

Freie Universität Berlin – Institut für Biologie



„Bestimmung von sibirischen Schneehuhnarten (*Lagopus* sp.) und ihrer Nahrungspflanzen anhand genetischer und morphologischer Untersuchungen von Kotproben“

Bachelorarbeit

eingereicht

von

Jonas Grünwald

Erstgutachterin:

Prof. Dr. Ulrike Herzsuh,

Alfred-Wegener-Institut für Polar

und Meeresforschung, Potsdam

Zweitgutachterin

Prof. Dr. Britta Tietjen

Institut für Biologie

Freie Universität Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Die Arbeit wurde zwischen dem 03.09.2014 und 26.11.2014 geschrieben. Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichere ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst habe und keine Hilfsmittel, außer den erlaubten, benutzt wurden. Weiterhin versichere ich, dass es zu keinen Interessenkonflikten kam und die Arbeit nicht bereits im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens eingereicht wurde.

Ort, Datum

Jonas Grünwald

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Ulrike Herzsuh (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Potsdam) und Prof. Dr. Britta Tietjen (Freie Universität Berlin) für ihre Bereitschaft, meine Bachelorarbeit zu korrigieren, bedanken. Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe am AWI für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsumfeld, besonders aber Dr. Laura Epp für die Hilfe im Labor und die hilfreichen Hinweise während des Schreibens der Arbeit. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die konstante Hilfe in allen Stadien der Arbeit.

Gliederung

1. Einleitung.....	01
2. Material und Methoden	
2.1. Material.....	08
2.1.1. Verwendete Chemikalien und Geräte.....	08
2.1.1.1. Extraktionen.....	08
2.1.1.2. PCR.....	08
2.1.1.3. Gelelektrophorese.....	08
2.1.1.4. Klonierung.....	08
2.1.2. Sammeln und Auswahl der Proben.....	09
2.2. Methoden	
2.2.1. Extraktion und Konzentrationsmessung.....	09
2.2.2. Amplifikation der DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	10
2.2.2.1. <i>Lagopus</i> -DNA.....	11
2.2.2.2. Pflanzen-DNA.....	11
2.2.2.3. Gelelektrophorese.....	12
2.2.3. Klonierung.....	12
2.2.4. Sequenzierung.....	13
2.2.5 Analysen.....	14
2.2.5.1. <i>Lagopus</i>	15
2.2.5.2. Pflanzen.....	16
2.2.6. Makrorestanalyse.....	17
3. Ergebnisse	
3.1. Vortest und Extraktionen.....	18
3.2. Bestimmung der Vogelarten.....	19
3.3. Genetische Identifikation der Futterpflanzen.....	22
3.4. Mikroskopische Untersuchungen der Kotproben.....	24
4. Diskussion	
4.1. DNA-Konzentrationen.....	26

4.2. Genetische Identifikation der Kotproben.....	27
4.3. Visuelle Identifikation der Kotproben.....	28
4.4. Genetische Identifikation der Futterpflanzen.....	28
4.5. Primerwahl.....	30
4.6. Mikroskopische Untersuchungen der Kotproben.....	30
4.7. Interaktion zwischen Herbivoren und Pflanzen.....	33
4.8. Schlussfolgerung.....	34
5. Zusammenfassung.....	34
6. Quellen.....	35
7. Anhang.....	43

für Mete

1. Einleitung

Ökologische Studien werden durchgeführt, um Energie- und Nährstoffflüsse, Nahrungsnetze oder interspezifische Interaktionen in einem Ökosystem zu untersuchen. Die Wechselwirkungen zwischen Biotop und Biozönose sind besonders in sich verändernden Lebensräumen von Interesse und können Aufschluss über die Verbreitungsmuster der Pflanzen und Tiere geben. Die Arktis ist solch ein sich veränderndes Ökosystem (Zhang *et al.* 2013). Die Vegetationsgrenze verschiebt sich im Zuge der Klimaerwärmung seit Jahrzehnten nach Norden, mit gleichzeitiger Verdrängung der Tundra. Dieses Phänomen ist in der gesamten borealen Zone zu beobachten und wird als „arctic greening“ oder „shrubification“ bezeichnet (Frost und Epstein 2013, Blok *et al.* 2011). Gleichzeitig werden insbesondere Pflanzen wie *Salix* sp., *Betula* sp. und *Alnus* sp. durch Herbivore in ihrer Ausbreitung beeinflusst (Ravolainen *et al.* 2014, Zamin & Grogan 2013, Plante *et al.* 2013, Gough *et al.* 2012, Olofsson *et al.* 2009). Obwohl die Schwesterarten Moorschneehuhn (*Lagopus lagopus* Linnaeus 1758) und Alpenschneehuhn (*Lagopus mutus* Montin 1776) zirkumpolar sympatrisch in großer Zahl vorkommen (Quintela *et al.* 2010), sind die Auswirkungen von pflanzenfressenden Vögeln auf die Flora bisher nicht ausreichend untersucht (Christie *et al.* 2014).

Die Verschiebung der Baumgrenze bedeutet für die Art *L. mutus* eine Verkleinerung ihres Lebensraumes, da der Vogel im Vergleich zu *L. lagopus* die vegetationsarme Tundra bevorzugt. Obwohl die IUCN die Schwesterarten als nur gering gefährdet einstuft (<http://www.iucnredlist.org/>, Stand 10.09.2014) sind 25% der Populationen rückläufig (Storch 2007). Eine *L. mutus*-Population in den Alpen gilt als besonders bedroht (Revermann *et al.* 2012). Ursächlich für den Rückgang sind vor allem Verlust, Zerstörung und Fragmentierung der Habitate, sowie speziell in Asien die Ausbreitung des Menschen. Durch die schwere Zugänglichkeit ihrer Habitate sind die *Lagopus*-Arten aber relativ gut geschützt (Storch 2007). Für die Erhebung ökologischer Daten in einem großen Gebiet wie Sibirien stellt die eingeschränkte Erreichbarkeit eine Herausforderung dar.

Bei Untersuchungen zur Ernährung steht meist nicht genügend Zeit für Beobachtungen zur Verfügung und für Analysen des Mageninhalts müssen die Tiere gefangen und

häufig getötet werden. Eine nicht-invasive und vom eigentlichen Tier unabhängige Methode ist die Untersuchung von Kotproben, die gesammelt und im heimischen Labor untersucht werden können. Mithilfe der gentechnischen Methode des Barcodings können zeitgleich viele Proben kostengünstig bearbeitet werden.

In dieser Arbeit soll erprobt werden, ob sich nicht-invasive, molekulargenetische Barcoding-Techniken dazu eignen, die *Lagopus*-Arten und ihr Nahrungsspektrum zu bestimmen, und somit Rückschlüsse auf Wechselwirkungen mit ihrem Biotop zulassen. Diese Barcodes sind spezifische Bereiche der DNA, die in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Durch Sequenzierung des PCR-Produkts und Abgleich der Nukleotidfolge mit einer Referenzdatenbank, kann dann die Art bestimmt werden. Mit den vier Nukleotiden der DNA reicht theoretisch eine Sequenz von 15 Nukleotiden aus, um über eine Milliarde individuelle Stränge zu erhalten. Das entspricht 100 mal mehr möglichen Codes als es vermutlich Arten auf der Erde gibt (Hebert *et al.* 2003b).

In der Praxis gestaltet sich die Suche nach nützlichen Barcodes allerdings als schwieriger, da einige Kriterien erfüllt werden müssen (Valentini *et al.* 2008, Epp *et al.* 2012, Taberlet *et al.* 2006). Die perfekte Zielregion (Marker) sollte interspezifisch divers genug sein, also eine höhere Evolutionsrate aufweisen, um verschiedene Arten sicher voneinander unterscheiden zu können. Gleichzeitig muss sie intraspezifisch moderat evolvieren, um die Bildung von Scheintaxa zu vermeiden. Der Marker muss robust amplifizieren und die Bindungsstellen der Primer müssen hochkonserviert sein, um eine Amplifizierung zu ermöglichen. Idealerweise sollte die Region ausreichend phylogenetische Information enthalten, um auch unbekannte oder unbeschriebene Arten einem Taxon zuordnen zu können. Sind diese Anforderungen mehr oder weniger erfüllt kann der Marker als standardisierter Barcode für ein bestimmtes Taxon benutzt werden. Mittlerweile gibt es mehrere mögliche Marker, wie zum Beispiel den internal transcribed spacer (ITS) der ribosomalen RNA (rRNA) als Standard für Pilze (Schoch *et al.* 2011), die Kombination der Standardmarker für Pflanzen *rbcL* und *matK* aus plastidkodierenden Genen (Hollingsworth *et al.* 2011), oder den mitochondriellen 16S rRNA Marker für Tiere (Vences *et al.* 2005). Als Standardbarcode für Tiere hat sich allerdings die Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 1 (COI/*coxI*) aus der Atmungskette der Mitochondrien durchgesetzt (Hebert *et al.* 2003a, b). Vorteilhaft daran ist die große

Verfügbarkeit mitochondrieller DNA in den Zellen und eine den Kriterien entsprechende Evolutionsrate (Hebert *et al.* 2003b, Hebert *et al.* 2004a).

Obwohl alle bisherigen Marker nicht ideal sind (Taberlet *et al.* 2006) und die Markerwahl der jeweiligen Studie angepasst werden muss, finden sie doch breite Anwendung. Es kann illegaler Handel mit geschützten Arten aufgedeckt werden (Ogden *et al.* 2008, Domingo-Roura *et al.* 2005) oder die Diversität aus naturschützerischen (Smith *et al.* 2005) bzw. medizinischen Gründen (Ashfaq *et al.* 2014) ermittelt werden. Ebenso kann die Ausbreitung einer Art nachvollzogen (Valière *et al.* 2003) oder es können neue Arten entdeckt werden (Hebert *et al.* 2004b, Moura *et al.* 2007). Möglich ist die Extraktion von DNA auch aus ungewöhnlicheren Quellen wie Ethanol (Hajibabaei *et al.* 2012) und Pfotenabdrücken (Dalén *et al.* 2007). Ebenfalls ist der Nutzen des Barcodings für das Erforschen von interspezifischen Interaktionen (García-Robledo *et al.* 2013) und der Ernährungsgewohnheiten von Carnivoren (Deagle *et al.* 2007) und Herbivoren (Budarf *et al.* 2011) durch molekulargenetische Kotanalysen erkannt worden.

Um etwas über die Ernährungsgewohnheiten einer Art zu erfahren, gibt es verschiedene Möglichkeiten (Pompanon *et al.* 2012). Dazu gehören das schon erwähnte Beobachten des Fressverhaltens, ebenso wie die Untersuchung des Mageninhalts bzw. des Kots der Tiere. Dabei kann auf verschiedene Techniken zurückgegriffen werden: Analyse der Alkane von Blättern (Dove & Mayes 1996), Infrarot-Reflektionsspektroskopie (Kaneko & Lawler 2006), Isotopenanalyse (Ponsard & Arditì 2000, Soininen *et al.* 2014), Protein-Elektrophoretik (Walrant & Loreau 1995), mikrohologische Untersuchungen (Soininen *et al.* 2009), sowie Barcoding mit Klonierung (Deagle *et al.* 2007) und Metabarcoding mit Next-Generation Sequenzierung (NGS) (Valentini *et al.* 2009, Shehzad *et al.* 2012, Baamrane *et al.* 2012, Soininen *et al.* 2013, Mollot *et al.* 2014).

Die besondere Schwierigkeit bei der genetischen Arbeit mit Kot- oder Magenproben besteht darin, dass die DNA stark fragmentiert ist und organisches Material unterschiedlicher Tier- und Pflanzenarten enthält. Diese wird als Umwelt-DNA bzw. environmental DNA (eDNA) bezeichnet und ist auch z.B. im Boden, im Wasser oder in der Luft vorhanden und deshalb von großem Nutzen für die Biologie (Taberlet *et al.* 2012). Auch lebendige Mikroorganismen können vorhanden sein (Bohmann *et al.* 2014, Valentini *et al.* 2008), weswegen eDNA zuerst in der Mikrobiologie Verwendung

fand (Taberlet *et al.* 2012). Außerhalb der Zelle zerfällt DNA aus Haaren, Speichel, Kot, Pollen oder sonstigen verrottenden Tieren und Pflanzen (-teilen) in Bruchstücke von kurzer Basenpaarlänge (bp) (Bohmann *et al.* 2014). Verursacht wird dieser Prozess durch Umwelteinflüsse wie Temperatur, UV-Strahlung, Feuchtigkeit und DNase aus Mikroorganismen (Lindahl 1993, Shapiro 2008, Dejean *et al.* 2011). Aufgrund der Vielzahl der möglichen Faktoren ist es schwierig, den Zerfallsgrad der DNA vorherzusagen, allerdings gibt es Ansätze diesen in Erde (Levy-Booth *et al.* 2007, Pietramellara *et al.* 2008), Süßwasser (Dejean *et al.* 2011), Kot (Deagle *et al.* 2006) oder Knochen (Allentoft *et al.* 2012) zu bestimmen, um die richtige Technik zur DNA-Bearbeitung zu ermitteln. Unter optimalen Bedingungen kann amplifizierbare DNA mehrere tausend, bis zu hunderttausenden Jahren verwertbar sein (Willerslev & Cooper 2005, Willerslev *et al.* 2007). Proben solchen Alters werden im verwandten Forschungsfeld der alten-DNA bzw. ancient DNA (aDNA) untersucht, wobei die DNA aufgrund des Alters noch fragmentierter ist. Die entwickelten Methoden und Arbeitsweisen im Umgang mit der aDNA, insbesondere um Kontaminationen zu vermeiden, werden deshalb auf die eDNA übertragen (einen Überblick geben Willerslev & Cooper 2005, García-Robledo *et al.* 2013). Eine ausführliche Darstellung zu Nutzungsmöglichkeiten von eDNA findet sich bei Bohmann *et al.* (2014).

