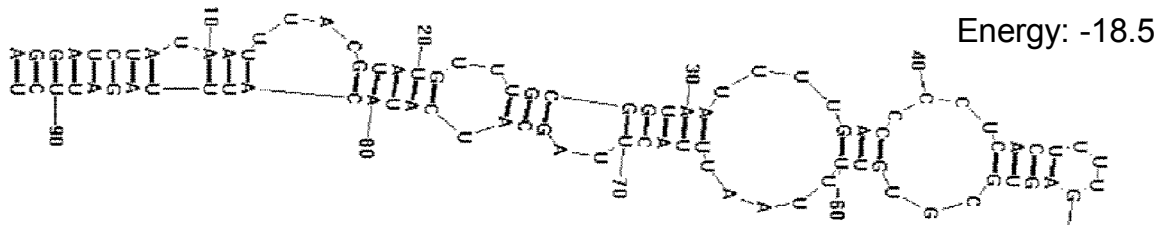
***Planulina wuellerstorfi PS 698***



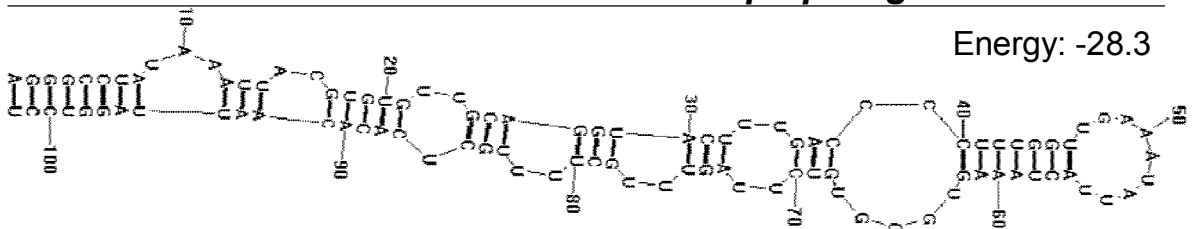
***Allogromia laticollaris***



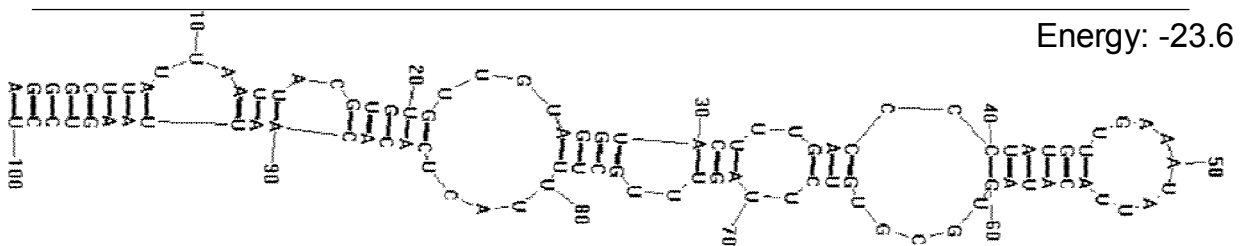
***Ammotium pseudocassis***



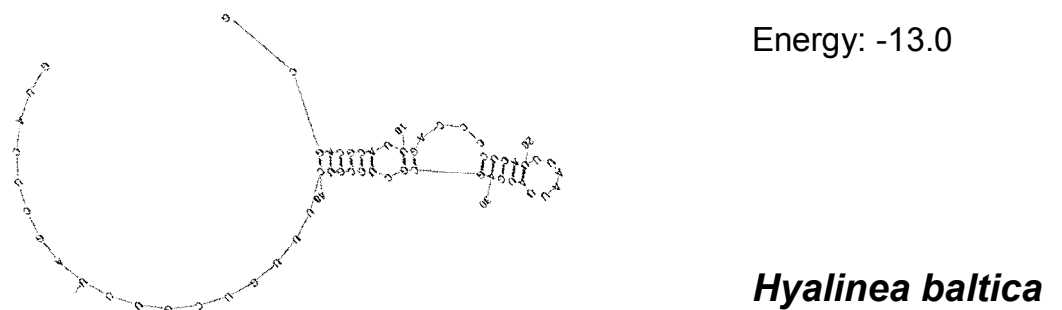
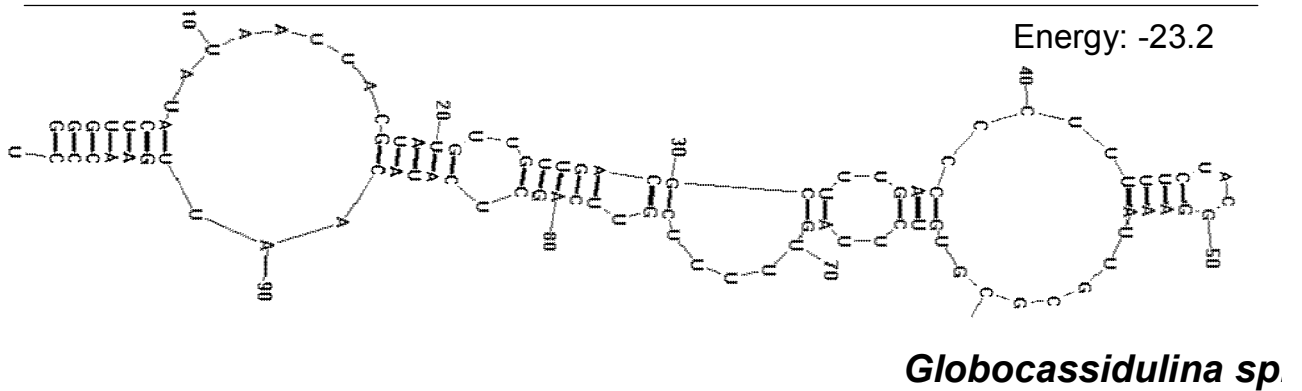
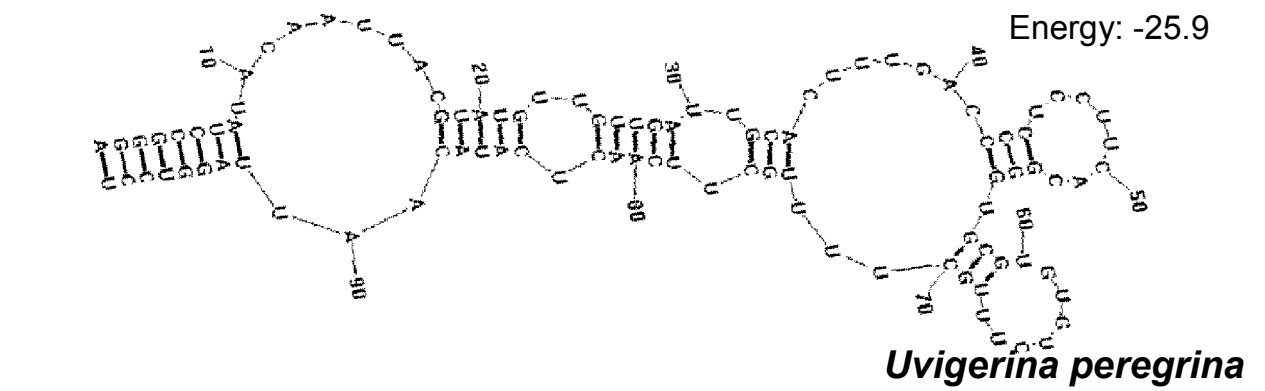
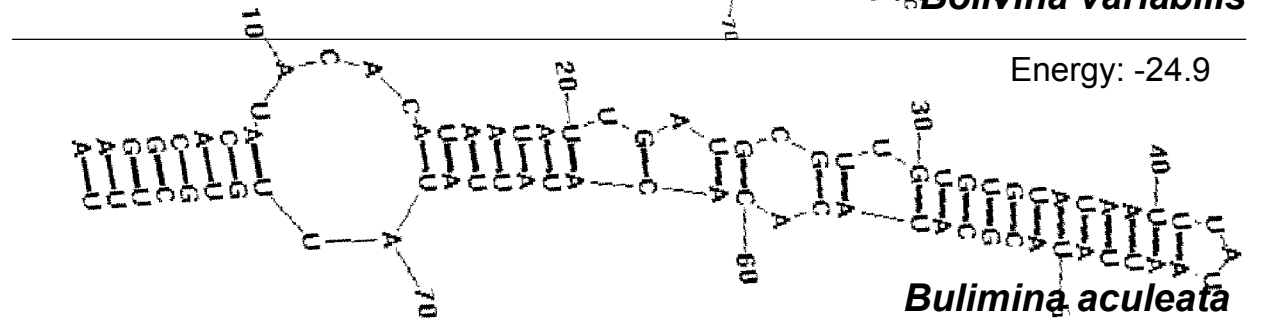
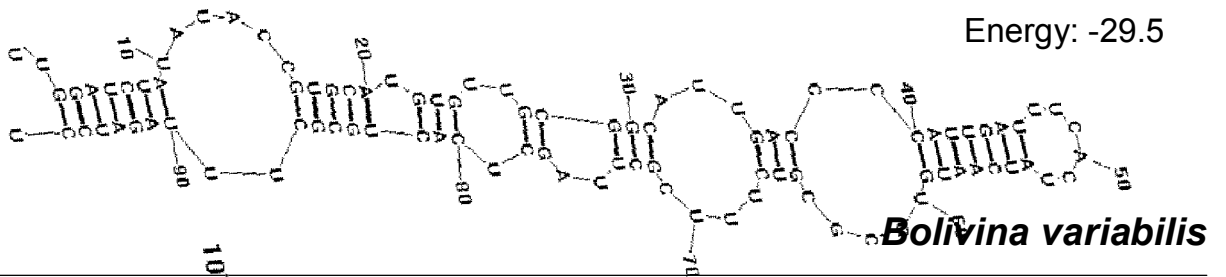
***Haplophragmoides wilberti***