Die starke Fragmentierung der eDNA macht es häufig unmöglich, die Standardbarcodes mit 500 bp bis 800 bp Länge (Schoch *et al.* 2011) zu benutzen. Zusammen mit dem Fortschritt im Bereich der Next-Generation Sequenzierer (NGS) und der Verbesserung der eingesetzten Polymerasen (Shapiro 2008) kam es zur Entwicklung des Metabarcoding (Taberlet *et al.* 2012). Zielt das Barcoding darauf ab, eine einzelne Probe bis auf das Artniveau zu bestimmen (Barcoding *sensu stricto*), wird das Metabarcoding meistens dazu genutzt, in einer Umweltprobe alle Arten einer Organismengruppe zu identifizieren. Dabei ist die taxonomische Auflösung durch den Einsatz gruppenspezifischer Primer aber meist geringer (Barcoding *sensu lato*) (Valentini *et al.* 2008). Diese können die wesentlich kürzeren Marker von bis zu 150 bp, die für die fragmentierte DNA verwendet werden, amplifizieren (zum Primerdesign siehe Epp *et al.* 2012). Für Pflanzen (Angio- und Gymnospermen) hat sich die P6 Schleife des *trnL* (UAA) Chloroplastenintrons als wirkungsvoll herausgestellt und dieser funktioniert auch bei fragmentierter DNA aus Kotproben zuverlässig (Valentini *et*

al. 2008). Der mit den *trnL_g* und *trnL_h* amplifizierbare Bereich beträgt 10-143 bp (Taberlet *et al.* 2007).

Um die NGS ideal nutzen zu können, wird die DNA während der PCR mit Primern amplifiziert, die mit individuellen molekularen Identifikationssequenzen markiert sind (Binladen *et al.* 2007). Werden für jede Probe eigens markierte Primer verwendet, können alle PCR-Produkte in einem Durchgang sequenziert werden (Valentini *et al.* 2009, Pompanon *et al.* 2012). Anschließend können die Sequenzen durch die individuellen Identifikationssequenzen bioinformatisch der Ausgangsprobe zugeordnet werden (Ji *et al.* 2013). Die klassische Methode benötigt den Schritt des Klonierens, bei dem die PCR-Produkte mittels eines Vektors in Bakterien eingeschleust werden. Jeder Vektor enthält nur ein Produkt und jede Zelle nimmt nur einen Vektor auf. Dadurch können Amplifikate getrennt und einzeln sequenziert werden (Valentini *et al.* 2008).

Die Vorteile des Barcodings und Metabarcodings liegen darin, dass die Technik auf alle Ontogenesestadien wie Eier, Puppen oder Larven anwendbar und kein spezielles taxonomisches Wissen erforderlich ist (Savolainen *et al.* 2005). Kleine Probenmengen liefern ausreichend DNA und auch kleine Labore mit wenig Personal können viele Proben bearbeiten. Daraus ergibt sich eine große Kosten- und Zeitersparnis (Valentini *et al.* 2008, Ji *et al.* 2013). Die Kosten für die Nutzung von NGS halbierten sich in den letzten Jahren schätzungsweise alle fünf Monate (Yoccoz *et al.* 2012) und wurden damit für die breite Anwendung zugänglich. Diese Vorteile ermöglichen den Einsatz der Methoden vor allem bei großangelegten (ökologischen) Studien (Valentini *et al.* 2008). Nachteile bestehen in der Kontaminationsgefahr der Proben und daraus resultierenden falsch positiven Ergebnissen, also darin, Taxa zu bestimmen, die in der Probe gar nicht vorkommen (Willerslev & Cooper 2005). Eine Nicht-Amplifikation (falsch negativ) kann dazu führen, dass ein Taxon nicht entdeckt wird, obwohl es vorhanden ist (Ji *et al.* 2013). Dies kann beispielsweise vorkommen, wenn bei Carnivoren die starke Präsenz der eigenen DNA die der Beute überdeckt. Durch den Einsatz von DNA-Blockern kann dieser Effekt verhindert werden (Pompanon *et al.* 2012). Die Bildung von Produkt-Chimären und Primerdimeren durch Fehler in der PCR kann ebenfalls zu Komplikationen führen (Shehzad *et al.* 2012).

Mit dem Wissen über diese und weitere Vor- und Nachteile findet das Metabarcoding zum Beispiel Anwendung in der Rekonstruktion von rezenten und vergangenen

Ökosystemen (Epp *et al.* 2012), im Aufspüren invasiver Arten aus Wasserproben (Dejean *et al.* 2012) oder in der Ermittlung der Abundanz von Würmern aus Erdproben (Bienert *et al.* 2012).

Die Zahl der Publikationen zur Ernährung bei Moorhühnern ist seit den 1980er Jahren rückläufig und diese beruhen hauptsächlich auf Analysen des Kropfinhalts. Bisher gibt es keine Studie zur Ernährung von *L. lagopus* und *L. mutus*, die auf Metabarcoding beruht. Dagegen haben Veröffentlichungen zu Habitaten, Populationen und Genetik in den letzten Jahren zugenommen (Moss *et al.* 2010).

Diese Pilotstudie soll dazu dienen, eine übergreifende Methode zu erproben und Untersuchungen zu Genetik, Ernährung und Habitat zu vereinen. Dazu wurden Kotproben von *Lagopus* mithilfe des COI-Markers einer *Lagopus* Art zugeordnet und das Nahrungsspektrum durch Metabarcoding der *trnL*-Region mit *g/h*-Primern ermittelt. Die Proben stammen aus der Region um Chatanga, Krasnojarsk, Sibirien, und wurden an drei Standorten nahe der Baumgrenze gesammelt. Von den Sammelorten liegen Vegetationsaufnahmen bzw. Deckungsgrade vor, die mit den Ergebnissen der Nahrungsanalyse verglichen werden. Des Weiteren wurden die Kotproben unter dem Stereomikroskop untersucht und die Ergebnisse mit denen des Metabarcodings verglichen.

Konkret werden folgende Fragen in dieser Arbeit behandelt:

1. Von welcher Vogelart stammen die jeweiligen Kotproben und wie lassen sie sich unterscheiden?
2. Eignen sich die Methoden, um das Nahrungsspektrum der Vogelarten aufzudecken und ist eine Nutzung von NGS möglich?
3. Decken sich die Ergebnisse der genetischen und der mikroskopischen Analysen?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Chemikalien und Geräte

2.1.1.1. Extraktionen

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Qubit [®] 2.0 Fluorometer	Invitrogen/Life Corp., Carlsbad, CA, USA

2.1.1.2. PCR

Platinum [®] Taq DNA Polymerase HiFi	Invitrogen/Life Corp., Carlsbad, CA, USA
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Invitrogen/Life Corp., Carlsbad, CA, USA
Taq DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP mix, 2.5 mmol/l	Qiagen, Hilden, BRD
BSA (UV, 20 mg/ml)	VWR International, Darmstadt, BRD
H ₂ O (DEPC behandelt)	GBiosciences, St. Louis, MO, USA
MgSO ₄ (UV, 50 mmol/l)	Invitrogen/Life Corp., Carlsbad, CA, USA
MinElute [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, BRD
AirClean [®] Systems AC600 PCR Hood	AirClean [®] Systems, Creedmoor, NC, USA
TProfessional Basic Thermocycler	Biometra, Göttingen, BRD
iCycler	Bio-Rad Laboratories, München, BRD
Reaktionsspezifische Primer (siehe Text)	Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA

2.1.1.3. Gelelektrophorese

10x TAE Puffer	AppliChem, Darmstadt, BRD
GelRed DNA staining	Biotium, Hayward, CA, USA
6x DNA loading dye	Thermo Scientific, Dreieich, BRD
O'range Ruler DNA ladder 50 bzw. 500 bp	Thermo Scientific, Dreieich, BRD

2.1.1.4. Klonierung

Kanamycin A, 50 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PeqLab Electroporation Cuvettes, steril	PeqLab GmbH, Erlangen, BRD

Rotigarose [®] agarose	Carl Roth, Karlsruhe, BRD
LB agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SOC culture medium	Invitrogen/Life Corp., Carlsbad, CA, USA
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit for Sequencing	Invitrogen/Life Corp., Carlsbad, CA, USA
MicroPulser [™]	Bio-Rad Laboratories, München, BRD
Herasafe [™] Biological Safety Cabinets	Thermo Scientific, Dreieich, BRD

2.1.2. Sammeln und Auswahl der Proben

Die Kotproben wurden im Zeitraum Juli/August 2013 an drei verschiedenen Standorten im Baumgrenzenökoton in der Nähe von Chatanga, Sibirien, gesammelt und die GPS-Daten protokolliert (Tab. 1). Der Sammelpunkt 13-TY-09 (09) ist der südlichste Punkt mit dem größten Baumbestand (Abb. 4b). Der am nördlichsten gelegene und baumärmste ist 13-TY-02 (02), wobei 13-TY-04 (04) nur ca. 20 km südlicher gelegen ist (Abb. 4a, b). An den Standorten 04 und 09 wurde in einer Aufnahme­fläche von 20x20 m die Vegetation aufgenommen (durch Bastian Niemeyer) und die darauf befindliche Fäzes gesammelt. Dieser wurde vor Ort in Tüten mit Silicagel gelagert und nach der Rückkehr ans Alfred-Wegener-Institut eingefroren. Am Standort 02 wurde die Fäzes auf einer weitläufigeren Fläche eingesammelt und die Vegetationsaufnahmen wurden nur als Kreis­aufnahmen an einer zentralen Stelle der Aufnahme­fläche gemacht. Zu Darstellungszwecken wurden aus den Vegetationsdaten die Mittelwerte der Deckungsgrade der angio- und gymnospermen Pflanzen (12 Arten) für jeden Standort berechnet und die Summe der Mittelwerte als 100% definiert. Die Anteile der einzelnen Pflanzen am Deckungsgrad pro Standort wurden berechnet und in einem Diagramm dargestellt.

Es wurden 25 Proben von unterschiedlichen Standorten für die Extraktionen ausgewählt.

2.2. Methoden

2.2.1. Extraktion und Konzentrationsmessung

Um mit den Kotproben genetische Analysen durchführen zu können, muss zuerst die

DNA aus der Probe extrahiert werden. Die Extraktion beginnt mit der Freisetzung der Nukleinsäuren aus den Zellen (Lyse) und deren Lösung in einem Lysepuffer. Das Lysat wird anschließend mehrfach gewaschen und zentrifugiert, wodurch die DNA an eine Silicamembran gebunden und andere Stoffe verworfen werden. Im letzten Schritt wird die DNA eluiert und kann als Isolat genutzt werden.

Um die Konzentration der darin enthaltenen DNA zu ermitteln, wird ein Teil der Lösung mit einem Farbstoff versetzt, der fluoresziert, sobald er mit DNA interkaliert. Dieses Signal wird im Messgerät detektiert. Durch einen Vergleich zu Standards mit definierter DNA-Menge kann so die Konzentration im Isolat bestimmt werden.

Extraktionen

Alle Extraktionen wurden in einem von PCR-Produkten getrennten Raum durchgeführt. Dazu wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde ein Vortest mit drei Proben durchgeführt, um den optimalen Lysepuffer für diese Kotproben zu bestimmen. Die Proben wurden einmal mit dem Lysepuffer des Kits und einmal mit dem nach Soininen *et al.* (eingereicht) aufgeschlossen. Die Methode mit den besseren Ergebnissen wurde für die weiteren Extraktionen verwendet.

Dazu wurden in drei Durchgängen jeweils neun Proben und eine Negativkontrolle extrahiert. Die äußere Schicht der Kotprobe wurde entfernt und 20 mg entnommen. Das Probenmaterial wurde mit 360µl ATL-Puffer und 40µl Proteinase K versetzt, sowie nach der Lyse mit je 400µl AL-Puffer und Ethanol. Die weiteren Schritte wurden nach den Herstelleranweisungen durchgeführt (Spin-Column Protocol). Die Werkzeuge wurden nach jeder Probe mit VE-H₂O, Natriumhypochlorid und Ethanol (70%) gereinigt und 10 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

DNA-Konzentrationsmessung

Pro Probe wurden zwei Messungen mit dem Qubit[®] 2.0 Fluorometer nach den Herstelleranweisungen durchgeführt.

2.2.2. Amplifikation der DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die in den Isolaten enthaltene DNA stammt von verschiedenen Organismen und ist häufig sehr schwach konzentriert. Um die DNA-Sequenz eines bestimmten Markers effektiv bestimmen zu können, muss die DNA in einer PCR vervielfältigt (amplifiziert)

werden. Dabei werden spezifische Primer benutzt, die nur an ausgewählte Regionen der DNA bestimmter Organismen binden und diese dadurch getrennt von anderer DNA amplifizieren.

Im Verlauf einer PCR wird das Isolat mehrfach in einem Cycler erhitzt und abgekühlt. Nach einer Erhöhung der Temperatur auf $>90^{\circ}\text{C}$ trennt sich die doppelsträngige DNA (Matrize) in zwei Einzelstränge auf. An diese heftet sich nach Abkühlung auf die optimale Bindungstemperatur (45°C - 60°C) ein komplementäres Oligonukleotid (Primer), der als Bindungs- und Startpunkt für den Enzymkomplex Polymerase dient (Annealing). Mit freien Desoxyribonukleinsäuren (dNTP) baut die Polymerase, je nach Art zwischen 68°C und 72°C , den neuen DNA-Strang auf (Extension). Nach einer erneuten Erhöhung der Temperatur auf $> 90^{\circ}\text{C}$ lösen sich die Primer von der DNA, und die doppelsträngige DNA wird wieder in Einzelstränge aufgeschmolzen. Dieser Zyklus wird 25-50 mal wiederholt (höhere Zyklenzahl für degradierte DNA), wobei sich die Produktmenge pro Durchgang verdoppelt. Durch Abkühlung oder Verbrauch der dNTPs wird die Reaktion beendet.