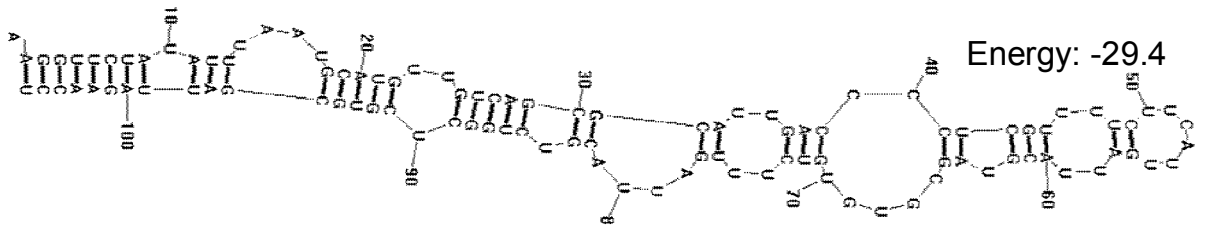


***Textularia sp.***

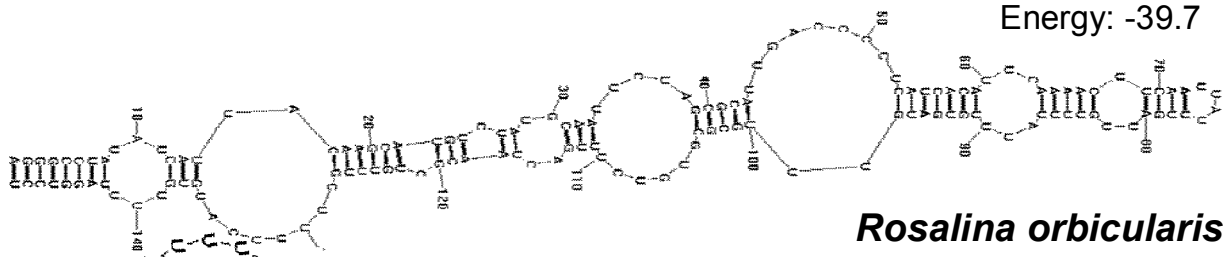


***Trochammina sp.***

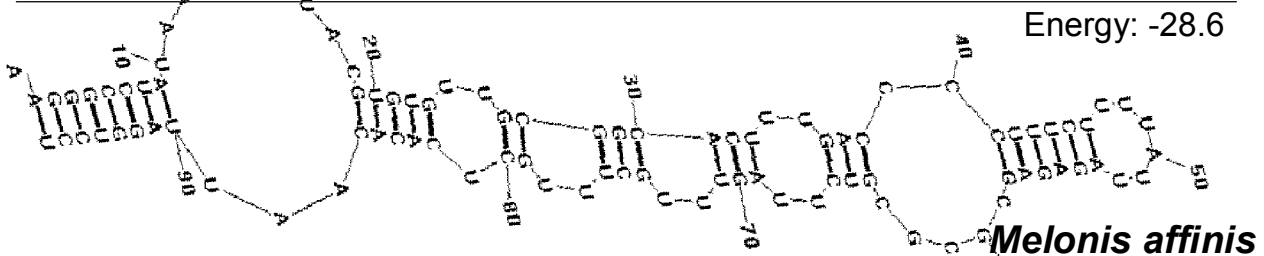




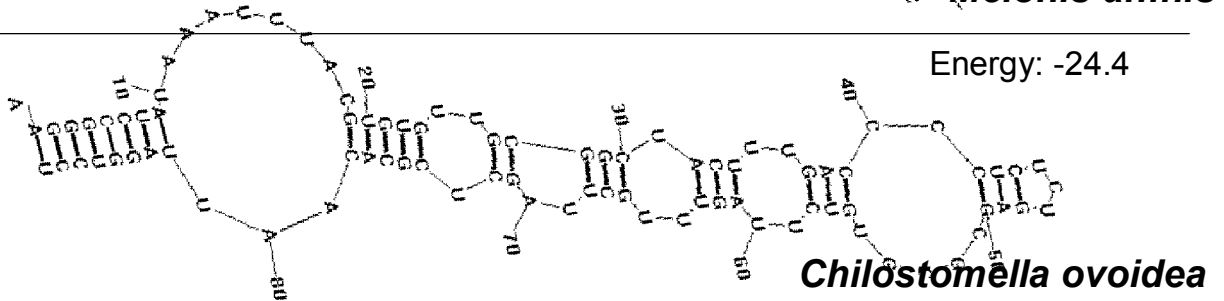
*Planorbulina mediterraneensis*



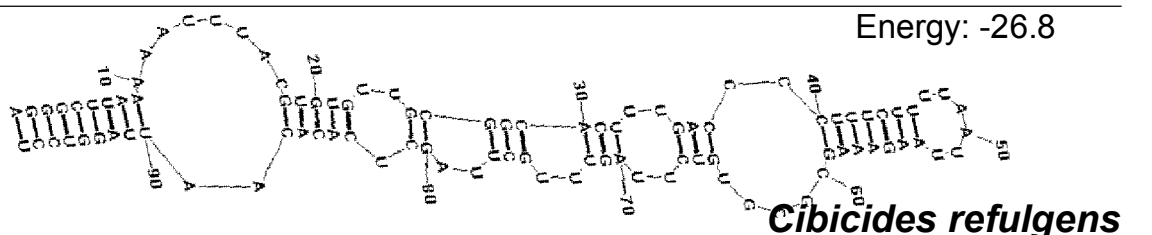
*Rosalina orbicularis*



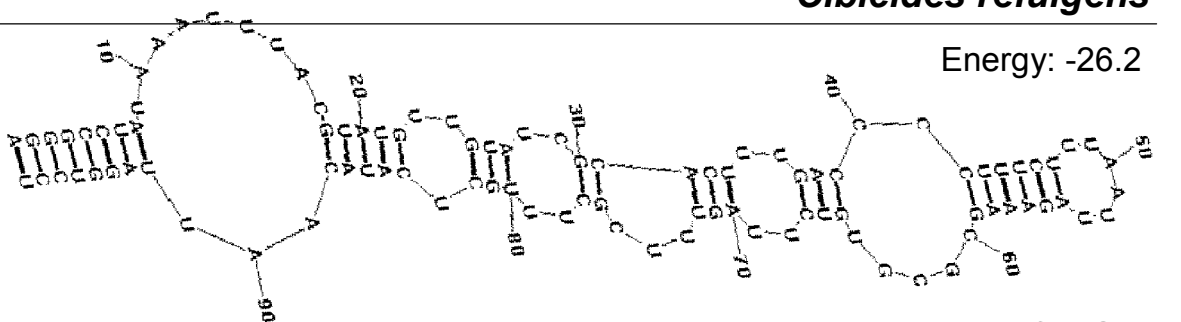
*Melonis affinis*



*Chilostomella ovoidea*



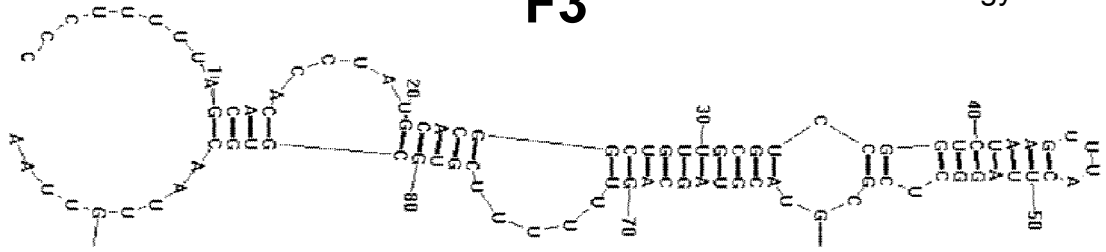
*Cibicides refulgens*



*Planulina wuellerstorfi* PS698

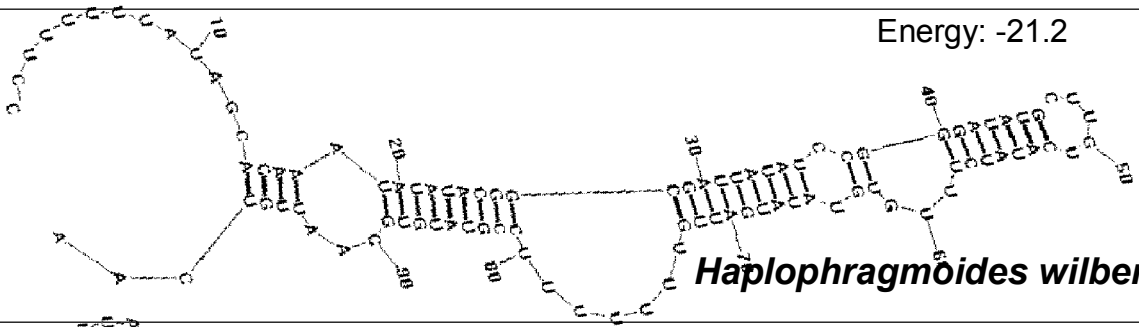
**F3**

Energy: -33.3



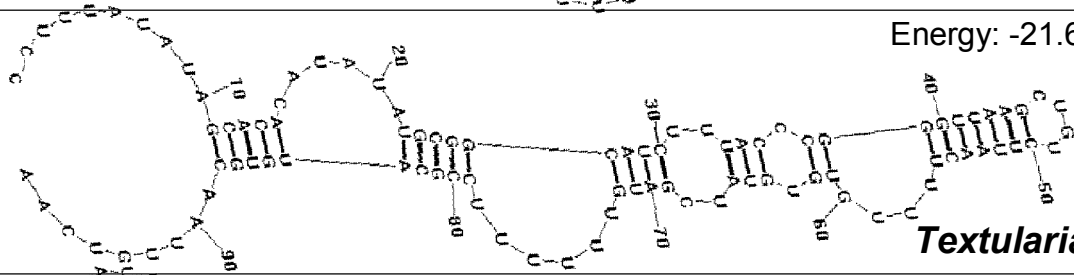
***Ammotium pseudocassis***

Energy: -21.2



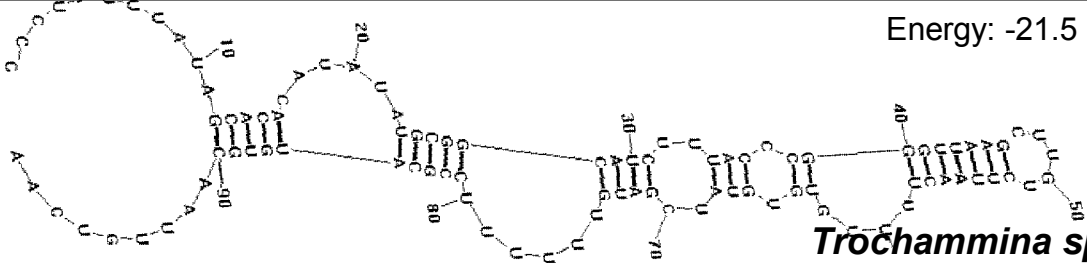
***Haplophragmoides wilberti***

Energy: -21.6



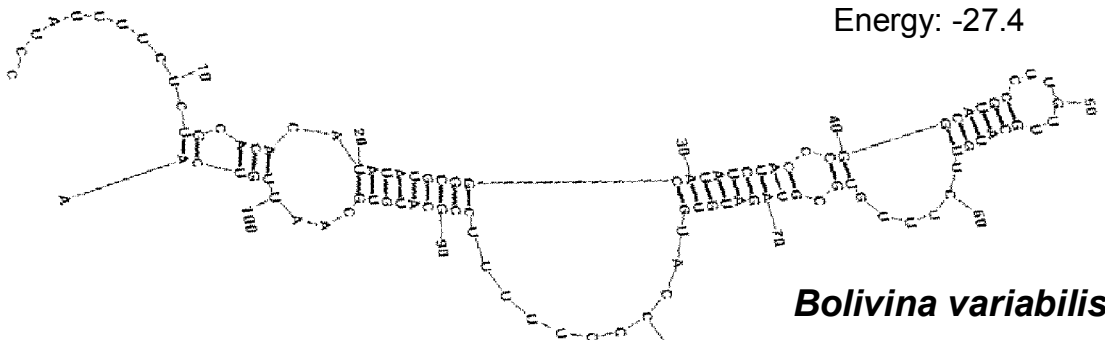
***Textularia sp.***

Energy: -21.5

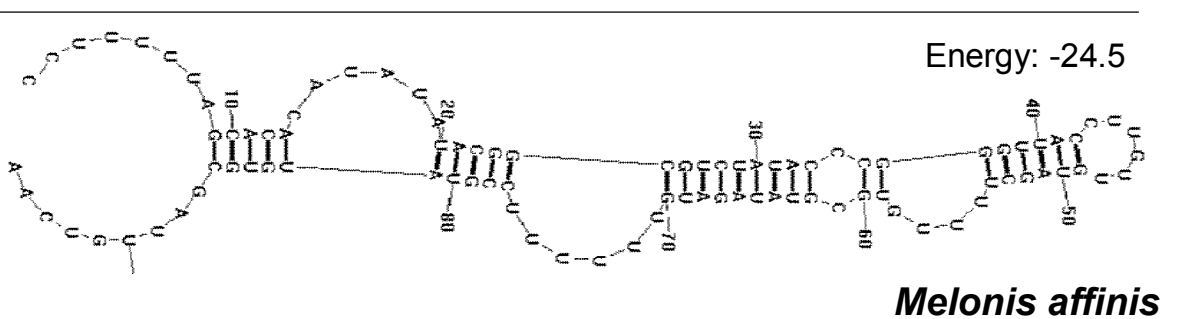
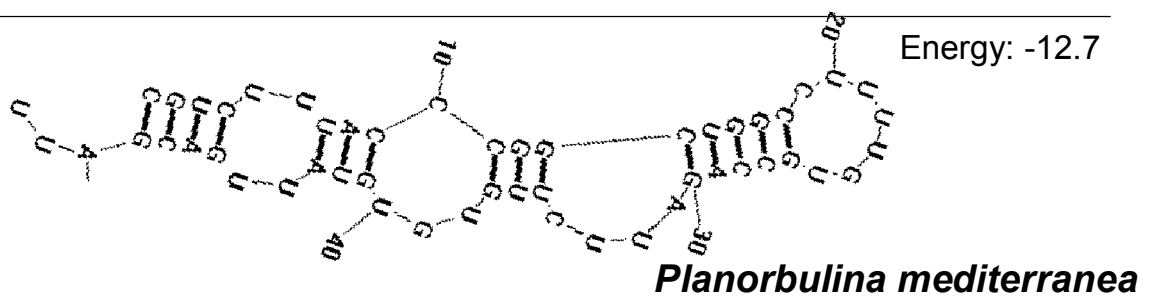
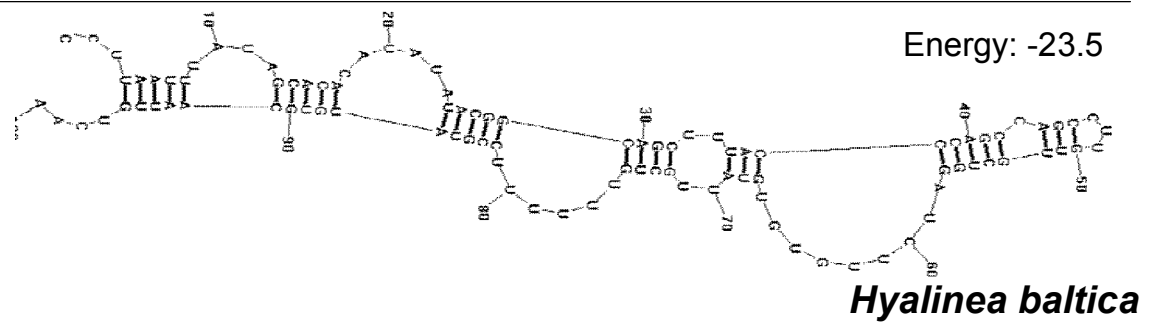
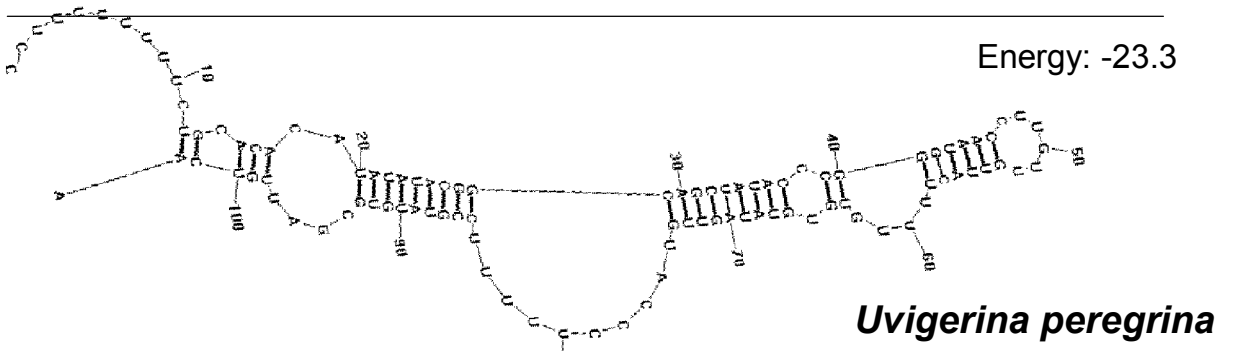
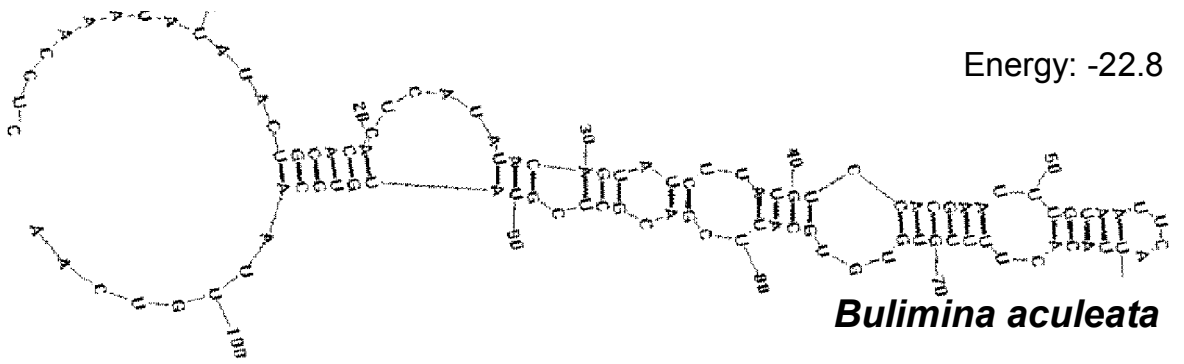