2.2.2.1. *Lagopus*-DNA

Für alle Proben wurden speziell für *Lagopus* entwickelte Primer, basierend auf COI genutzt (Lag COI F 278 -ACTCCTTCCACCCTCTTTCCTC- und Lag COI R 552 -AAAGGATGGCAGTGATGAGGACA-). Der Master Mix für eine Probe bestand aus $0,2\ \mu\text{l}$ Platinum[®] Taq DNA Polymerase HiFi, jeweils $1\ \mu\text{l}$ BSA (Bovine serum albumin, $20\ \text{mg/ml}$), MgSO_4 ($50\ \text{mM}$) und F- und R-Primer ($5\ \mu\text{M}$), $2,5\ \mu\text{l}$ dNTPs ($2,5\ \text{mM}$) und $10\times$ Hifi-Puffer, sowie $12,8\ \mu\text{l}$ DEPC- H_2O . Vom Isolat wurden $3\ \mu\text{l}$ mit $22\ \mu\text{l}$ Master Mix gemischt. Die PCR startete mit 95°C für $2\ \text{min}$, gefolgt von 95°C , 60°C und 68°C , jeweils $30\ \text{s}$ in 45 Zyklen, und endete mit $10\ \text{min}$ bei 72°C . Die Sequenzen der Produkte wurden mittels direkter Sanger-Sequenzierung ermittelt.

2.2.2.2. Pflanzen-DNA

Für alle Proben wurden *g/h*-Primer (Taberlet *et al.* 2007) für die P6-Schleife des *trnL*-Introns der Angio- und Gymnospermen genutzt. Die Primer wurden mit individuellen molekularen Identifikationssequenzen (MIDs) markiert (Binladen *et al.* 2007), die es ermöglichen, alle Proben in einem NGS-Durchlauf zu sequenzieren und die erhaltenen

Sequenzen wieder der einzelnen Ausgangsprobe zuzuordnen. Der Master Mix für eine Probe bestand aus 0,2 µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 1 µl BSA (Bovine serum albumin, 20 mg/ml), 2,5 µl dNTPs (2,5 mM) und 10x Puffer I (inkl. MgCl₂ 1,4 mM), sowie 15,8 µl DEPC-H₂O. Vom Isolat wurden 2 µl mit 22 µl Master Mix und 1 µl des Primermixes gemischt. Die PCR startete mit 95°C für 2 min, gefolgt von 95°C, 60°C und 72°C, jeweils 30 s in 45 Zyklen, und endete mit 10 min bei 72°C.

2.2.2.3. Gelelektrophorese

Die erhaltenen PCR-Produkte (Amplikons) werden mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Dabei werden die Amplikons mit einem Laufpuffer auf ein Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Nukleinsäuren durch die poröse Matrix, wobei sich die Amplikons der Größe nach auftrennen. Das Gel wird mit UV-Licht bestrahlt und die mit dem Gelfarbstoff interkalierende DNA leuchtet. Anhand eines aufgetragenen Standards mit Banden definierter Größe kann die Basenpaarlänge der Amplikons abgelesen werden.

Verwendet wurden 2%ige Gele mit GelRed als Farbstoff. Von den Amplikons wurden 4 µl mit 1,5 µl Loading Dye aufgetragen. Als Standards dienten 2,5 µl des 50+100 bp oder 500+100 bp-O'range Ruler DNA ladders. Jedes Gel wurde durch ein Foto dokumentiert.

2.2.3. Klonierung

Da bei einer PCR auf DNA aus Umweltproben mit den eingesetzten *g/h*-Primer die DNA aller Angio- und Gymnospermen amplifiziert wird, muss dieses Gemisch in einem weiteren Schritt aufgetrennt werden. Dazu werden die PCR-Produkte jeweils einzeln in Bakterien geschleust und dort getrennt vermehrt.

Im ersten Schritt der Klonierung, der Ligation, wird das Amplikon in ein ringförmiges DNA-Molekül (Plasmid) integriert. Jedes als Vektor bezeichnete Plasmid nimmt nur ein Produkt auf. In demselben Vektor befindet sich ein Gen, welches dem Bakterium eine Antibiotikaresistenz verleiht (hier gegen Kanamycin). Sogenannte kompetente Zellen (meist *Escherichia coli*) nehmen, verstärkt durch elektrische Reizung (Elektroporation, Neumann *et al.* 1982), jeweils einen Vektor aus der Umgebung auf (Transformation). Im Brutschrank werden die Zellen bei 37°C für ca. 1 h in einer Nährflüssigkeit (SOC-

Medium) geschüttelt, um die Kanamycinresistenz zu exprimieren. Danach werden sie auf Nährböden mit Kanamycin ausgestrichen, sodass nur Zellen wachsen, welche einen Vektor und somit die Resistenz aufgenommen haben. Über Nacht bilden die Bakterien im Brutschrank bei 37°C Kolonien, wobei jede genau ein PCR-Produkt repräsentiert. Am nächsten Tag werden die Kolonien getrennt aufgenommen, denaturiert, um die DNA freizusetzen, und mit einer PCR amplifiziert. Die Produkte werden in einer Gelelektrophorese überprüft und für die Sequenzierung ausgewählt.

Für die Klonierung der PCR-Produkte von Pflanzen wurden sechs Proben ausgewählt, jeweils eine Probe pro Vogelart und Standort. Da in einer Extraktionsreihe eine positive Negativkontrolle in der Pflanzen-PCR auftrat, wurden nur Proben verwendet, die nicht in diesem Extraktionsdurchgang bearbeitet wurden. Die DNA wurde mithilfe des MinElute-Kits nach den Herstelleranweisungen aufgereinigt und an die Produkte ein Poly-A-Schwanz angehängt, um die Bindung an den Vektor zu erleichtern (Master Mix: 0,5 µl 10xPuffer, 0,1 µl dNTPs (2 mM), 0,025 µl Sigma Taq, 1,875 DEPC-H₂O und 2,5 µl PCR-Produkt; 10min bei 72°C). Von den kompetenten Zellen wurden 25 µl mit 1 µl des Reaktionsansatzes (1µl PCR-Produkt, 0,5 µl Salt Solution, 0,5 µl Topo Vektor) versetzt und nach der Elektroporation in 125 µl SOC-Medium gelöst. Nach 1 h im Brutschrank (37°C) wurden pro Probe 25 µl bzw. 50 µl der Zelllösung auf eine Platte ausgestrichen und über Nacht in den Brutschrank gestellt. Die Denaturierung erfolgte bei 72°C für 15 min. Der Master Mix für die Klon-PCR enthielt 7,1 µl H₂O, 1,5 µl Puffer, 0,75 µl dNTPs, 0,75 µl T3 und T7 Primer und 0,15 µl Taq DNA Polymerase. Vom Ansatz wurden 11 µl mit 4 µl Klon-DNA gemischt. Die PCR startete mit 94°C für 4 min, gefolgt von 35 Zyklen mit jeweils 30 s bei 94°C, 56°C und 72°C und endete mit 74°C für 10 min.

2.2.4. Sequenzierung

Um ein PCR-Produkt einem Taxon zuordnen zu können, muss zunächst die Nukleotidabfolge durch eine Sequenzierung ermittelt werden. Bei der Sanger-Sequenzierung wird eine der PCR ähnlichen Kettenabbruch-Synthese-Reaktion durchgeführt. Dabei werden neben den dNTPs auch Didesoxyribonukleinsäuren (ddNTP) verwendet. Diese sorgen bei zufälligem Einbau durch die Polymerase für

einen Abbruch der Kette und somit für unterschiedlich lange Sequenzen, da kein Nukleotid mehr angehängt werden kann. Die Sequenzen werden elektrophoretisch der Größe nach getrennt und einzeln durch einen Laserstrahl geschleust. Die ddNTPs sind fluoreszenzmarkiert und geben, angeregt durch den Laser, ein für ein Nukleotid spezifisches Signal. Dadurch kann die Ursprungssequenz rekonstruiert werden.

2.2.5. Analysen

Um die Organismen anhand ihrer Sequenzen schnell bestimmen zu können, bietet sich ein Abgleich mit einer Referenzdatenbank, basierend auf dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Algorithmus an (Altschul *et al.* 1990). Datenbanken wie „Genbank“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) oder „Barcode of Life Data Systems“ (BOLD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) werden mit publizierten Sequenzen gefüttert und ermöglichen so einen Abgleich mit eigenen Probensequenzen. Durch BLAST wird ein Lokales Alignment durchgeführt, also ein Abgleich der Proben- und Referenzsequenzen, und die Sequenz mit der größten Übereinstimmung als Ergebnis ausgegeben.

Eine genauere Methode zur Identifikation und zur Analyse der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den ermittelten Sequenzen, stellt die Erstellung eines Stammbaums, z.B. beruhend auf dem Neighbor-Joining-Algorithmus (NJA), dar. Über diesen können Aussagen getroffen werden, wie zuverlässig und auflösend der gewählte Marker ist und ob er eine eindeutige Zuordnung der Sequenzen zu einem Taxon gewährleistet.

Zur Ermittlung des Stammbaums werden aus einer Referenzdatenbank homologe Sequenzen verschiedener Taxa heruntergeladen. Die Sequenzen werden nach übereinstimmenden Abschnitten geordnet bzw. ausgerichtet (aliniert) und auf die gleiche Länge geschnitten. Aus den alinierten Sequenzen wird anschließend eine Merkmalsmatrix aufgrund der Nukleotidabfolgen erstellt. Diese unterscheiden sich durch evolutive Veränderungen wie z.B. Substitutionen, Insertionen und Deletionen. Die Unterschiede in den Sequenzen bzw. die unterschiedlichen Schritte, die nötig wären, um die Differenzen zwischen den Sequenzen auszugleichen, werden durch eine Distanzkorrektur verglichen, gewertet und daraus eine Merkmalsmatrix erstellt. Über

den NJA wird aus dieser Merkmalsmatrix für jedes Taxon die Summe der Distanzen zu den anderen Taxa berechnet und daraus eine korrigierte Matrix erstellt. Anschließend wird das Taxon-Paar mit der geringsten Abweichung ermittelt und die Distanz zu der sie verbindenden Abzweigung berechnet. In einer neuen Matrix wird dieses Paar dann durch die Abzweigung ersetzt und die Vorgänge für die anderen Taxa wiederholt, bis sich ein Baum ergibt. Zur statistischen Absicherung werden auf der Grundlage der Merkmalsmatrix im Bootstrap-Verfahren stichprobenartig mehrfach neue Datensätze zusammengestellt, aus denen dann mehrere Stammbäume gerechnet werden. Der endgültig dargestellte Stammbaum enthält an jeder Abzweigung die Information, wie oft genau diese Zweigkonstellation in der Gesamtheit der Stammbäume vorkam. Je höher dieser Wert ist, desto wahrscheinlicher ist das dargestellte verwandtschaftliche Verhältnis.

Eine weitere Möglichkeit zur taxonomischen Identifikation von Sequenzdaten bietet das Programm „EcoTag“ (Teil der OBITools, <http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>). Ebenso wie bei BLAST werden die Sequenzen mit einer Referenzdatenbank abgeglichen, wobei die verwandtschaftlichen Verhältnisse der ähnlichsten Referenzsequenzen berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu BLAST wird hierbei ein globales Alignment durchgeführt, also die Gesamtlänge der Sequenzen miteinander verglichen. Dazu muss zunächst eine eigene Datenbank mit homologen, gleich langen Sequenzen erstellt werden. Über eine *in silico* PCR, unter Verwendung der für die erste PCR genutzten Primer, auf Sequenzen einer Referenzdatenbank werden alle damit amplifizierbaren Pflanzen herausgefiltert. Auf diesen als Library bezeichneten Datensatz aus homologen Sequenzen wird mit den Probensequenzen das Globale Alignment durchgeführt. Die Taxonomie der ähnlichsten Sequenzen wird über die taxonomische Annotation des NCBI bestimmt. In dem parallel abgerufenen Taxonomiebaum wird das letzte gemeinsame Taxon (z.B. Art, Gattung, Familie oder Ordnung) der ähnlichsten Sequenzen bestimmt und dies als resultierende taxonomische Annotation der erzeugten Sequenzen ausgegeben.

2.2.5.1. Lagopus

Mithilfe des Programms Geneious (Version 6.1.7) wurden allen Sequenzen mit der Auto-Trim-Funktion die Primer entfernt und manuell nachkontrolliert. Die Forward-

und Reversesequenzen wurden assembliert und vorläufig mit BLAST bestimmt. Die Konsensussequenzen der Assemblys wurden für die phylogenetische Analyse aliniert (Geneious Alignment Algorithm) und die identischen Sequenzen mithilfe von ALTER zu gemeinsamen Haplotypen zusammengefasst. Aus der Datenbank von BOLD wurden alle COI-Datensätze (70) der *Lagopus*-Arten und des Birkhuhns (*Tetrao tetrix*) als Außengruppe heruntergeladen. Die Datensätze wurden manuell auf die Länge der Probensequenzen zugeschnitten und aliniert (Geneious) sowie mit dem Programm „ALTER“ (<http://sing.ei.uvigo.es/ALTER/>) zu Haplotypen zusammengefasst. Mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus wurde ein Stammbaum berechnet. Zur Distanzkorrektur wurde das HKY-Substitutionsmodell verwendet (Hasegawa *et al.* 1985).