***Trochammina sp.***

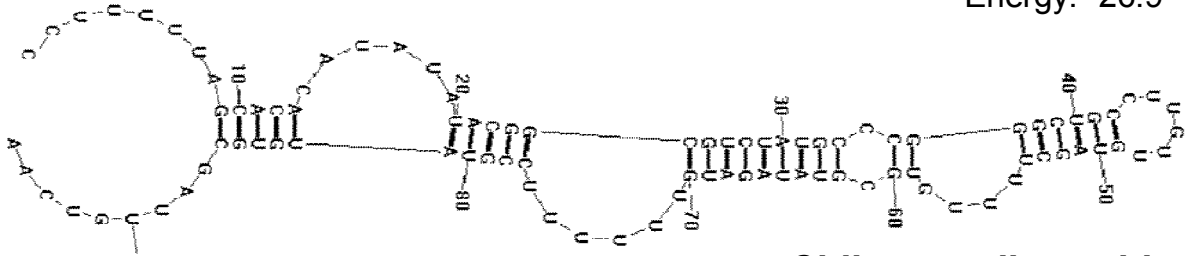
Energy: -27.4



***Bolivina variabilis***

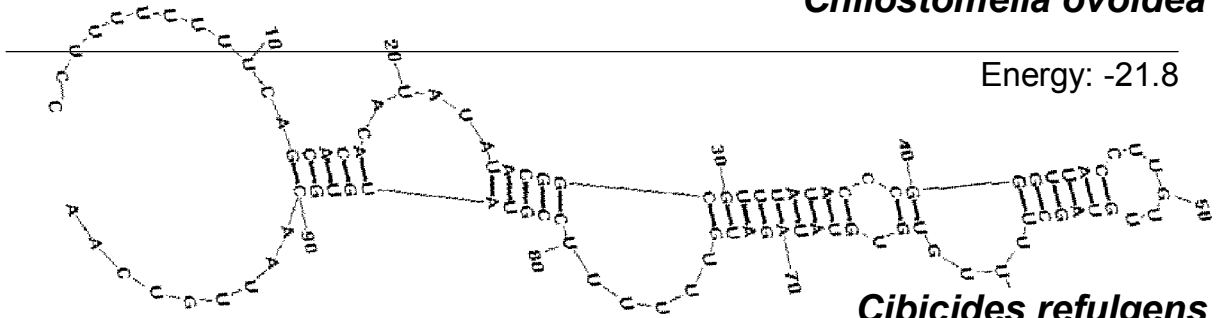


Energy: -26.9



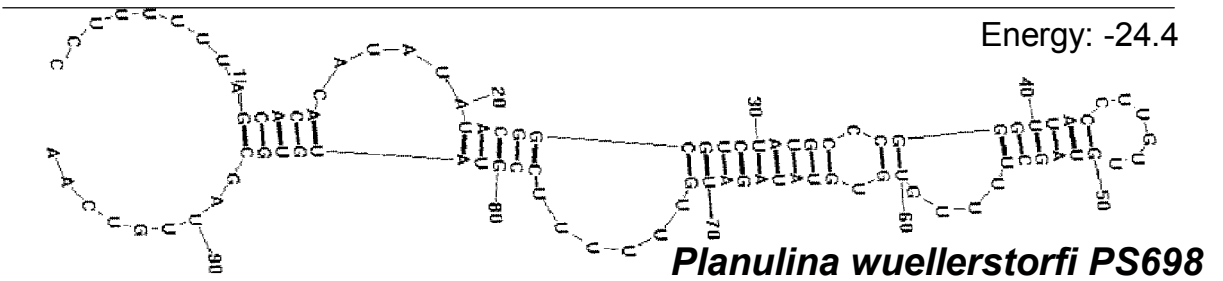
***Chilostomella ovoidea***

Energy: -21.8



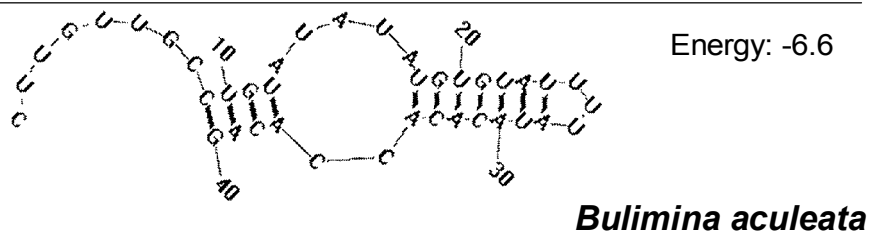
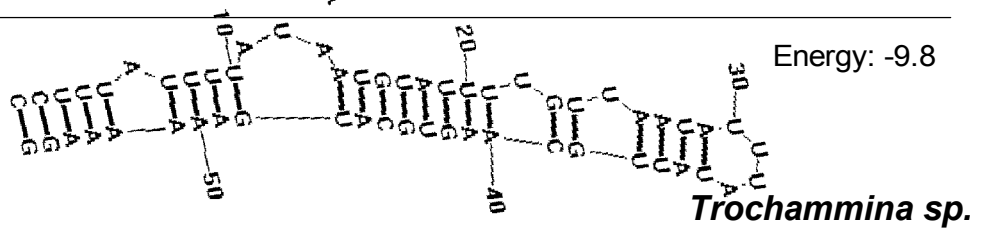
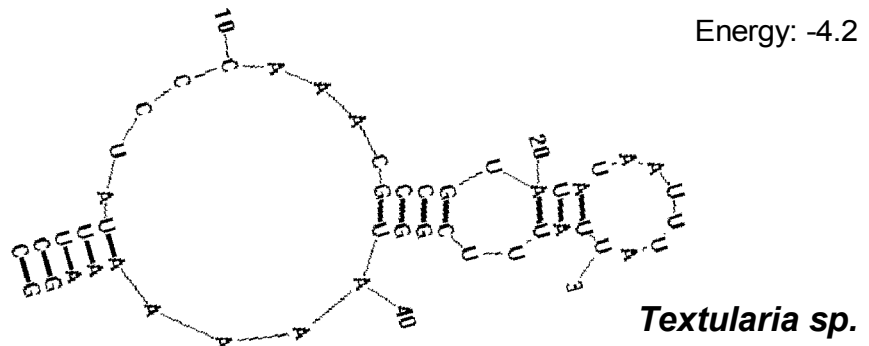
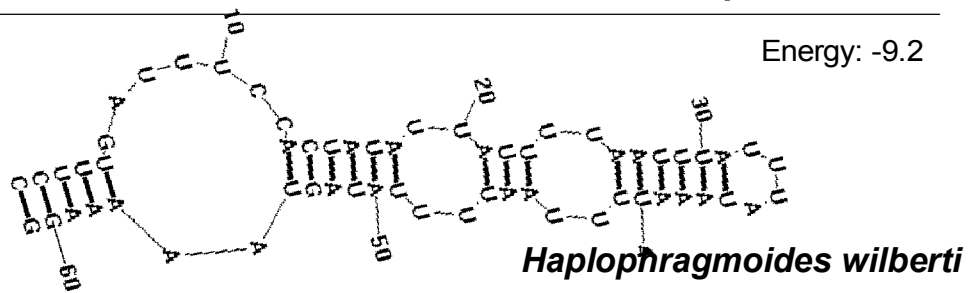
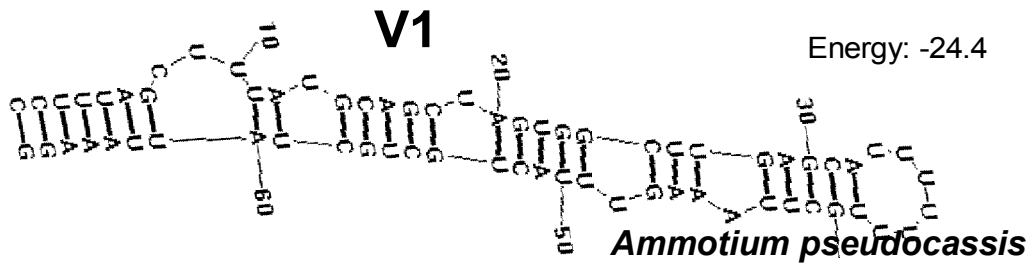
***Cibicides refulgens***

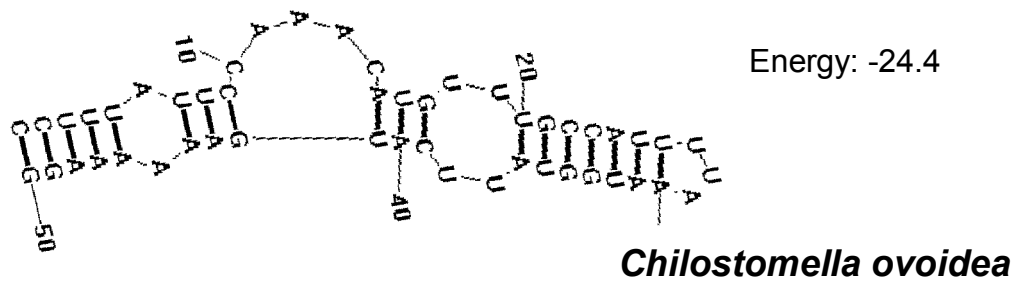
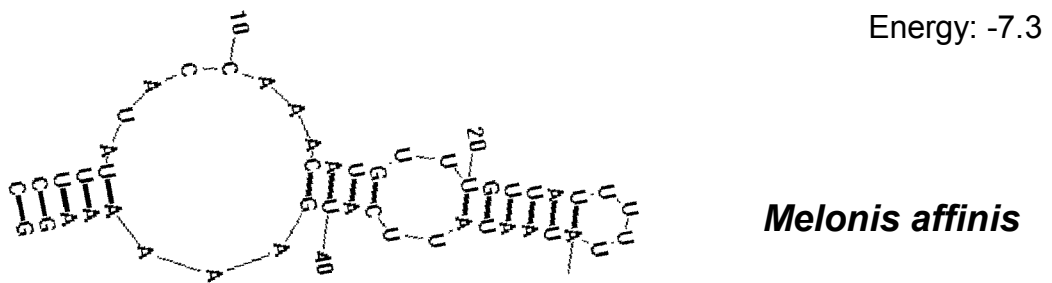
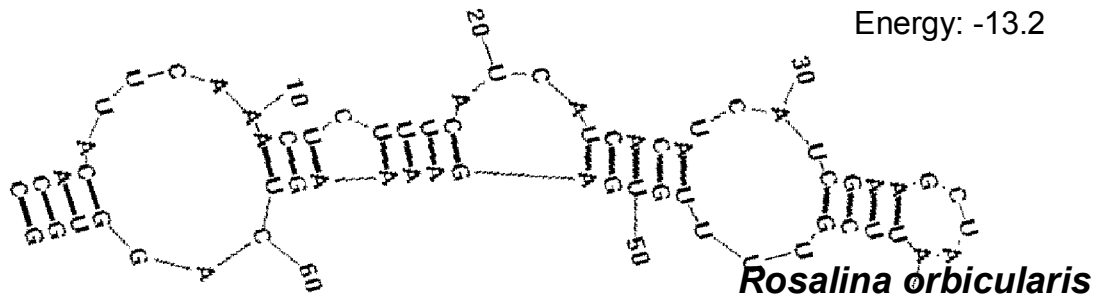
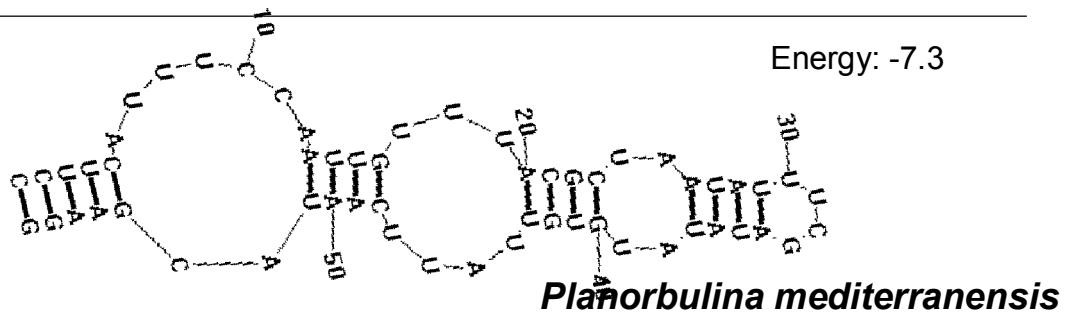
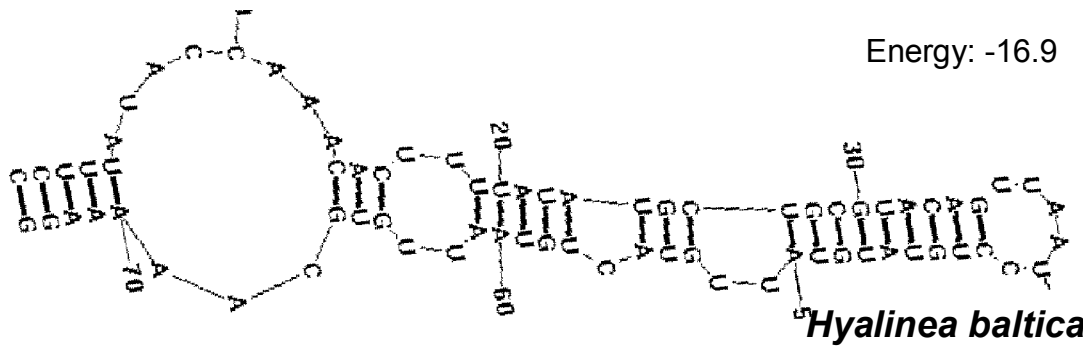
Energy: -24.4

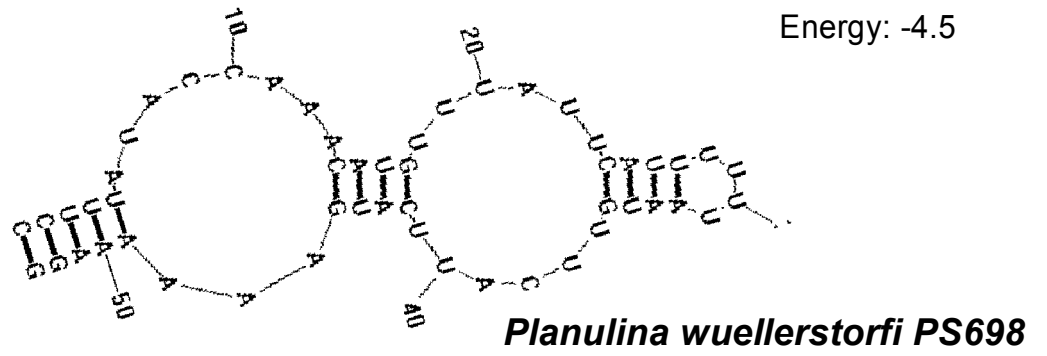
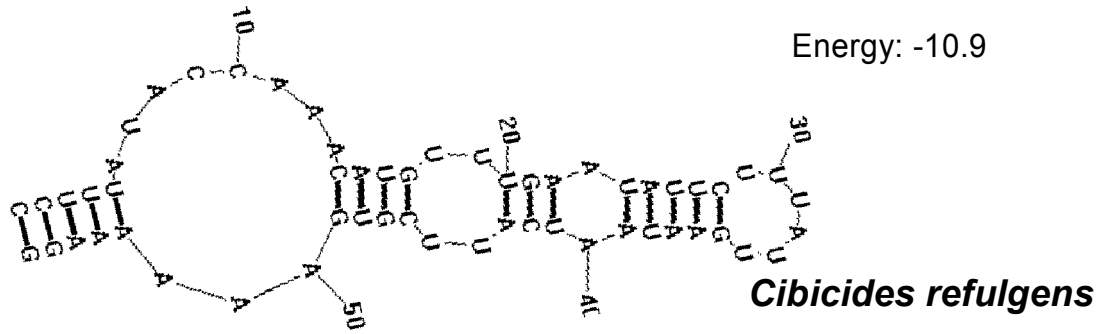


***Planulina wuellerstorfi PS698***



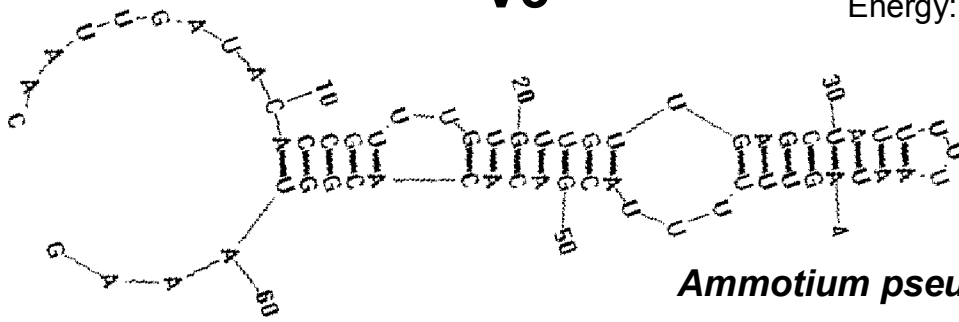






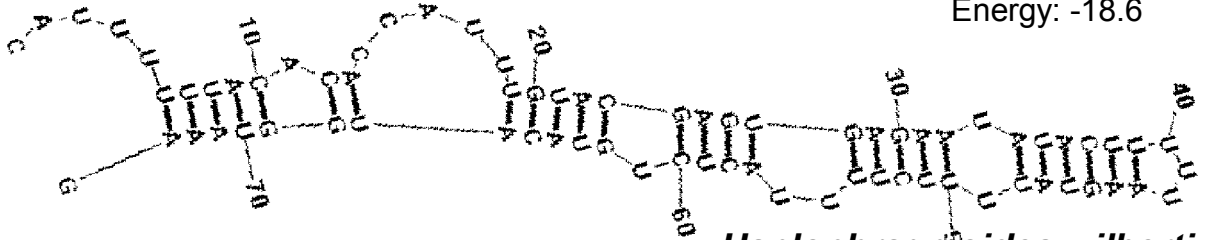
### V3

Energy: -18.7



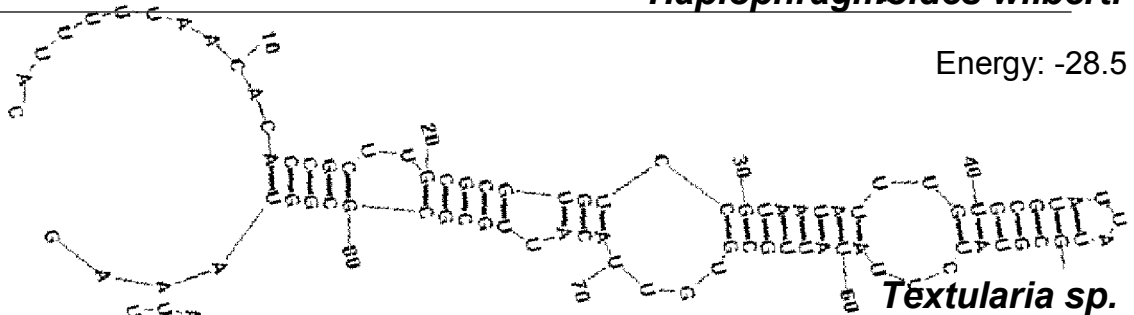
***Ammotium pseudocassis***

Energy: -18.6



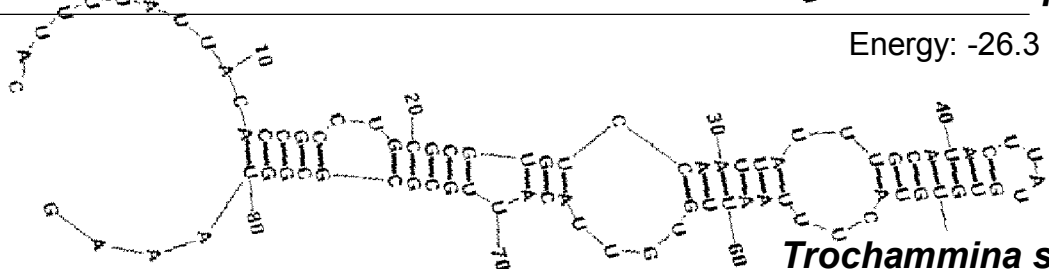
***Haplophragmoides wilberti***

Energy: -28.5



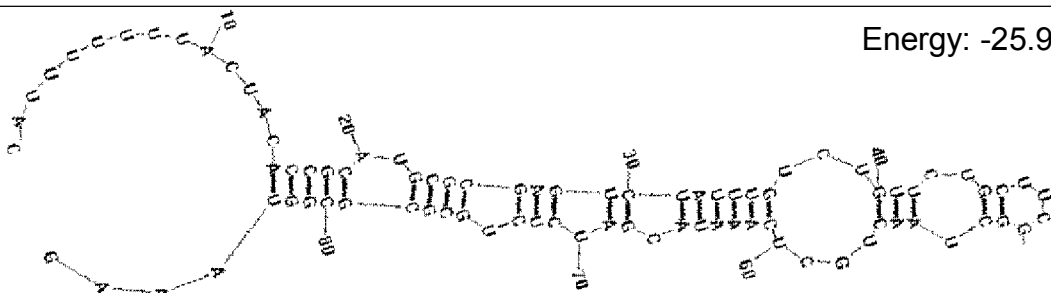
***Textularia sp.***

Energy: -26.3

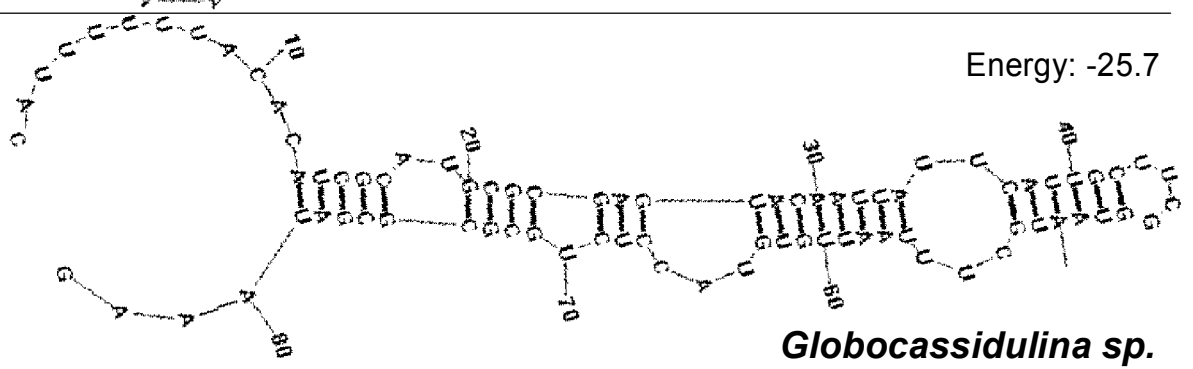
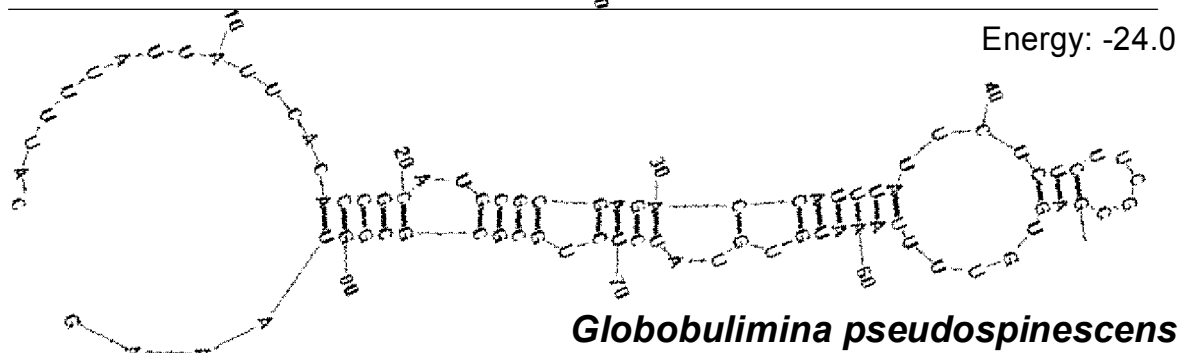
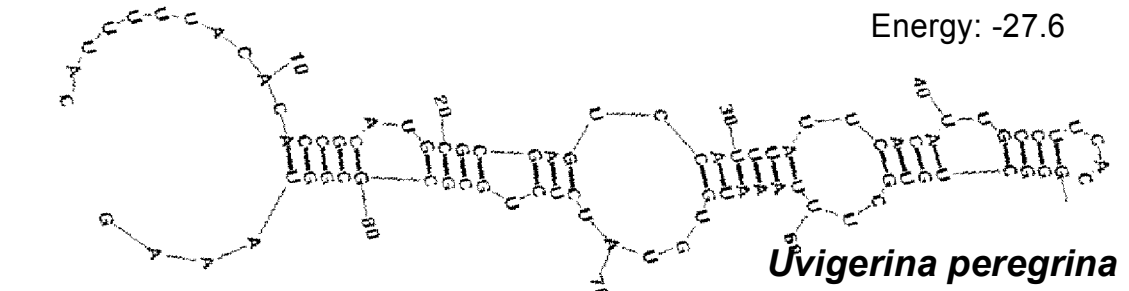
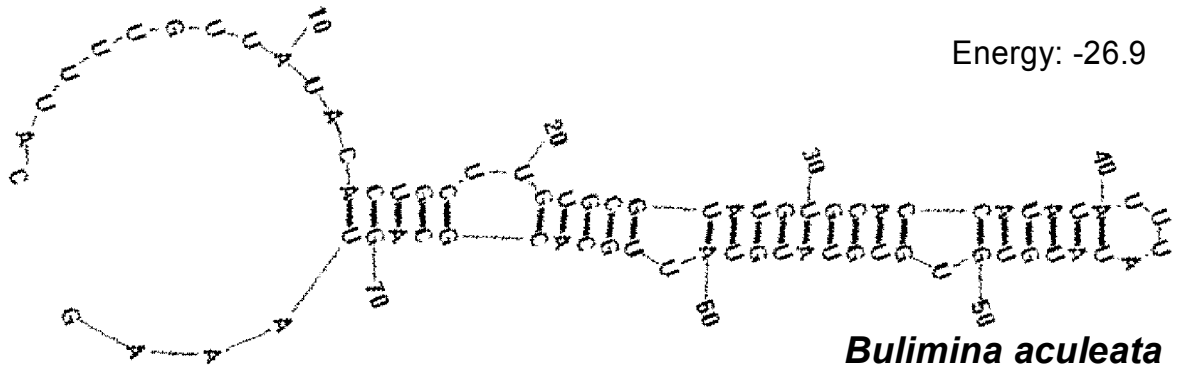