2.2.5.2. Pflanzen

Den Pflanzensequenzen wurden ebenfalls mit der Auto-Trim-Funktion von Geneious (Version 6.1.7) die Primer entfernt und manuell nachkontrolliert.

Während der Klonierung kann das Amplikon in beide Richtungen in den Vektor eingebaut werden. Das zur Analyse verwendete Programm EcoTag (<http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>) kann aber nur in einer Richtung lesen, weswegen ein FASTA-Datensatz mit beiden Sequenzrichtungen erstellt wurde. Zwei Referenzdatenbanken wurden zur Identifikation verwendet: eine spezifische kuratierte Sequenzdatenbank arktischer und borealer Pflanzen (Sønstebø *et al.* 2010, Willerslev *et al.* 2014) und eine Datenbank, die aus der Standard Nucleotide Release des European Molecular Biology Laboratory (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/embl/release/>; Version 117) formatiert wurde. Die arktisch-boreale Datenbank liefert eine genauere Identifikation, während die emb117-Datenbank genutzt wird, um mögliche Kontaminationen durch Nahrungspflanzen aufzudecken. Zur Erstellung der emb117-Datenbank wurde mit EcoPCR eine virtuelle PCR mit den *g/h*-Primern (Taberlet *et al.* 2007) durchgeführt (5 Fehlpaarungen erlaubt). Auf die homologen Sequenzen wurde mit den Probensequenzen durch EcoTag ein global alignment durchgeführt und die Taxa mithilfe des Taxonomiebaums (NCBI) bestimmt.

Aufgrund der geringen Stichprobenzahl stellten sich weitere statistische Tests auf den erstellten Datensatz als nicht genügend aussagekräftig heraus.

2.2.6. Makrorestanalyse

Alle 25 Proben wurden fotografiert und jeweils ein Pellet unter dem Binokular in seine Bestandteile zerlegt, sortiert und Querschnitte einiger Holzproben angefertigt. Mithilfe von herbarisiertem Vergleichsmaterial wurden diese, soweit im Rahmen dieser Arbeit möglich, bestimmt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial aus den sechs Proben, die auch kloniert wurden, quantitativ bestimmt. Dazu wurde die Gesamtlänge der Holzreste, die Anzahl der Pollensäcke und sonstiger differenzierbarer Bestandteile gezählt. Zudem wurde das Volumen des nicht identifizierbaren organischen Materials berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Vortest und Extraktionen

Der Vergleich der beiden Extraktionsprotokolle zeigte eine deutlich höhere DNA-Konzentration in den Isolaten, wenn diese nach dem Qiagen- statt dem Soininen-Protokoll extrahiert wurden (Tab. 1). Die mit den Isolaten durchgeführten PCRs bestätigten das Ergebnis (Abb. 1), da die nach dem Qiagen-Protokoll extrahierten

Tab. 1: DNA-Konzentrationsmessung der Isolate nach Extraktion nach Soininen *et al.* (eingereicht), bzw. Qiagen-Protokoll. Die Konzentrationen sind als Mittelwerte zweier Messungen angegeben.

Probennummer	Qiagen Protokoll in $\mu\text{l/ml}$	Soininen et al. Protokoll in $\mu\text{l/ml}$
K041	3,22	0,284
K050	0,693	0,546
K051	1,9	0,26

Proben (4-6) stärkere Banden zeigten als die Isolate nach Soininen (1-3). Das Ergebnis war dabei für die *Lagopus*-PCR (029P) deutlicher als für die Pflanzen (030XP).

Das Extraktions- sowie das PCR-Blank waren in beiden Fällen negativ. Die

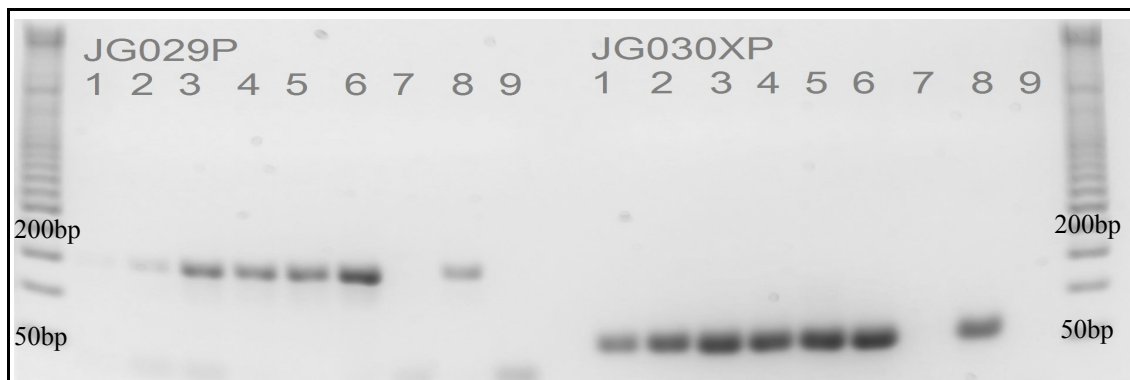


Abb. 1: Gelbild der PCR für *Lagopus* (029P) und für Pflanzen (030XP) vom Vergleich der Extraktionsprotokolle (Qiagen vs. Soininen *et al.*)

Die Banden aus der Qiagen-Extraktion (4-6) waren stärker als die der Extraktion nach Soininen *et al.* (1-3). Die Positivkontrollen (8) zeigten ebenfalls eine Bande. Die Extraktions- (6) sowie die PCR-Blanks (9) waren negativ.

Positivkontrollen zeigten jeweils eine Bande und bestätigten den Erfolg der PCRs. Alle weiteren Extraktionen wurden nach den Herstelleranweisungen von Qiagen durchgeführt. Damit wurden Konzentrationen von 0 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 2, Nr. 09) bis maximal 5,08 $\mu\text{g/ml}$ (Nr. 24) gemessen.

Tab. 2: Kotproben mit Standort, *Lagopus*-Haplotyp und DNA-Konzentration als Mittelwert zweier Messungen.

	Probennummer	Breitengrad	Längengrad	Standort	DNA-Konzentration in µg/ml	<i>Lagopus</i> COI-Haplotyp	Identifikation	Kloniert
1	K041	72.5519339740276	105.711756041273	13TY02	3,220	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
2	K050	72.5504460185766	105.754441972822	13TY02	0,693	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
3	K051	72.5494420342147	105.757411010563	13TY02	1,900	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
4	K014	72.5475619733334	105.730557991192	13TY02	0,919	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
5	K031	72.5469520222396	105.724645983428	13TY02	0,100	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
6	K032	72.546902988106	105.724712032825	13TY02	0,897	Haplotyp 4	<i>L. lagopus</i>	
7	K040	72.5519310403615	105.711690997705	13TY02	0,605	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
8	K006	72.5478150229901	105.730786984786	13TY02	0,217	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
9	K007	72.5477919727564	105.730667961761	13TY02	0,000	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
10	K010	72.5478049647063	105.730554973707	13TY02	0,437	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
11	K002	72.5478140171617	105.730595039204	13TY02	1,765	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
12	K016	72.5474739633501	105.730407033116	13TY02	0,554	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
13	K018	72.5473319739103	105.731448987499	13TY02	3,273	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
14	K033	72.5488610006869	105.746687036008	13TY02	0,523	Haplotyp 1	<i>L. mutus</i>	
15	K036	72.5486640259624	105.745940962806	13TY02	0,262	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	
16	K005	72.5477890390903	105.730840964243	13TY02	0,502	Haplotyp 2	<i>L. lagopus</i>	
17	K011	72.5478010252118	105.730609958991	13TY02	2,215	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	X
18	K013	72.547569014132	105.730554973707	13TY02	0,385	Haplotyp 1	<i>L. mutus</i>	X
19	K065	72.40887	105.44804	13TY04	1,985	Haplotyp 1	<i>L. mutus</i>	
20	K074	72,408876	105,448164	13TY04	0,480	Haplotyp 1	<i>L. mutus</i>	
21	K075 - 1	72,408946	105,448315	13TY04	1,300	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	X
22	K072 in D2	72,408949	105,447930	13TY04	1,505	Haplotyp 1	<i>L. mutus</i>	X
23	H2-KOT	72.1507200133055	102.097889017314	13TY09	0,243	Haplotyp 1	<i>L. mutus</i>	X
24	J4-KOT	72.1506810374557	102.097939979285	13TY09	5,080	Haplotyp 1	<i>L. mutus</i>	
25	K2-KOT	72.1507650241256	102.097958000377	13TY09	4,190	Haplotyp 3	<i>L. lagopus</i>	X

3.2. Bestimmung der Vogelarten

Um die *Lagopus*-DNA in den Isolaten zu amplifizieren, wurde eine PCR auf die COI-Region durchgeführt. Die Produkte hatten eine Länge von ungefähr 280 bp (Abb. 2). Die schwachen Banden im 50 bp Bereich waren Primer-Dimere, die sich bilden können, wenn keine amplifizierbare DNA vorhanden ist und die Primer teilweise komplementär

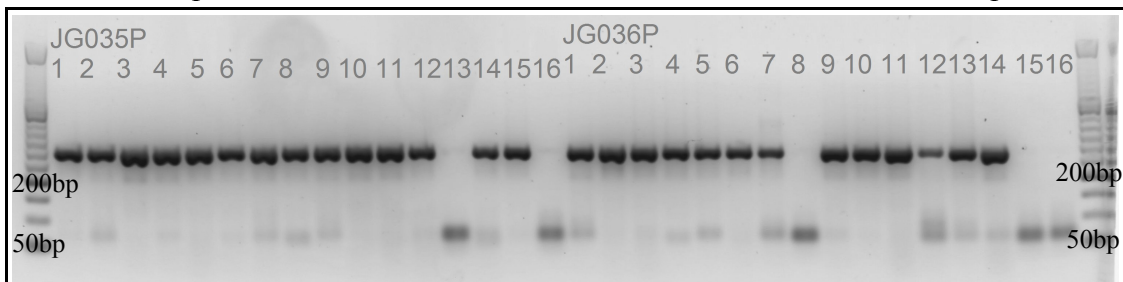


Abb. 2: Gelelektrophoresebild der PCR-Produkte der COI-Region aller Isolate.

Alle Produkte wiesen deutliche Banden bei ca. 280 bp auf. Keine Banden in diesem Bereich waren bei den Negativkontrollen der Extraktionen (13 (035P), 8 und 15 (036P)) und Negativkontrollen der PCR (beide 16) zu sehen. Schwache Banden waren im 50 bp Bereich zu erkennen, die Primer-Dimere darstellten.

sind. Die Extraktionsblanks und Negativkontrollen wiesen keine Amplifikate auf. Die anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte der 25 Proben und die folgende

Analyse mit BLAST ergab insgesamt vier verschiedene Haplotypen (Tab. 2 und Abb. 3). Die Unterschiede zwischen den Sequenzen sind im Anhang (Abb. A1) dargestellt. Drei waren identisch mit publizierten Sequenzen von *L. lagopus* (Haplotyp 2-4) und eine mit *L. mutus* (Haplotyp 1). Die Stammbaum-Analyse bestätigte die über BLAST ermittelte Identifikation. Die drei *Lagopus*-Arten, *L. lagopus*, *L. mutus* und *Lagopus leucura* (Richardson 1831), das Weißschwanz-Schneehuhn, bildeten einen gemeinsamen Zweig, wobei *L. lagopus* und *L. mutus* getrennt von *L. leucura* waren (Bootstrapwert 80). Die Arten *L. mutus* und *L. lagopus* waren in zwei Cluster getrennt, mit jeweiligen Bootstrap-Werten von 100 und 97. Haplotyp 1 gliederte sich in den *L. mutus*-Zweig ein.

Nach der eindeutigen Bestimmung der Sequenzen konnten diese ihrem jeweiligen Standort zugeordnet werden. Am Standort 09 stammten zwei Proben von *L. lagopus* und eine von *L. mutus*, bei Standort 04 eine von *L. lagopus* und drei von *L. mutus*. Am Punkt 02 wurden die meisten Proben gesammelt, wobei 16 Proben *L. lagopus* und zwei *L. mutus* zugeordnet werden konnten (Tab. 2 und Abb. 4c).