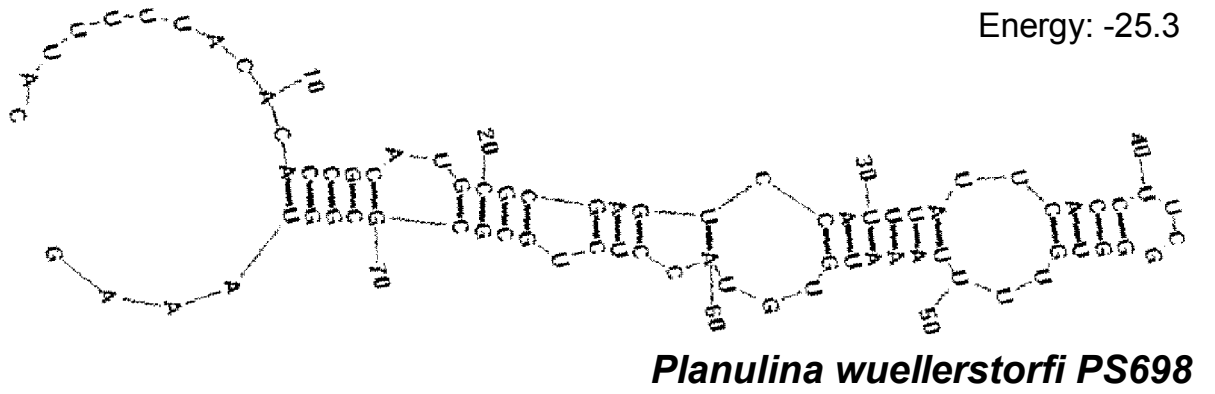
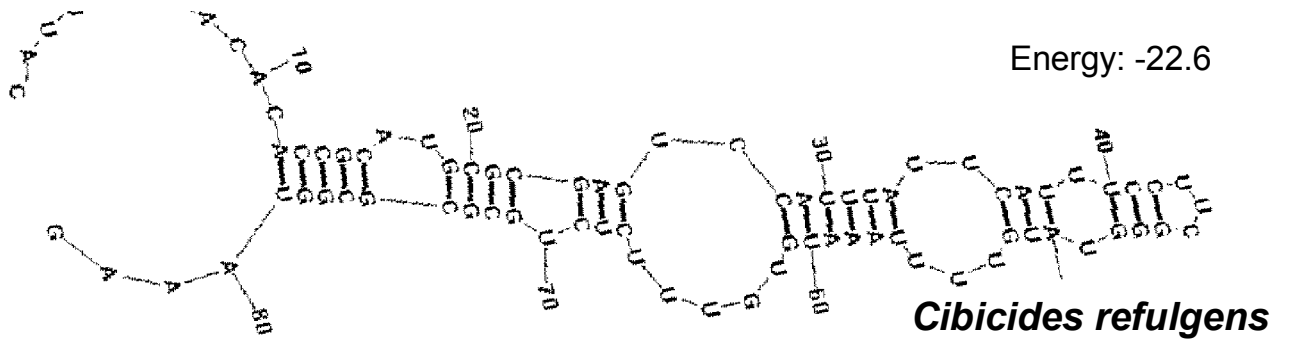
***Trochammina sp.***

Energy: -25.9



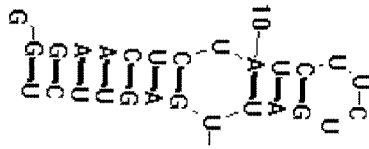
***Bolivina variabilis***





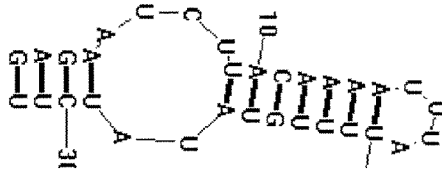
# V4

Energy: -10.8



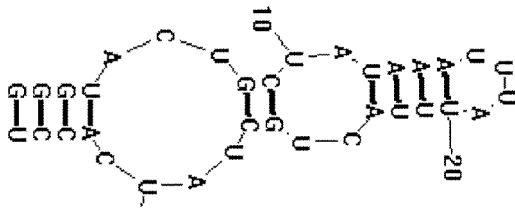
***Allogromia laticollaris***

Energy: -4.3



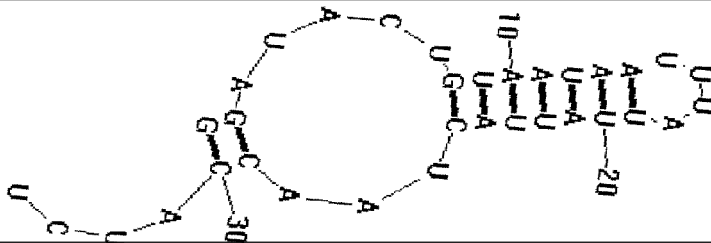
***Haplophragmoides wilberti***

Energy: -4.6



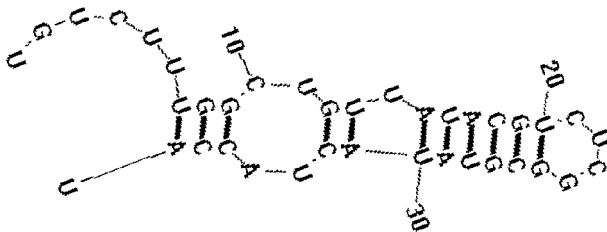
***Textularia sp.***

Energy: -4.5



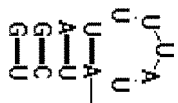
***Trochammina sp.***

Energy: -9.6



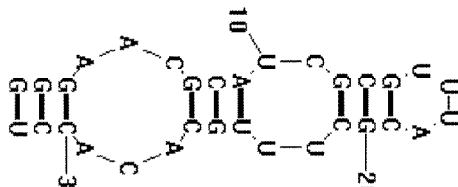
***Bolivina variabilis***

Energy: -0.3

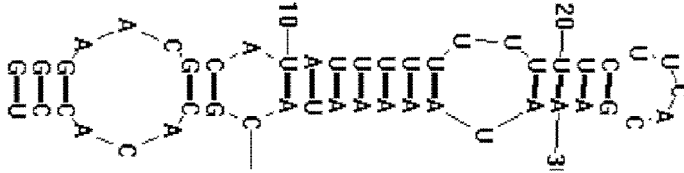


***Bulimina aculeata***

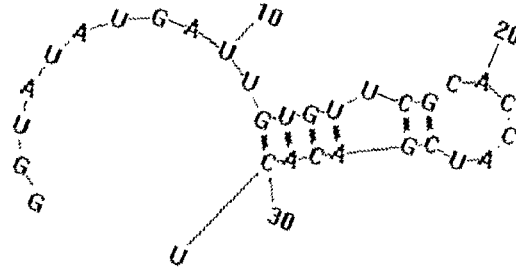
Energy: -8.8



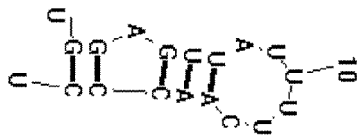
***Uvigerina peregrina***



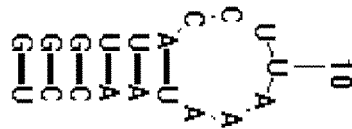
Energy: -8.1  
***Globobulimina pseudospinescens***



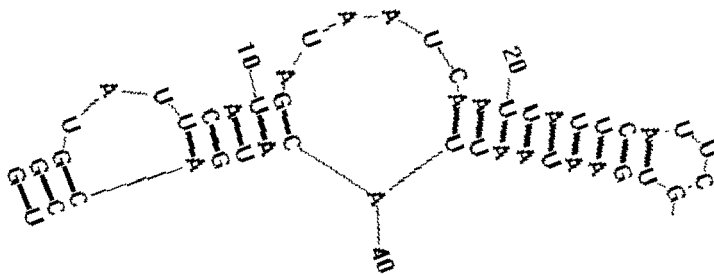
Energy: -4.2  
***Globocassidulina sp.***



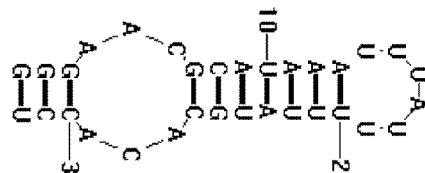
Energy: -2.0  
***Hyalinae baltica***



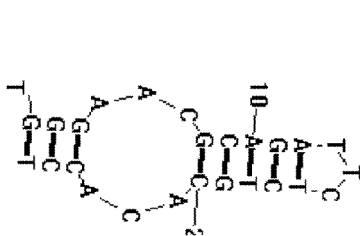
Energy: -3.4  
***Planorbulina mediterraneensis***



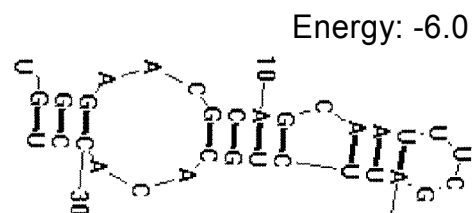
Energy: -8.4  
***Rosalina orbicularis***



Energy: -8.5  
***Melonis affinis***



Energy: -7.3  
***Chilostomella ovoidea***

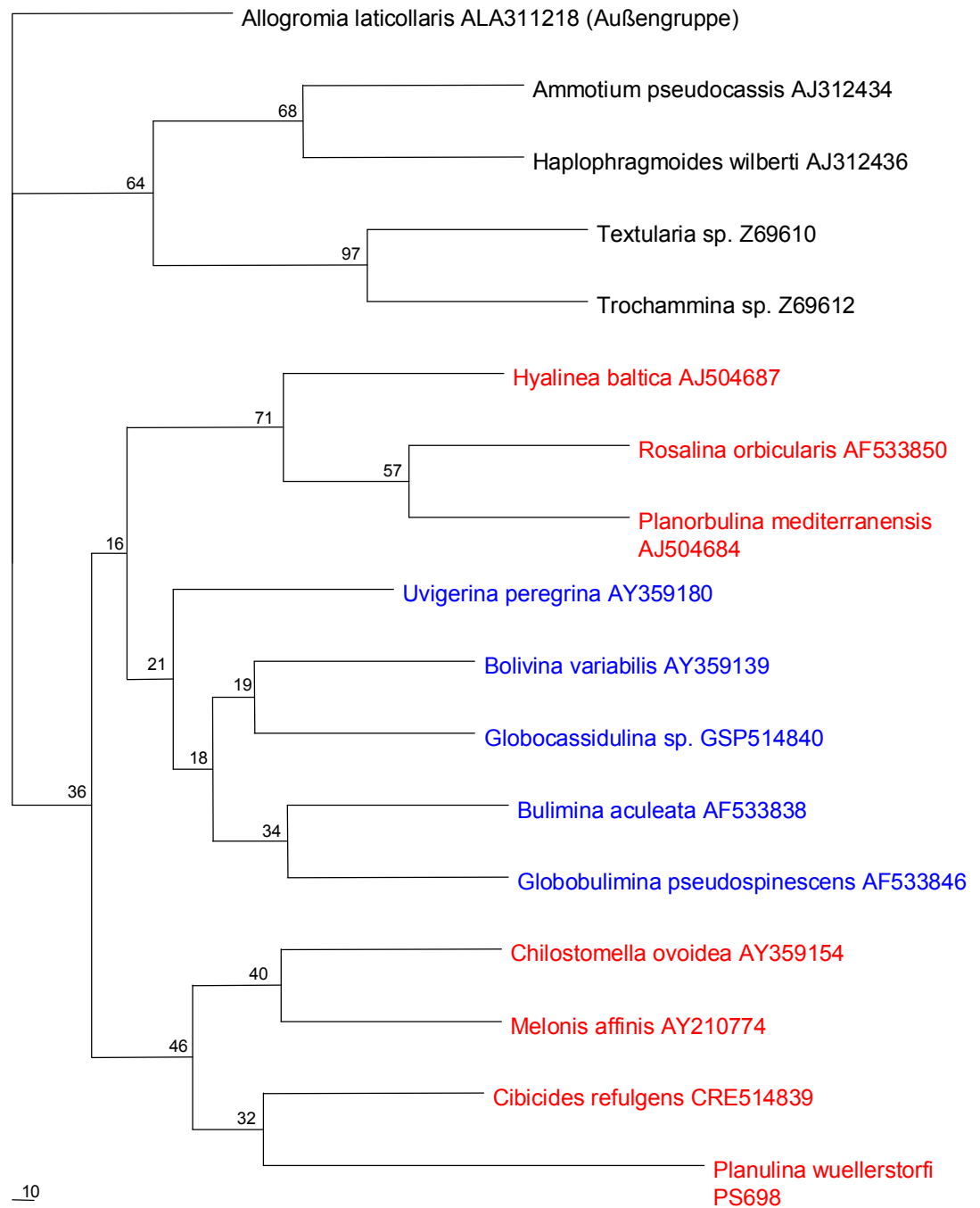


Energy: -6.0  
***Cibicides refulgens***

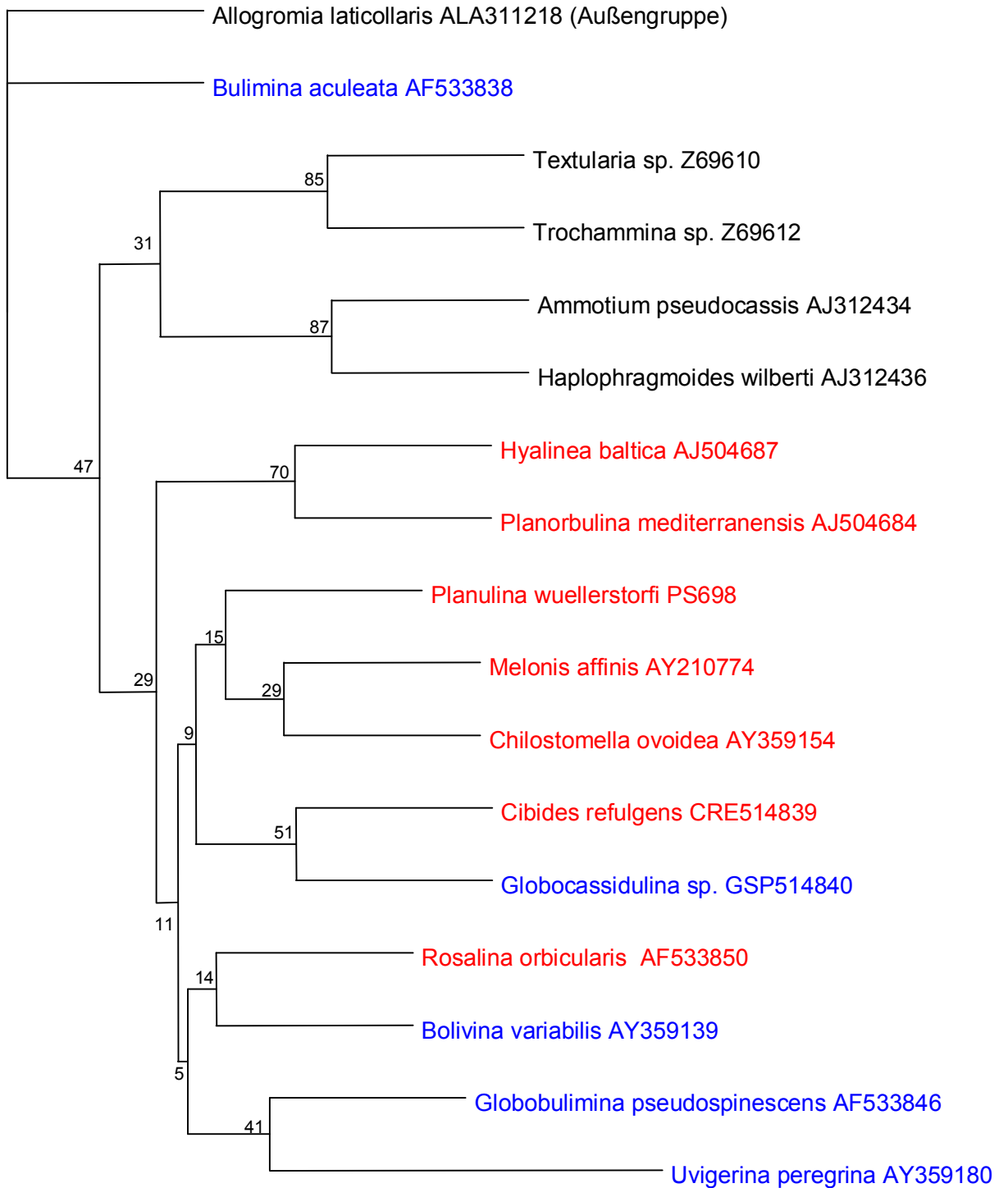


**G) Unter Einbeziehung der Sekundärstruktur-Informationen berechnete phylogenetische Stammbäume**

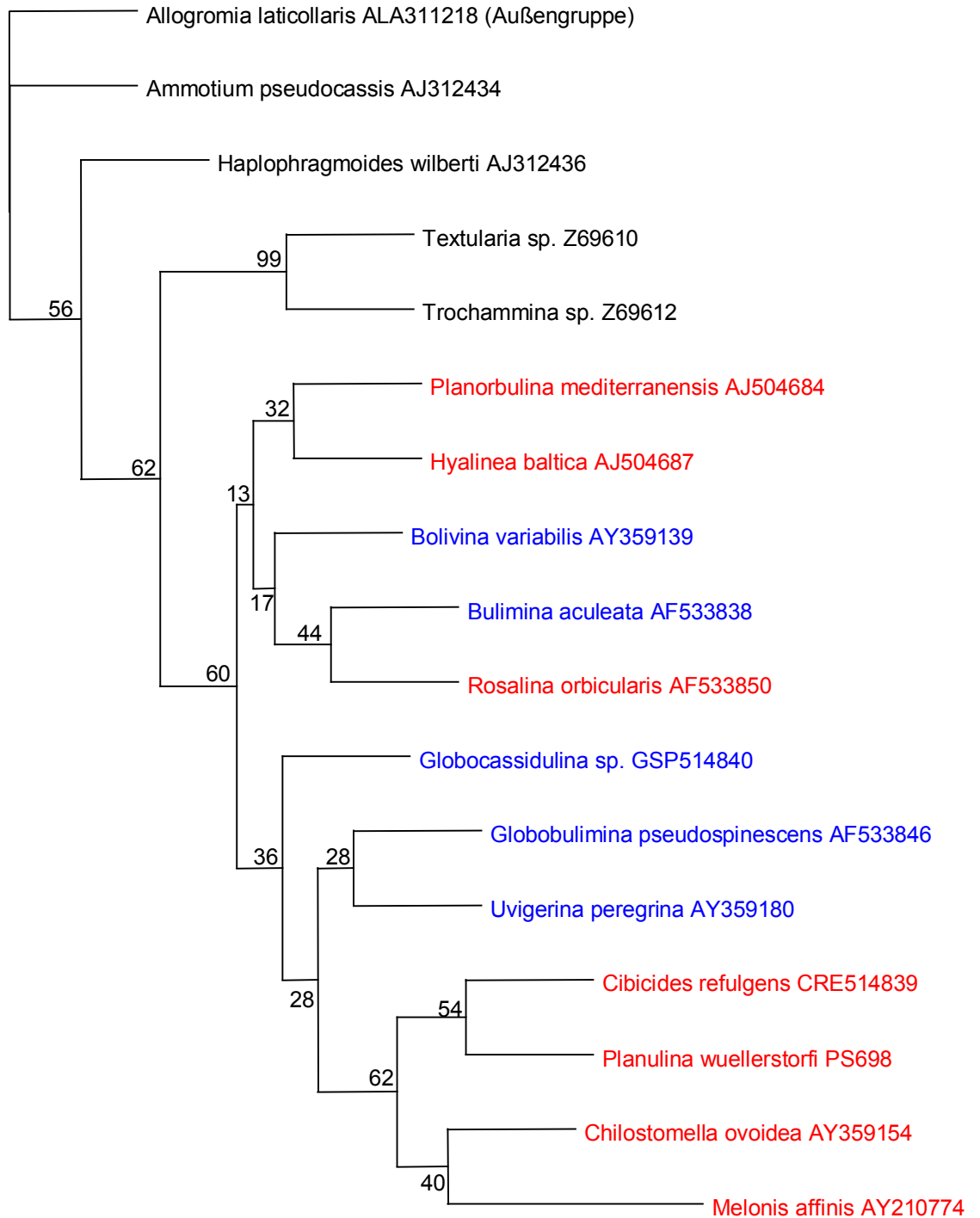
1) Maximum Likelihood, F84-Modell, PHYLIP, 100 bootstrap-Läufe




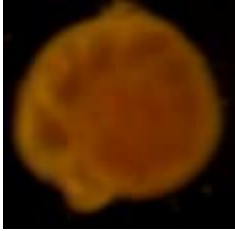
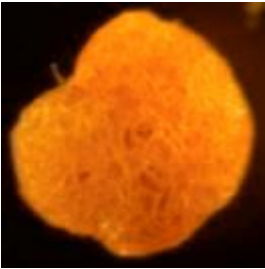
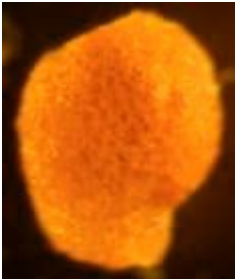


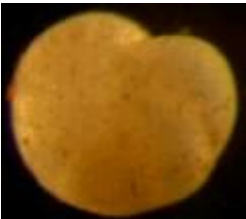



2) Maximum Parsimony, PHYLIP, 100 bootstrap-Läufe



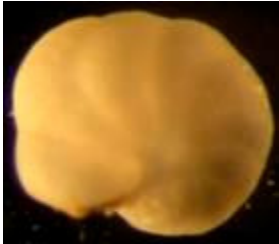
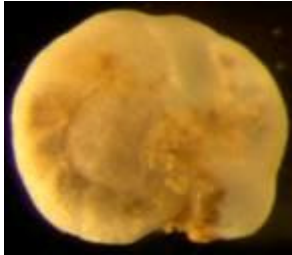




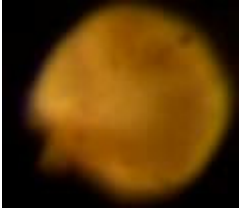










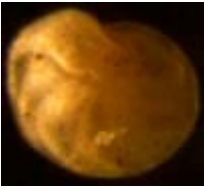



3) Evolutive Distanz, Kimura-2-Parameter






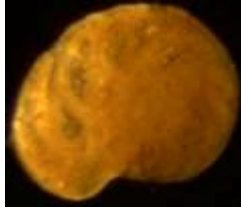

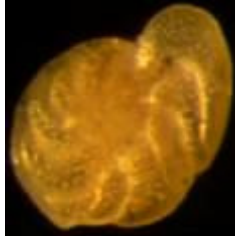



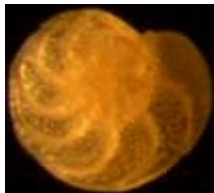


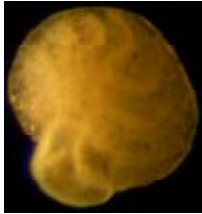






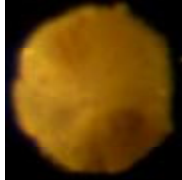

**H) Digitale Dokumentation der Individuen, von welchen Sequenzen der SSU rDNA vorliegen**

	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<b><i>Cibicides</i> sp. PS 51</b>			<b>PS64/490-1 253 m</b>
<b><i>Cribrostomoides</i> sp. PS 231</b>			<b>PS64/511-1 276 m</b>
<b><i>Cribrostomoides</i> sp. PS 234</b>			
<b><i>Cibicides lobatulus</i> PS 245</b>			
<b><i>Cibicides lobatulus</i> PS 246</b>			
<b><i>Cibicides lobatulus</i> PS 247</b>			