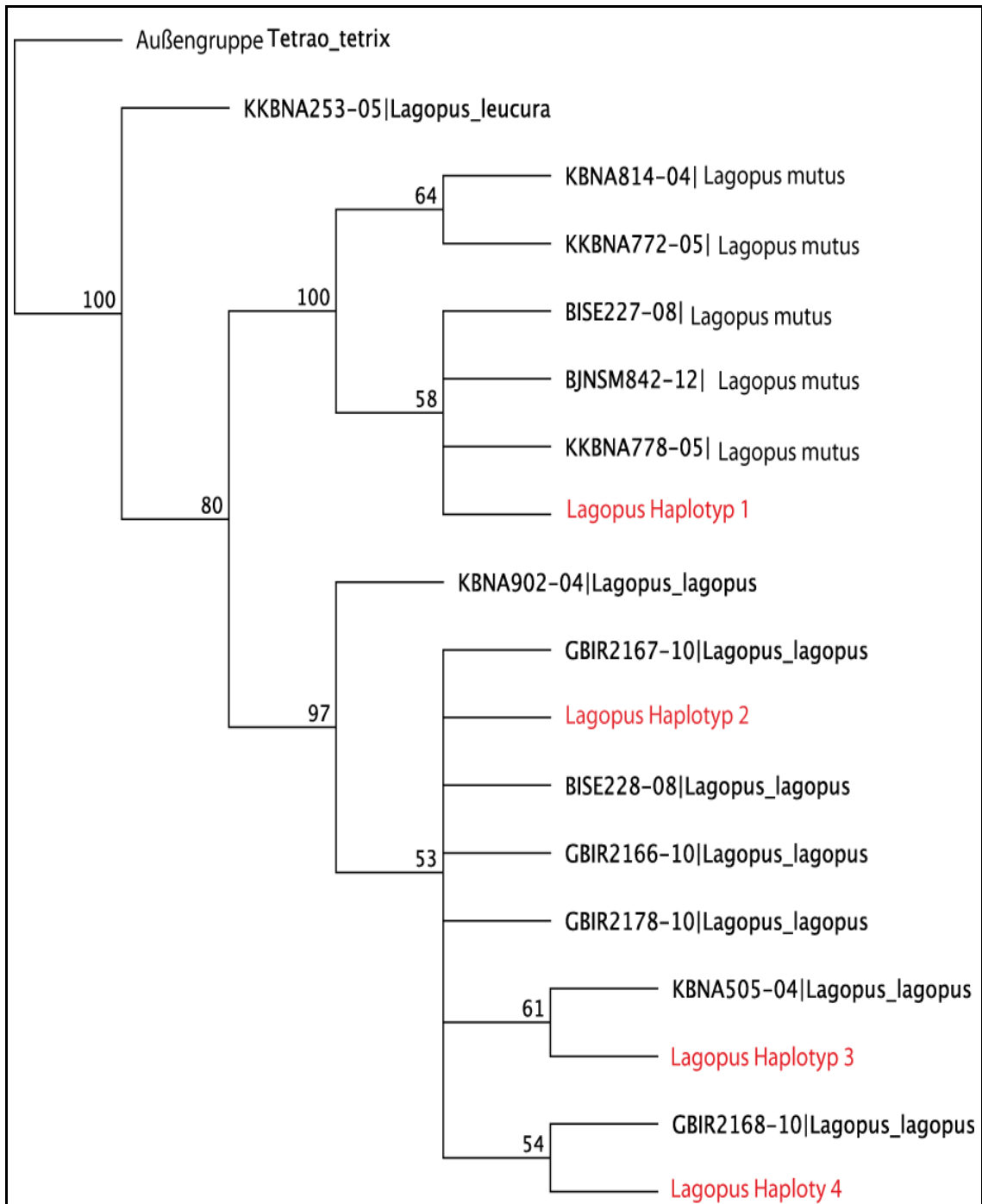
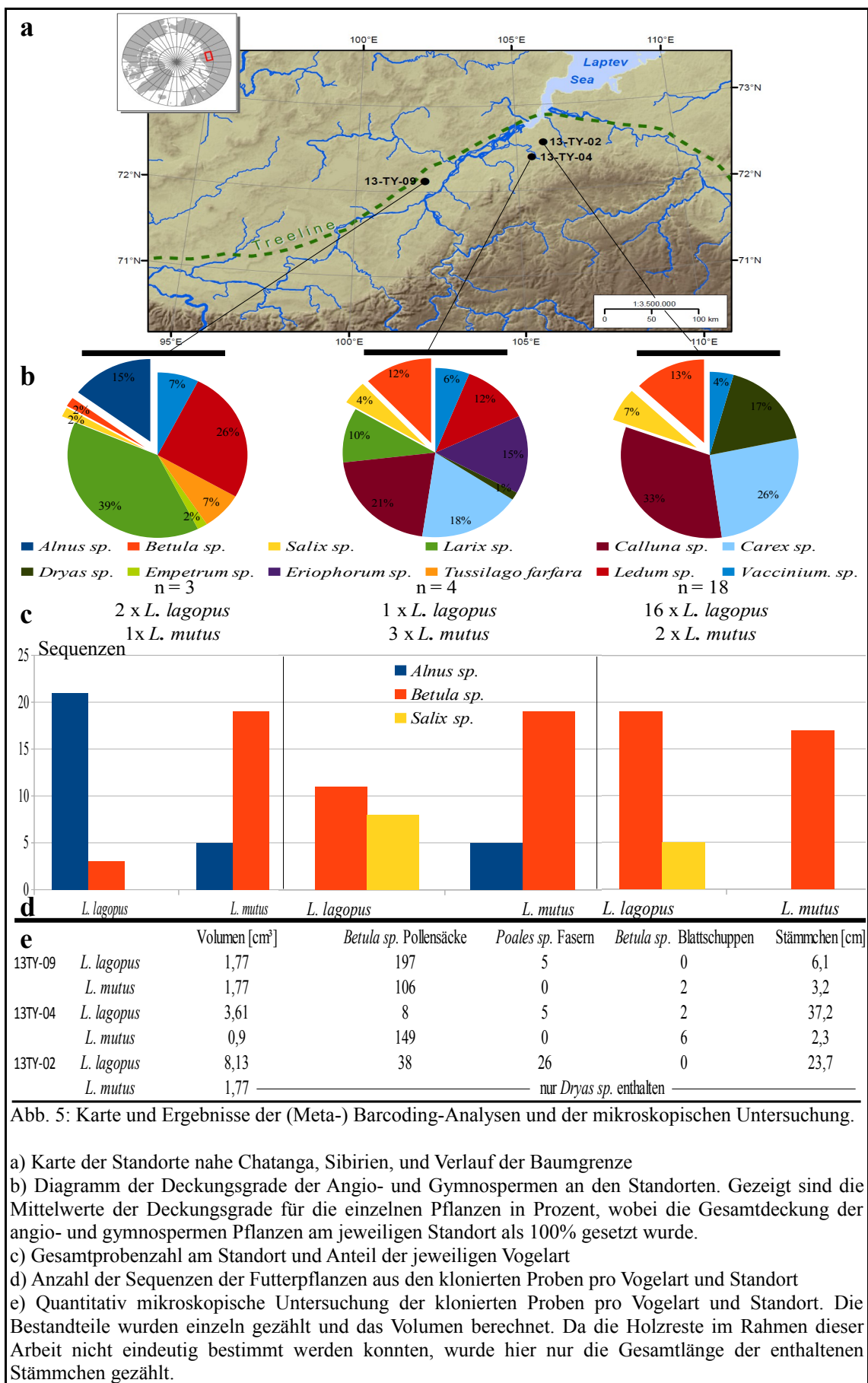


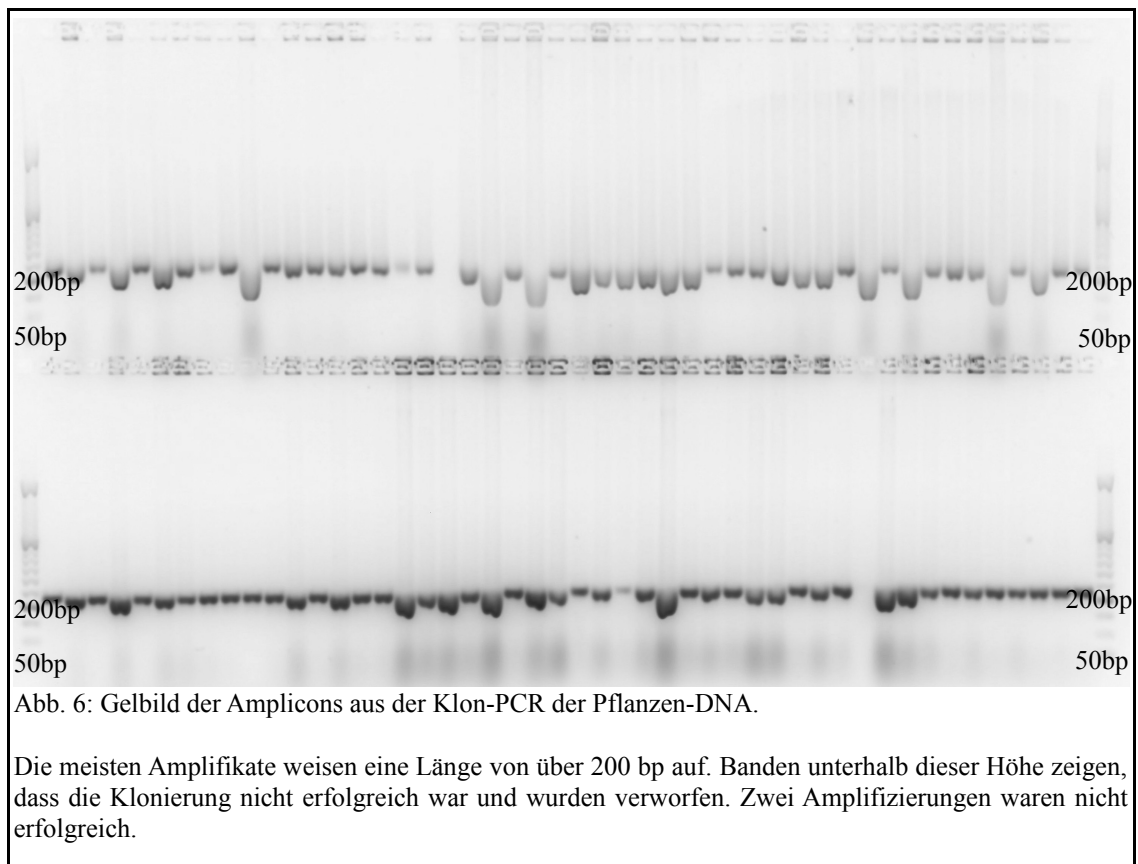
Abb. 3: Neighbor Joining Baum mit Haplotypen der *Lagopus*-Arten der Isolate und der Datenbanken mit der Außengruppe *Tetrao tetrax*.

Als Außengruppe wurde *Tetrao tetrax* definiert. *L. leucura* bildete in Abgrenzung zu *L. mutus* und *L. lagopus* einen eigenen Cluster mit einem Bootstrapwert von 80. Der Baum spaltete sich in einen *L. lagopus*-Cluster (97) und einen *L. mutus*-Cluster (100). In letzterem fand sich auch Haplotype 1, der zuvor mit BLAST als *L. mutus* bestimmt wurde (Abb. A1). Die drei (Haplotype 2,3 und 4) als *L. lagopus* bestimmten Haplotypen (Abb. A1) lagen alle im *L. lagopus*-Cluster. Haplotype 2 lag in einer Gruppe mit vier Referenzsequenzen und war von Haplotype 3 und 4 getrennt, die mit jeweils einer Referenzsequenz einen eigenen Cluster bildeten (Bootstrapwerte 61 bzw. 54).



wurden. Die Proben von Punkt 02 zeigten für *L. lagopus* 19 *Betula* sp. und 5 *Salix* sp. und ausschließlich 17 *Betula* sp.-Sequenzen für *L. mutus*.

Die genauen prozentualen Anteile der Deckungsgrade der Standorte wurden als Kreisdiagramm dargestellt (Abb. 6b), wobei die Gesamtdeckung der angio- und gymnospermen Pflanzen am jeweiligen Standort als 100% gesetzt wurde. Neben *Alnus* sp., *Betula* sp. und *Salix* sp. ist das Gebiet durch Ericaceen (*Ledum* sp., *Vaccinium* sp., *Calluna* sp. und *Empetrum* sp.) und Cyperaceen (*Eriophorum* sp. und *Carex* sp.) gekennzeichnet.



Alnus sp. fand sich ausschließlich am Punkt 09, gleichzeitig ist dort am wenigsten *Betula* sp. und *Salix* sp. vorhanden. Auffällig waren dort auch die hohen Werte für *Larix* sp., die in Richtung Norden abnahmen.

3.4. Mikroskopische Untersuchungen der Kotproben

Der Kot von *L. lagopus* war mehrheitlich zwischen 3 cm und 3,5 cm lang und wirkte grob strukturiert. Außerdem waren von außen zahlreiche Stöckchen zu erkennen (Abb. 7). Insbesondere die *L. lagopus*-Proben von Standort 04 und 02 enthielten eine große

Anzahl von Holzresten (37,2 cm bzw. 23,7 cm, s. Abb. 4e). Im Gegensatz dazu wirkte der Kot von *L. mutus* komprimierter und feiner und wies wenige bis gar keine Holzreste auf. Die Pellets waren mit ca. 2 cm Länge deutlich kürzer als die ihrer Schwesterart, welche auch das größere Volumen aufwies (Abb. 6e). Allerdings wies eine Probe von *L. lagopus* die Merkmale der *L. mutus*-Kotproben auf. Da in 96% der Fälle die Merkmale aber zutreffend sind, können anhand der Kotprobe die beiden Arten ziemlich genau unterschieden werden (Abb. 7). In 24 von 25 Proben fanden sich die gleichen Bestandteile in unterschiedlichen Anteilen. Eine genaue visuelle Bestimmung war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Der Querschnittvergleich von Stöckchen aus den Proben und Herbariumsmaterial lieferte keine eindeutigen Ergebnisse (Abb. A1 und A2). Genauer zuzuordnen waren nur die Pollen bzw. -säcke von *Betula* sp. (Abb. A3),



Abb. 7: Kotproben im Vergleich, links *L. lagopus*, rechts *L. mutus*.

Der Kot von *L. lagopus* ist im Durchschnitt größer und gröber strukturiert als der von *L. mutus*. Letzterer wirkt deutlich kompakter und weist nur wenige Stöckchen auf.

die in großer Zahl in den Proben vom Ort 09 (197 und 106) und in der *L. mutus* Probe von Standort 04 (149) vorhanden waren (Abb. 6e). Fasern, die als *Poales* sp. identifiziert wurden, fanden sich ausschließlich im Kot von *L. lagopus*, besonders am Sammelpunkt 02. Größere Teile von *Betula* sp. Blattschuppen (Abb. A3) fanden sich in der *L. mutus* Probe vom Punkt 09, sowie in beiden Proben vom Standort 04 (Abb. 6e).

Die *L. mutus*-Probe (K013) vom Punkt 02 fiel in den mikroskopischen Untersuchungen durch ein sehr homogenes Äußeres auf und enthielt keine der aus den anderen Proben bekannten Bestandteile. Das blassgrüne, weiche, faserige und flockige Material wurde als *Dryas* sp.-Blattreste identifiziert (Abb. A5).

4. Diskussion

In dieser Studie wurden Kotproben der Hühnervogelgattung *Lagopus* mithilfe genetischer und mikroskopischer Methoden analysiert. Dabei wurde die COI-Region bzw. das *trnL*-Intron genutzt, um die *Lagopus*-Art und die Futterpflanzen des jeweiligen Tieres zu bestimmen. Die Studie zeigt, dass die angewendeten genetischen Methoden geeignet sind, um die Kotproben einer Vogelart zuzuordnen und die gefressenen Pflanzen mindestens bis aufs Gattungsniveau zu identifizieren. Die mikroskopischen Untersuchungen liefern taxonomisch weniger eindeutig bestimmbare Ergebnisse, sollten aber in Ergänzung angewendet werden, um die Ergebnisse aus den genetischen Untersuchungen zu überprüfen und gegebenenfalls, wie in dieser Arbeit, erweitern zu können. Aufgrund der geringen Stichproben- und Sequenzzahl sind die Aussagen nicht statistisch belegbar und beschränken sich auf drei Individuen jeder Art. Die aus den sechs Proben erzielten Ergebnisse werden mit der Fachliteratur verglichen und diskutiert.

4.1. DNA-Konzentrationen

Die Extraktionsmethode nach dem Qiagen-Protokoll hat sich aufgrund der höheren DNA-Konzentrationen und der erfolgreicherer PCR gegenüber dem Soininen-Protokoll als das effizientere erwiesen und wurde für alle Proben genutzt. Die starken Schwankungen in den DNA-Konzentrationen sind auf die unterschiedliche Qualität der Kotproben zurückzuführen. Die Umweltproben lagen unterschiedlich lange an verschiedenen Standorten und waren demnach DNA-schädlichen Einflüssen wie UV-Strahlung, Temperatur und Feuchtigkeit ausgesetzt, was die Quantität der DNA in der Probe beeinflusst (A'Hara *et al.* 2009). Dennoch konnte in allen Kotproben sowohl *Lagopus*-, als auch Pflanzen-DNA amplifiziert werden.

4.2. Genetische Identifikation der Kotproben

Die Nutzung von mitochondrieller DNA als Marker für Vögel, insbesondere der COI-Region (Hebert *et al.* 2004a, Quintela *et al.* 2010), hat sich, neben der Verwendung der Cytochrom-b-Region (A'Hara *et al.* 2009) oder der 12s bzw. 16s rRNA (Lucchini *et al.* 2001), etabliert. Diese Methode eignet sich auch besonders für die Identifizierung von Schwesterarten unter Vögeln (Tavares & Baker 2008).

Die in dieser Studie verwendeten Primer liefern eine gute Auflösung und eignen sich, um die *Lagopus*-Arten eindeutig zu bestimmen. Dies wird durch den Neighbor Joining Baum bestätigt, in dem alle definierten Haplotypen in voneinander getrennten Clustern mit Sequenzen aus der Referenzdatenbank repräsentiert sind. Die Trennung des *L. lagopus*- vom *L. mutus*-Zweig, mit jeweiligen Bootstrapwerten von 97 und 100, lässt eine eindeutige Unterscheidung der Arten auf genetischer Ebene zu, obwohl sie eine hohe genetische Übereinstimmung aufweisen (Quintela *et al.* 2010). Die Auflösung innerhalb der *L. lagopus*-Haplotypen ist mit Bootstrapwerten zwischen 50 und 60 deutlich niedriger, wobei das Ziel dieser Arbeit, die beiden Arten zu unterscheiden, mit den Markern erfüllt wurde.

Eine Möglichkeit, die Identifikation der Schwesterarten zu beschleunigen und zu vergünstigen, bietet die Technik des Rapid Classificatory Protocol PCR (RCP-PCR) (Dalén *et al.* 2004). Dabei wird dem PCR-Ansatz für die Probe ein für die Arten universeller und ein artspezifischer Primer zugesetzt, der in unterschiedlicher Entfernung zum ersten Primer bindet und so je nach Art spezifisch lange Amplifikate produziert. Nach einer Gelelektrophorese kann anhand der Länge der Produkte die Art identifiziert werden. Die gesamte Analyse kann auf diese Weise innerhalb von sechs Stunden durchgeführt werden. Die Methode bietet sich vor allem für großangelegte Studien an, nachdem die Wirksamkeit der Marker in einer Pilotstudie wie dieser getestet wurde, da mit der RCP-PCR keine Sequenzinformationen zur Überprüfung der Ergebnisse vorliegen.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode mit Sequenzierung ergab, dass 19 der 25 Proben von *L. lagopus* und 6 von *L. mutus* stammten. Möglicherweise waren die Sammelstandorte noch zu weit südlich, um mehr *L. mutus*-Proben finden zu können, da diese Art offeneres Gelände bevorzugt (Storch 2007 „Grouse: Status Survey and Conservation Action Plan 2006–2010 IUCN“). Allerdings fand sich am Standort 02, an

dem keine Bäume mehr vorhanden waren, die meiste *L. lagopus*-Fäzes. Durch eine erhöhte Stichprobenzahl und eine weitere Verteilung der Sammelorte über die Nord-Süd-Achse könnte die Repräsentation der Arten in den Proben angeglichen werden.

Ein Nachteil bei der Verwendung mitochondrieller Marker ist, dass Hybridisierungen zwischen *L. mutus* und *L. lagopus* nicht entdeckt werden können und dies die Zuordnung der Proben erschweren könnte. Dadurch, dass die *Lagopus*-Arten sympatrisch auftreten, kommt es auch zu Hybridisierungen zwischen ihnen; bis zu 4% der Individuen von *L. lagopus* zeigen Anzeichen von Hybridisierung. Mit der vermutlich zunehmenden Habitatsüberlappung im Zuge der Erderwärmung, könnte dieser Wert ansteigen und muss als möglicher Fehler in der Analyse mitgedacht werden (Quintela *et al.* 2010).

4.3. Visuelle Identifikation der Kotproben

Eine Zuordnung der Kotproben zur jeweiligen *Lagopus*-Art ist visuell weitgehend möglich. Nur eine *L. lagopus*-Probe glich in ihren äußeren Merkmalen den Proben ihrer Schwesterart. Bei Soininen *et al.* (eingereicht) wurden zwei nahverwandte Lemmingarten anhand der Kotproben mit einer ähnlich hohen Trefferquote unterschieden. Die visuelle Bestimmung kann im Feld als Anhaltspunkt dienen, sollte aber idealerweise durch genetische Methoden verifiziert werden.

4.4. Genetische Identifikation der Futterpflanzen

Die Amplifizierung der Pflanzen-DNA mithilfe der *g/h*-Primer war in allen Proben erfolgreich, obwohl es zu einer Kontamination kam und die davon betroffenen Proben aus dem Versuch genommen wurden. Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte ergab Sequenzen von *Alnus* sp., *Betula* sp. und *Salix* sp. Die Ergebnisse decken sich gut mit den Vegetationsdaten. Am Standort 09 fressen beide *Lagopus*-Individuen *Alnus* sp., welcher dort auch am häufigsten vorkommt. Das *L. mutus*-Individuum frisst weniger *Alnus* sp., allerdings deutlich mehr *Betula* sp. als der Vertreter seiner Schwesterart. Obwohl vorhanden wurde *Salix* sp. an diesem Standort nicht gefressen. An den Standorten 04 und 02 gab es kein *Alnus* sp., aber *Betula* sp. und *Salix* sp. in ähnlichen Mengen. Letztere wurde an beiden Orten nur von *L. lagopus* gefressen, wobei *Betula* sp. von Individuen beider Arten in fast gleichen Anteilen verzehrt wurde. In der

Kotprobe von *L. mutus* am Punkt 04 wurde auch *Alnus* sp. gefunden, welche der Vogel an einem anderen Ort aufgenommen haben muss. Am Sammelpunkt 02 wurde in der Fäzes von *L. mutus* nur *Betula* sp. nachgewiesen.

Zu beachten ist dabei, dass die Vegetationsdaten auf Deckungsgraden beruhen und nicht die tatsächliche Biomasse der vorhandenen Pflanzen widerspiegelt. Dadurch kann die tatsächlich für die Vögel verwertbare Pflanzenmasse größer oder kleiner als der Deckungsgrad sein und so das Fraßverhalten erklären.

Dennoch weisen die Ergebnisse auf Nahrungspräferenzen der Schwesterarten hin, welche schon zwischen Populationen einer Art stark variieren können (Moss & Hanssen 1980). *Betula* sp. wird an allen Standorten unabhängig von ihrer Abundanz gefressen, wenn auch *L. lagopus* *Alnus* sp. zu präferieren scheint. *L. mutus* frisst in diesen Proben zu geringeren Anteilen auch *Alnus* sp., aber kein *Salix* sp. In Bezug auf *Alnus* sp., *Betula* sp. und *Salix* sp. als Hauptnahrungsquelle decken sich die Ergebnisse mit denen anderer Studien (Moe & Bjune 2009, Pavlov 1974 (zitiert in Chernov 1988)), wobei bei diesen die Präferenzen der Schwesterarten für einzelne Nahrungspflanzen zum Teil von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abzuweichen scheinen (Pavlov 1974 (zitiert in Chernov 1988)). Demnach müsste der Hauptbestandteil der Nahrung von *L. lagopus* aus *Salix* sp. (44%) und bei *L. mutus* aus *Alnus* sp. (77%) bestehen. *Betula* sp. wäre bei beiden Arten in fast gleichen Anteilen vorhanden (13% bzw. 7%). In dieser Arbeit würde für beide *Lagopus*-Arten *Betula* sp. den Hauptbestandteil ausmachen (*L. lagopus* 49,3% und *L. mutus* 84,6%). Allerdings sind anhand der Sequenzzahl keine quantitativen Aussagen über die Nahrung möglich, unter anderem aufgrund der geringen Stichprobenzahl von 24 Sequenzen. Zusätzlich können Fehler während der Extraktion, unterschiedliche Effizienz in der Amplifizierung der Ziel-DNA oder geringe Zelldichte der gefressenen Pflanzen zu großen Unterschieden in der Repräsentation der Pflanzenarten in den Sequenzen führen (Bohmann *et al.* 2014, Pompanon *et al.* 2012). Diese Faktoren könnten auch erklären, warum *Dryas* sp., *Poa* sp. oder verschiedene Ericaceen nicht in den Sequenzierungs-Ergebnissen auftauchen, obwohl diese an den Standorten vertreten und besonders im Frühling und Sommer Nahrungspflanzen der *Lagopus*-Arten sind (Moe & Bjune 2009, Moss & Hanssen 1980, Chernov 1988).

Mit Nutzung von NGS, die hunderttausende mit MIDs markierte Sequenzen produziert, kann die Zusammensetzung der Kotproben genauer wiedergegeben werden, obwohl

auch mit dieser Methode keine quantitative Aussage über die Bestandteile getroffen werden kann (Valentini *et al.* 2008). Weiterhin muss, um ein differenziertes Bild der gefressenen Pflanzen zu erhalten und falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, die Homogenisierung der gesamten Probe in Betracht gezogen werden, da schon die Entnahme einer Probe aus dem Kot für die Extraktion die tatsächliche Zusammensetzung verzerren kann (Deagle *et al.* 2005). Des Weiteren könnte die dominante DNA der drei Hauptbestandteile (*Alnus* sp., *Betula* sp., *Salix* sp.) die Amplifikation von DNA von weniger dominanten Pflanzen behindert haben. Durch den Einsatz von Blockern für dominante DNA (Boessenkool *et al.* 2012) kann eine Amplifizierung in der PCR verhindert werden, was gleichzeitig die Vermehrung nicht-dominanter DNA begünstigt.

4.5. Primerwahl

Durch die Nutzung der *g/h*-Primer beschränkt sich die Untersuchung auf Angio- und Gymnospermen (Taberlet *et al.* 2007). Ein möglicher Verzehr von Moosen, Farnen oder Pilzen würde nicht entdeckt werden, wobei es in anderen Studien bisher keine Hinweise darauf gibt, dass diese Organismen von *Lagopus*-Arten gefressen werden. Allerdings bedienen sich diese Studien bisher keiner genetischen Methoden und beschränkten sich auf die Untersuchung des Mageninhalts. Dabei ist die Gefahr aufgrund der Zersetzung groß, keine Überreste zu finden bzw. diese nicht bestimmen zu können. Ein Metabarcoding gezielt für diese Organismen könnte dabei neue Erkenntnisse bringen. Mit den *c* und *d* Primern (Taberlet *et al.* 1991) ist es möglich, beispielsweise Moose und Farne zu detektieren, wobei die Länge des amplifizierten Bereichs bei degradierter DNA problematisch sein könnte.

4.6. Mikroskopische Untersuchungen der Kotproben

Die mikroskopische Untersuchung hat gezeigt, dass bei großer Übereinstimmung der Bestandteile in den Proben durchaus Unterschiede in der Anzahl und zwischen den Arten feststellbar sind. In einem Fall wich die Zusammensetzung der Kotprobe komplett von der anderer Proben ab.