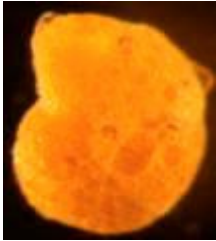




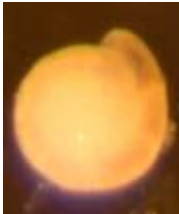

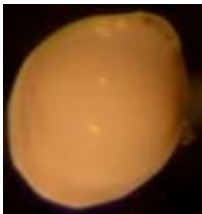


	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Cibicides lobatulus</i> PS272			PS64/511-1 276 m
<i>Cibicides lobatulus</i> PS275			
<i>Dentalina aphelis</i> PS121			PS64/508-1 1062 m
<i>Melonis sp.</i> PS122			
<i>Cibicides lobatulus</i> PS123			
<i>Triloculina sp.</i> PS124			










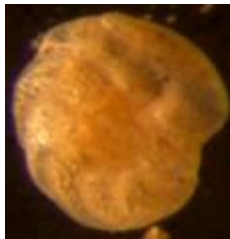
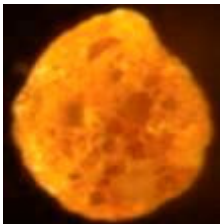
	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Eponides tumidulus</i> PS125			PS64/508-1 1062 m
<i>Cibicides lobatulus</i> PS126			
<i>Dentalina aphelis</i> PS141			PS64/506-1 1700 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS143			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS144			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS146			

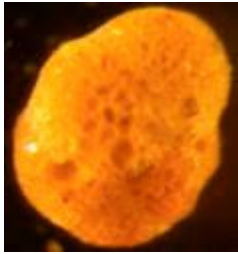
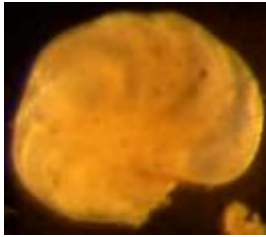
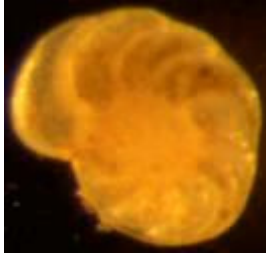

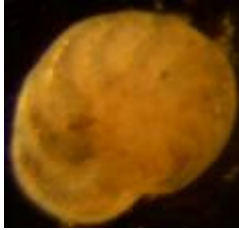
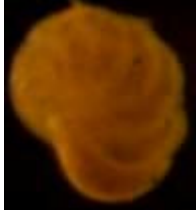

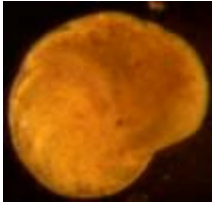



	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS147			PS64/506-1 1700 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS148			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS149			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS151			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS152			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS153			


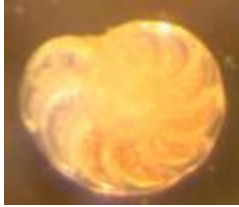
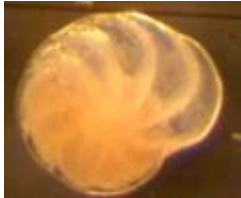
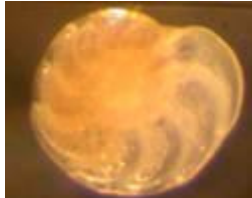
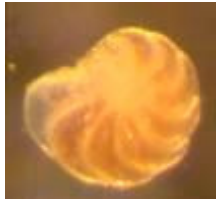





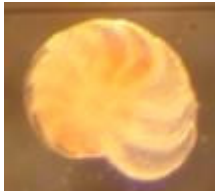
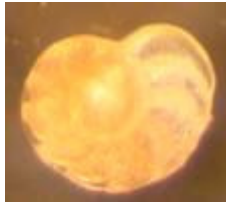
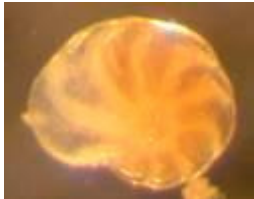
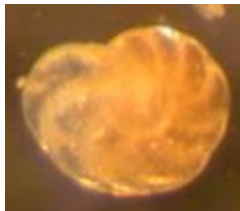
	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS154			PS64/506-1 1700 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS155			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS156			
<i>Oridorsalis umbonatus</i> PS158			
<i>Oridorsalis umbonatus</i> PS159			


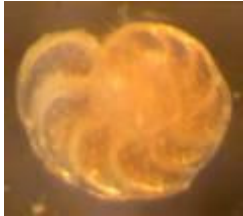
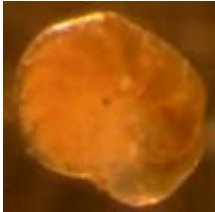
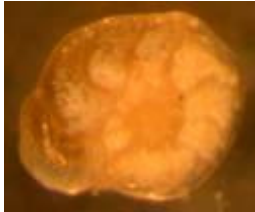



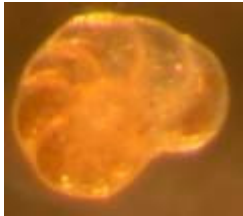
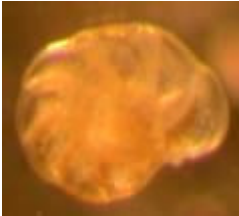
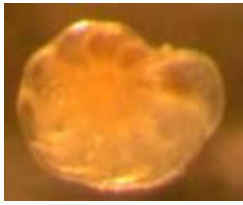
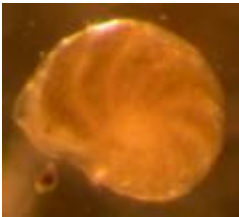




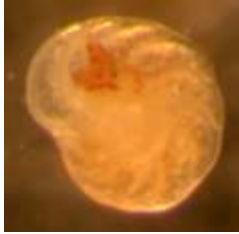
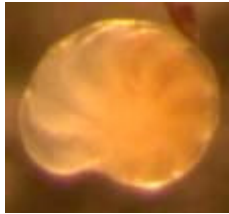





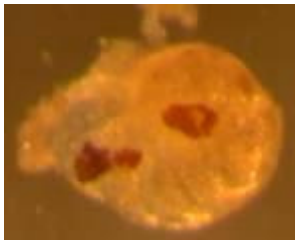
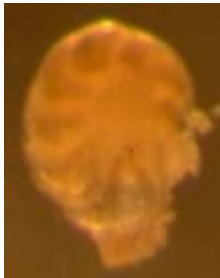
	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Cribrostomoides sp.</i> PS 210			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS579			PS64/531-1 1982 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS583			
<i>Oridorsalis umbonatus</i> PS586			
<i>Pyrgo sp.</i> PS594			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS605			

	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS610			PS64/531-1 1982 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS625			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS628			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS630			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS160			PS64/529-1 2958 m
<i>Cribrostomoides</i> sp. PS170			

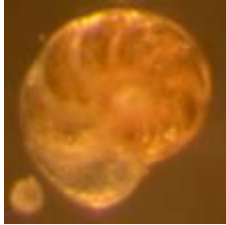
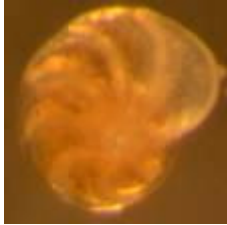
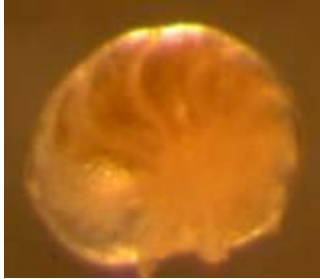



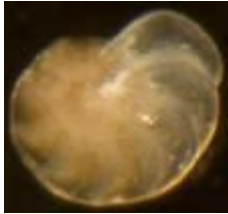
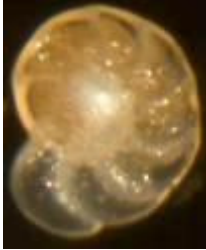

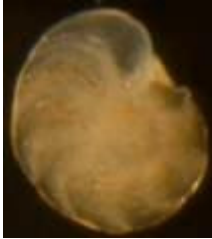


	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Cribostromoides sp.</i> PS171			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS172			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS173			PS64/529-1 2958 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS176			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS178			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS692			











	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<b><i>Planulina wuellerstorfi</i> PS694</b>			
<b><i>Planulina wuellerstorfi</i> PS696</b>			
<b><i>Planulina wuellerstorfi</i> PS697</b>			<b>PS64/529-1 2958 m</b>
<b><i>Planulina wuellerstorfi</i> PS698</b>			
<b><i>Planulina wuellerstorfi</i> PS699</b>			
<b><i>Planulina wuellerstorfi</i> PS701</b>			
<b><i>Planulina wuellerstorfi</i> PS702</b>			

	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS704			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS722			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS723			PS64/529-1 2958 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS725			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS726			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS729			

	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS733			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS738			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS739			PS64/529-1 2958 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS743			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS750			

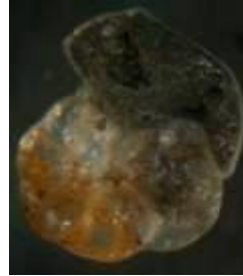


	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS753			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS756			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS757			PS64/529-1 2958 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS772			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS773			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS775			

	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS776			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS778			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS779			PS64/529-1 2958 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS790			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS791			

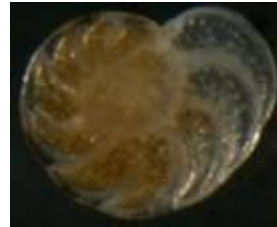


*Planulina  
wuellerstorfi*  
PS792

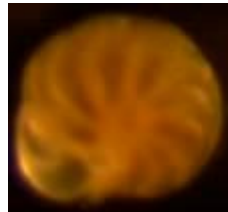


PS64/529-1  
2958 m

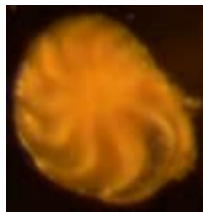
*Planulina  
wuellerstorfi*  
PS793



*Planulina  
wuellerstorfi*  
PS89



*Planulina  
wuellerstorfi*  
PS91

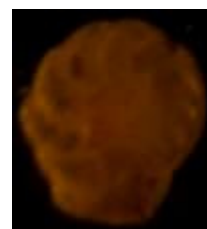



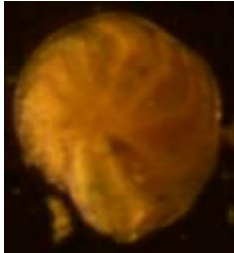

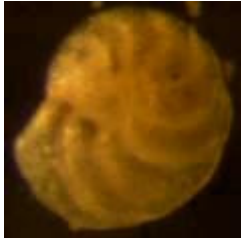
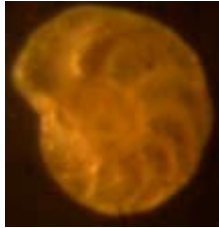
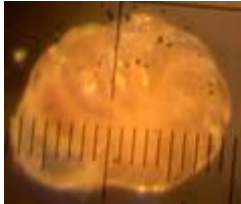



PS64/528-1  
3134 m

*Planulina  
wuellerstorfi*  
PS102



*Planulina  
wuellerstorfi*  
PS104



	Umbilicalseite	Spiralseite	Station
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS106			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS109			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS110			PS64/528-1 3134 m
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS636			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS637			
<i>Planulina wuellerstorfi</i> PS640	