Durch Fragmentierung und Ausbleichung während der Verdauung sind die organischen Reste zum Großteil nicht eindeutig bestimmbar. Zu erkennen sind größere Holzreste

von vermutlich *Alnus* sp., *Salix* sp., *Betula* sp. und *Vaccinium* sp., Pollensäcke und Blattschuppen von *Betula nana*, sowie *Poales*-Fasern. Ein großer Teil besteht aus nicht näher bestimmbar, kleinteiligen Material. Aufgrund dessen weicher, faseriger Struktur kann vermutet werden, dass es sich dabei um Überreste von Weidenkätzchen oder Wollgräsern (*Eriophorum* sp.) handelt. Wollgräser waren zumindest am Standort 04 vorhanden. Enthalten waren vermutlich ebenso stark verdaute *Poales*-Halme sowie zerfaserte Holzreste. Die genaue Bestimmung der Holzstämmchen war selbst nach Anfertigung von Querschnitten und Vergleich mit herbarisiertem Material nur schwer möglich. Da *Lagopus* vor allem junge Triebe und Knospen frisst (Chernov 1988) ist das Holz noch in der Wachstumsphase und nicht voll ausgebildet, wodurch sich die verschiedenen Hölzer stark ähneln und eine Bestimmung erschweren. Außerdem fehlt den meisten Holzresten die Rinde als Anhaltspunkt für eine Zuordnung und aus vielen Stämmchen können aufgrund starker Deformation keine Querschnitte angefertigt werden. Trotzdem wurde eine quantitative Untersuchung von sechs Proben vorgenommen, deren Ergebnisse sich teilweise mit den Ergebnissen aus der Sequenzierung deckten.

Bis auf eine Probe enthielten auch hier alle die bekannten Bestandteile. So waren in fünf der Kotproben Pollensäcke vorhanden, die unabhängig von der Sequenzanzahl von *Betula* sp. in der Probe auftraten. Fasern von *Poales* fanden sich nur in den *L. lagopus*-Proben, was, im Gegensatz zu *L. mutus*, auf eine Bevorzugung dieser Nahrung schließen lässt. In den beiden *L. lagopus*-Proben von Standort 04 und 02, die das größte Volumen aufwiesen, fanden sich die meisten Holzstämmchen. Interessanterweise waren in diesen Proben auch die einzigen *Salix* sp.-Sequenzen vorhanden, was bedeuten könnte, dass hier besonders viele Weidensprosse verzehrt wurden, die dann als Holzreste erhalten blieben.

Die Blattschuppen von *Betula nana* wurden nur als vollständige Exemplare gezählt, waren aber als Fragmente zahlreich im ansosnten undefinierbaren Material in allen Proben vorhanden. In der *L. mutus*-Probe vom Standort 02 fanden sich visuell nur Überreste von *Dryas* sp., wobei in den genetischen Daten ausschließlich Sequenzen von *Betula* sp. zu finden waren. Dieser Befund, zusammen mit dem Fehlen von *Vaccinium* sp. und *Poales* sp. in den Sequenzen, verdeutlicht die bereits angesprochenen Probleme, die sich bei Nutzung genetischer Methoden ergeben können. Die mikroskopischen

Untersuchungen dagegen sind sehr zeitintensiv und erfordern spezielles Wissen zur Bestimmung von stark zersetztem organischen Material. Das Anlegen einer Photodatenbank von in einer Simulation verdauten Pflanzen aus der Region ist denkbar (Soininen *et al.* 2009), aber sehr aufwendig. Eine Verbindung der Vorzüge beider Methoden ist für eine Nahrungsanalyse mit stark zersetztem organischen Material am vorteilhaftesten (Pompanon *et al.* 2011).

Das Metabarcoding ermöglicht es, viele Proben in kurzer Zeit zu bearbeiten und, vor allem mit Nutzung der NGS, eine Vielzahl von Sequenzen zu erzeugen, wodurch die Futterpflanzen identifiziert werden können. Unterstützt durch stichprobenartige mikroskopische Untersuchungen, die ein genaueres Bild von der Zusammensetzung der Probe geben und auf Unterrepräsentation von einzelnen Bestandteilen in den Sequenzen hinweisen können, ergibt sich ein recht genaues Bild der Qualität des Kotinhalts.

Die Ergebnisse der Untersuchungen haben gezeigt, dass die *Lagopus*-Arten zum Großteil dieselben Pflanzen fressen, aber durchaus Unterschiede in den Nahrungspräferenzen vorliegen. Auffällig ist dabei, dass *L. mutus* kein *Salix* sp. gefressen hat, obwohl es, wenn auch in geringem Anteil, eine Futterpflanze dieser Art ist (Chernov 1988). Das Fehlen von *Salix* in den *L. mutus*-Proben kann vermutlich auf die geringe Stichprobenzahl zurückgeführt werden.

Da sich die Schwesterarten erst vor 80.000 – 90.000 Jahren aufgespalten haben und somit relativ junge Arten sind (Quintela *et al.* 2010), kann eine hohe Überlappung der ökologischen Nische angenommen werden. Mit der zunehmenden Klimaerwärmung und der damit einhergehenden Verschiebung der Vegetationsgrenze nach Norden liegt die Vermutung nahe, dass *L. lagopus* weiter in das Habitat von *L. mutus* vordringen wird. Eine Studie, inwieweit sich die Ernährungsnischen überlappen und damit eine intraspezifische Konkurrenz herrscht, ähnlich wie z.B. bei Lemmingen durchgeführt (Soininen *et al.* 2014, Soininen *et al.* eingereicht), erscheint angebracht. Die Möglichkeit der durch die zu erwartende stärkere Habitatüberlappung zunehmenden Hybridisierung (Quintela *et al.* 2010) stellt das Barcoding dabei vor das Problem, die beiden Arten zukünftig eindeutig voneinander unterscheiden zu können. Gezielte Entwicklung von Primern und Tests an hybridisierten Vögeln sollten dieses Problem lösen können. Weiterführende populationsgenetische und ökologische Studien könnten

auch klären, ob die Hybridisierung einen positiven oder negativen Einfluss auf die *Lagopus*-Arten ausübt (Quintela *et al.* 2010).

4.7. Interaktion zwischen Herbivoren und Pflanzen

Die Folgen der Klimaerwärmung betreffen nicht nur die intraspezifischen Interaktionen zwischen *Lagopus* sondern ebenso das interspezifische Verhältnis von *Lagopus* zur Vegetation (Hakkarainen *et al.* 2007). Im Winter, wenn *Betula* sp. und *Salix* sp. den Hauptbestandteil der Nahrung ausmachen (Chernov 1988), werden 80% - 90% der Zweige über der Schneedecke abgefressen. Zweige unterhalb des Schneeniveaus oder über der Kopfhöhe der Vögel werden weitaus weniger geäst (Tape *et al.* 2010, Christie *et al.* 2014). Das Wachstum der Sträucher wird durch das Beweiden der Knospen und Triebe beeinflusst und es bildet sich eine besenartige Wuchsform mit vielen kurzen Trieben, die *Lagopus* wiederum mehr Nahrung bietet (Tape *et al.* 2010, Abb. A7). Obwohl die Sträucher dem Äsen gegenüber relativ tolerant sind, greifen die Vögel durch das Abfressen der Knospen und Kätzchen aktiv in die Reproduktion der Sträucher ein und verringern deren Konkurrenzfähigkeit gegenüber anderen Pflanzen (Hakkarainen *et al.* 2007, Christie *et al.* 2014). Bei steigenden Wintertemperaturen und sinkender Schneehöhe ist eine Veränderung der Wuchsformen der Sträucher durch verändertes Fressverhalten der Vögel denkbar (Hakkarainen *et al.* 2007). Gleichzeitig hat die zunehmende Ausbreitung von *Alnus*, *Betula* und *Salix* vermutlich einen positiven Einfluss auf die Populationsgröße, Wintersterblichkeit und Nährstoffversorgung der Weibchen im Winter (Tape *et al.* 2010, Henden *et al.* 2011). Auf dem Gebiet der intra- und interspezifischen Wechselwirkungen der *Lagopus*-Arten und ihrer Umwelt sind zahlreiche Hypothesen erarbeitet worden, die es noch zu beweisen gilt. Durch die zunehmende Zahl der Studien im Bereich der Habitatstruktur und Populationsgenetik/-dynamik (Moss *et al.* 2010) wird diese Aufgabe aktuell und in den nächsten Jahren verstärkt angegangen. Die hier angewandten Barcoding-Methoden könnten dabei einen Beitrag zum effizienten und großflächigen Arbeiten leisten. Denkbar ist auch die Anwendung der Techniken auf die Nahrung von *Lagopus*-Küken, über deren Insektenverzehr bisher nur wenig bekannt ist (Moss *et al.* 2010).

4.8. Schlussfolgerung

Die eingesetzten Marker liefern eine gute Aufschlüsselung der *Lagopus*-Arten, wobei die Unterscheidung durch zu erwartende stärkere Hybridisierung erschwert werden könnte. Mit Anwendung der RCP-PCR kann die Artbestimmung unter bestimmten Umständen vereinfacht und beschleunigt werden.

Die hier angewendete Methode liefert bei der Bestimmung der Nahrungsbestandteile solide Ergebnisse, wobei mithilfe einer Erhöhung der Probenzahl und der Verwendung von next-generation-Sequenzierern ein genaueres Abbild der Nahrungszusammensetzung der Vögel zu erwarten ist. Inwiefern die Dominanz der DNA von *Alnus* sp., *Salix* sp. und *Betula* sp. ein Problem darstellt, muss noch festgestellt werden. Durch die Anpassung des experimentellen Ansatzes, z.B. durch die Nutzung von Blockern oder gruppenspezifischen Primern, könnten eventuell mehr Pflanzen identifiziert werden. Der Einsatz von *c/d*-Primern für Moose und Farne könnte die Analyse ebenso verbessern. Die stichprobenartige mikroskopische Untersuchung des Kotes hat im Vergleich zur genetischen Methode zum Teil zu abweichenden Ergebnissen geführt. Deshalb erscheint es angebracht, beide Methoden in Kombination anzuwenden, um die Erkenntnisse aus dem Barcoding zu verifizieren.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde bewiesen, dass sich die COI-Region und die speziell entwickelten Primer dazu eignen, die Schwesterarten *L. lagopus* und *L. mutus* voneinander zu unterscheiden. Eine Artunterscheidung aufgrund äußerer Merkmale der Kotproben ist möglich, sollte aber durch genetische Methoden überprüft werden. Die Bestimmung der Futterpflanzen mithilfe von eDNA aus Kotproben unter Nutzung des Metabarcoding mit molekular markierten *g/h*-Primern hat sich ebenfalls als erfolgreich erwiesen, wobei es zum Teil Abweichungen zu den Ergebnissen aus den mikroskopischen Untersuchungen gab und beide ergänzend angewendet werden sollten. Durch den Einsatz von individuell markierten Primern und deren erfolgreichen Sequenzierung, ist eine Anwendung der Methode für next-generation-Sequenzierer und damit auch für groß angelegte ökologische Studien möglich.

6. Quellen

- A'Hara, S.W., Hancock, M., Piertney, S.B. & Cottrell, J.E. (2009). "The development of a molecular assay to distinguish droppings of black grouse *Tetrao tetrix* from those of capercaillie *Tetrao urogallus* and red grouse *Lagopus lagopus scoticus*." *Wildlife Biology* 15: 10.
- Allentoft, M.E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C.L., Hale, M.L., Campos, P.F., Samaniego, J.A., Thomas, M., Gilbert, P., Willerslev, E., Zhang, G., Scofield, R.P., Holdaway, N.R. & Bunce, M. (2012). "The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils." *Proceedings of the Royal Society* 279(1748): 8.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215(3): 8.
- Ashfaq, M., Hebert, P.D.N., Mirza, J.H., Khan, A.M., Zafar, Y. & Mirza, M.S. (2014). "Analyzing Mosquito (Diptera: Culicidae) Diversity in Pakistan by DNA Barcoding." *PLoS ONE* 9(5): 12.
- Baamrane, M.A.A., Shehzad, W., Ouhammou, A., Abbad, A., Naimi, M., Coissac, E., Taberlet, P. & Znari, M. (2012). "Assessment of the Food Habits of the Moroccan Dorcas Gazelle in M'Sabih Talaa, West Central Morocco, Using the trnL Approach." *PLoS ONE* 7(4): 7.
- Bienert, F., de Danieli, S., Miquel, C., Coissac, E., Poillot, C., Brun, J.-J. & Taberlet, P. (2012). "Tracking earthworm communities from soil DNA." *Molecular Ecology* 21: 14.
- Binladen, J., Gilbert, M.T.P., Bollback, J.P., Panitz, F., Bendixen, C., Nielsen, R. & Willerslev, E. (2007). "The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing." *PLoS ONE* 2(2): 9.
- Blok, D., Sass-Klaassen, U., Schaepman-Strub, G., Heijmans, M.M.P.D., Sauren, P. & Berendse, F. (2011). "What are the main climate drivers for shrub growth in Northeastern Siberian tundra?" *Biogeosciences* 8: 11.
- Boessenkool, S., Epp, S.L., Haile, J., Bellemain, E., Edwards, M., Coissac, E., Willerslev, E. & Brochmann, C. (2012). "Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA." *Molecular Ecology* 21: 10.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M.T.P., Carvalho, G.R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D.W. & de Bruyn, M. (2014). "Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring." *Trends in ecology & evolution* in press: 10.
- Budarf, A.C., Burfeind, D.D., Loh, W.K.W. & Tibbetts, I.R. (2011). "Identification of seagrasses in the gut of a marine herbivorous fish using DNA barcoding and visual inspection techniques." *Journal of Fish Biology* 79: 10.

Chernov, YU. I. (1988), Übersetzung von Löve, D., "The living Tundra." Press Syndicate of the University of Cambridge, ISBN 0521357543

Christie, K.S., Roger, W.R., Lindberg, M.S. & Mulder, C.P. (2014). "Herbivores Influence the Growth, Reproduction, and Morphology of a Widespread Arctic Willow." PLoS ONE 9(7): 9.

Dalén, L., Götherström, A. & Angerbjörn, A. (2004). "Identifying species from pieces of faeces." Conservation genetics 5: 3.

Dalén, L., Götherström, A., Meijer, T. & Shapiro, B. (2007). "Recovery of DNA from Footprints in the Snow." Canadian Field-Naturalist 121(3): 4.

Deagle, B.E., Eveson, J.P. & Jarman, S.N. (2006). "Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces." Frontiers in Zoology 3(11): 10.

Deagle, B.E., Gales, N.J., Evans, K., Jarman, S.N., Robinson, S., Trebilco, R. & Hindell, M.A. (2007). "Studying Seabird Diet through Genetic Analysis of Faeces: A Case Study on Macaroni Penguins (*Eudyptes chrysolophus*)." PLoS ONE 2(9): 10.

Deagle, B.E., Tollit, D.J., Jarman, N.S., Hindell, M.A., Trites, A.W. & Gales, N.J. (2005). "Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions." Molecular Ecology 14: 12.

Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P. & Miaud, C. (2011). "Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems." PLoS ONE 6(8): 4.

Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. (2012). "Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*." Journal of Applied Ecology 49: 7.

Domingo-Roura, X., Marmi, J., Ferrando, A., López-Giráldez, F., Macdonald, D.W. & Jansman, H.A.H. (2005). "Badger hair in shaving brushes comes from protected Eurasian badgers." Biological Conservation 128: 6.

Dove, H. & Mayes, R.W. (1996). "Plant wax components: A new approach to estimating intake and diet composition in herbivores." Journal of Nutrition 126(1): 14.

Epp, S.L., Boessenkool, S., Bellemain, E.P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., Erséus, C., Gusarov, V.I., Edwards, M.E., Johnsen, A., Stenøien, H.K., Hassel, K., Kauserud, H., Yoccoz, N.G., Bråthen, K.A., Willerslev, E., Taberlet, P., Coissac, E. & Brochmann, C. (2012). "New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems." Molecular Ecology 21: 13.

Frost, G.V. & Epstein, H.E. (2014). "Tall shrub and tree expansion in Siberian tundra ecotones since the 1960s." *Global Change Biology* 20: 14.

García-Robledo, C., Erickson, D.L., Staines, C.L., Erwin, T.L. & Kress, W.J. (2013). "Tropical Plant–Herbivore Networks: Reconstructing Species Interactions Using DNA Barcodes." *PLoS ONE* 8(1): 10.

Gough, L., Moore, J.C., Shaver, G.R., Simpson, R.T. & Johnson, D.R. (2012). "Above- and belowground responses of arctic tundra ecosystems to altered soil nutrients and mammalian herbivory." *Ecology* 93(7): 12.

Hajibabaei, M., Spall, J.L., Shokralla, S. & van Konynenburg, S. (2012). "Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through nondestructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol." *BMC Ecology* 12(28): 10.

Hakkarainen, H., Virtanen, R., Honkanen, J.O. & Roininen, H. (2007). "Willow bud and shoot foraging by ptarmigan in relation to snow level in NW Finnish Lapland." *Polar Biology* 30: 6.

Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.-A. (1985). "Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA." *Journal of Molecular Evolution* 22(2): 15.

Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & de Waard, J.R. (2003a). "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species." *Proceedings of the Royal Society* 270: 5.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & de Waard, J.R. (2003b). "Biological identifications through DNA barcodes." *Proceedings of the Royal Society* 270: 10.

Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. & Francis, C.M. (2004a). "Identification of Birds through DNA Barcoding." *PLoS Biology* 2(10): 7.

Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. & Hallwachs, W. (2004b). "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*." *PNAS* 101(41): 6.

Henden, J.-A., Ims, R.A., Yoccoz, N.G. & Killengreen, S.T. (2011). "Declining willow ptarmigan populations: The role of habitat structure and community dynamics." *Basic and Applied Ecology* 12: 10.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. & Little, D.P. (2011). "Choosing and Using a Plant DNA Barcode." *PLoS ONE* 6(5): 13.

Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S.M., Edwards, D.P., Tang, Y., Nakamura, A., Kitching, R., Dolman, P.M., Woodcock, P., Edwards, F.A., Larsen, T.H., Hsu, W.W., Benedick, S., Hamer, K.C., Wilcove, D.S., Bruce, C., Wang, X., Levi, T., Lott, M., Emerson, B.C. &

-
- Kaneko, H. & Lawler, R.I. (2006). "Can near infrared spectroscopy be used to improve assessment of marine mammal diets via fecal analysis?" *Marine Mammal Science* 22(2): 15.
- Levy-Booth, D.J., Campbell, R.G., Gulden, R.H., Hart, M.M., Powell, J.R., Klironomos, J.N., Pauls, K.P., Swanton, C.J., Trevors, J.T. & Dunfield, K.E. (2007). "Cycling of extracellular DNA in the soil environment." *Soil Biology & Biochemistry* 39: 15.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." *Nature* 362(6422): 7.
- Lucchini, V., Höglund, J., Klaus, S., Swenson, J. & Randi, E. (2001). "Historical Biogeography and a Mitochondrial DNA Phylogeny of Grouse and Ptarmigan." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20(1): 14.
- Moe, D. & Bjune, A.E. (2009). "Attractive Spring-food for willow grouse (*Lagopus lagopus* subsp. *lagopus* L.) studied using plant macrofossils and pollen in faeces: a methodological discussion." *Grana* 48: 7.
- Mollot, G., Duyck, P.-F., Lefeuvre, P., Lescourret, F., Martin, J.-F., Piry, S., Canard, E. & Tixler, P. (2014). "Cover Cropping Alters the Diet of Arthropods in a Banana Plantation: A Metabarcoding Approach." *PLoS ONE* 9(4): 9.
- Moss, R. (1997). "Grouse and ptarmigan nutrition in the wild and in captivity." *Proceedings of the Nutrition Society* 56: 9.
- Moss, R. & Hanssen, I. (1980). "Grouse Nutrition." *Nutrition Abstracts and Reviews* 50(11): 13.
- Moss, R., Storch, I. & Müller, M. (2010). "Trends in grouse research." *Wildlife Biology* 16(1): 11.
- Moura, C.J., Harris, D.J., Cunha, M.R. & Rogers, A.D. (2007). "Blackwell Publishing Ltd DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments." *Zoologica Scripta* 37(1): 16.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P.H. (1982). "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields." *The EMBO Journal* 1(7): 5.
- Ogden, R., McGough, H.N., Cowan, R.S., Chua, L., Groves, M. & McEwing, R. (2008). "SNP-based method for the genetic identification of ramin *Gonystylus* spp. timber and products: applied research meeting CITES enforcement needs." *Endangered Species Research* 9: 7.
- Olofsson, J., Oksanen, L., Callaghan, T., Hulme, P.E., Oksanen, T. & Suominen, O. (2009). "Herbivores inhibit climate-driven shrub expansion on the tundra." *Global*

Change Biology 15(11): 13.

Pavlov, B.M. (1974). "Belaya i tundryanaya kuropatki Taymyra." Doktorarbeit, zitiert in s. Chernov (1988)

Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M.T., Guerri, G. & Nannipieri, P. (2008). "Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance." *Biology and Fertility of Soils* 45: 17.

Plante, S., Champagne, E., Ropars, P., Boudreau, S., Lévesque, E., Tremblay, B. & Tremblay, J.-P. (2014). "Shrub cover in northern Nunavik: can herbivores limit shrub expansion?" *Polar Biology* 37: 611.

Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O.C., Brown, D.S., Jarman, S.N. & Taberlet, P. (2012). "Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing." *Molecular Ecology* 21: 20.

Ponsard, S. & Ardit, R. (2000). "What can stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) tell about the food web of soil macro-invertebrates?" *Ecology* 81(3): 13.

Quintela, M., Thulin, C.G. & Höglund, J. (2010). "Detecting hybridization between willow grouse (*Lagopus lagopus*) and rock ptarmigan (*L. muta*) in Central Sweden through Bayesian admixture analyses and mtDNA screening." *Conservation Genetics* 11: 13.

Ravolainen, V.T., Bråthen, K.A., Yoccoz, N.G., Nguyen, J.K. & Ims, R.A. (2014). "Complementary impacts of small rodents and semi-domesticated ungulates limit tall shrub expansion in the tundra." *Journal of Applied Ecology* 51(1): 8.

Revermann, R., Schmid, H., Zbinden, N., Spaar, R. & Schröder, B. (2012). "Habitat at the mountain tops: how long can Rock Ptarmigan (*Lagopus muta helvetica*) survive rapid climate change in the Swiss Alps? A multi-scale approach." *Journal of Ornithology* 153: 891.

Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K. & Lane, R. (2005). "Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding." *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360: 8.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium (2011). "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi." *PNAS* 109(16): 6.

Shapiro, B. (2008). "Engineered polymerases amplify the potential of ancient DNA." *Trends in Biotechnology* 26(6): 3.

Shehzad, W., Riaz, T., Nawaz, M.A., Miquel, C., Poillot, C., Shah, S.A., Pompanon, F., Coissac, E. & Taberlet, P. (2012). "Carnivore diet analysis based on next-generation

sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan." *Molecular Ecology* 21: 15.

Smith, M.A., Fisher, B.L. & Hebert, P.D.N. (2005). "DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar." *Philosophical Transactions of the Royal Society* 360: 11.

Soininen, E.M., Gauthier, G., Bilodeau, F., Berteaux, D., Gielly, L., Taberlet, P., Gussarova, G., Bellemain, E., Hassel, K., Stenøien, H.K., Epp, L.S., Schröder-Nielsen, A., Brochmann, C. & Yoccoz, N.G. (eingereicht). "Highly overlapping winter diet in two sympatric lemming species revealed by DNA metabarcoding."

Soininen, E.M., Ehrich, D., Lecomte, N., Yoccoz, N.G., Tarroux, A., Berteaux, D., Gauthier, G., Gielly, L., Brochmann, C., Gussarova, G. & Ims, R.A. (2014). "Sources of variation in small rodent trophic niche: new insights from DNA metabarcoding and stable isotope analysis." *Isotopes in Environmental and Health Studies* 50(3): 21.

Soininen, E.M., Zinger, L., Gielly, L., Bellemain, E., Bråthen, K.A., Brochmann, C., Epp, L.S., Gussarova, G., Hassel, K., Henden, J.-A., Killengreen, S.T., Rämä, T., Stenøien, H.K., Yoccoz, N.G. & Ims, R.A. (2013). "Shedding new light on the diet of Norwegian lemmings: DNA metabarcoding of stomach content." *Polar Biology* 36: 8.

Soininen, E.M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., Brysting, A.K., Sønstebø, J.H., Ims, R.A., Yoccoz, N.G. & Taberlet, P. (2009). "Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures." *Frontiers in Zoology* 6(16): 9.

Sønstebø, J.H., Gielly, L., Brysting, A.K., Elven, R., Edwards, M., Haile, J., Willerslev, E., Coissac, E., Rioux, D., Sannier, J., Taberlet, P. & Brochmann, C. (2010). "Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate." *Molecular Ecology* 10(6): 10.

Storch, I. (2007). "Conservation Status of Grouse Worldwide: An Update." *Wildlife Biology* 13: 8.

Storch, I. (zusammengestellt und bearbeitet) (2007). "Grouse: Status Survey and Conservation Action Plan 2006–2010 IUCN", Gland, Switzerland and Cambridge, UK and World Pheasant Association, Fordingbridge, UK.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L.H. (2012). "Environmental DNA." *Molecular Ecology* 21: 5.

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermet, T., Corthier, G., Brochmann, C. & Willerslev, E. (2007). "Power and limitation of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding." *Nucleic Acids Research* 35(3): 8.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991). "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA." *Plant Molecular Biology* 17: 5.

Tape, K.D., Lord, R., Marshall, H.P. & Ruess, R.W. (2010). "Snow-Mediated Ptarmigan Browsing and Shrub Expansion in Arctic Alaska." *Ecoscience* 17(2): 8.

Tavares, E.S. & Baker, A.J. (2008). "Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds." *BMC Evolutionary Biology* 8(81).

Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M.A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J.E. & Taberlet, P. (2009). "New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach." *Molecular Ecology Resources* 9: 10.

Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008). "DNA barcoding for ecologists." *Trends in ecology & evolution* 24(2): 8.

Valière, N., Fumagalli, L., Gielly, L., Miquel, C., Lequette, B., Pouelle, M.-L., Weber, J.-M., Arlettaz, R. & Taberlet, P. (2003). "Long-distance wolf recolonization of France and Switzerland inferred from non-invasive genetic sampling over a period of 10 years." *Animal Conservation* 6: 10.

Vences, M., Thomas, M., van der Meijden, A., Chiari, Y. & Vieites, D. (2005). "Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians." *Frontiers in Zoology* 2(5): 12.

Walrant, A. & Loreau, M. (1995). "Comparison of iso-enzyme electrophoresis and gut content examination for determining the natural diet of the groundbeetle species *Abax ater* (Coleoptera, Carabidae)." *Entomologia Generalis* 19(4): 7.

Willerslev, E., Davison, J., Moora, M., Zobel, M., Coissac, E., Edwards, M.E., Lorenzen, E.D., Vestergård, M., Gussarova, G., Haile, J., Craine, J., Gielly, L., Boessenkool, S., Epp, L.S., Pearman, P.B., Chedaddi, R., Murray, D., Brâthen, K.A., Yoccoz, N.G., Binney, H., Cruaud, C., Wincker, P., Goslar, T., Alsos, I.G., Bellemain, E., Brysting, A.K., Elven, R., Sønstebø, J.H., Murton, J., Sher, A., Rasmussen, M., Rønn, R., Mourier, T., Cooper, A., Austin, J., Möller, P., Froese, D., Zazula, G., Pompanon, F., Rioux, D., Niderkorn, V., Tikhonov, A., Savvinov, G., Roberts, R.G., MacPhee, R.D.E., Gilbert, M.T.P., Kjaer, K.H., Orlando, L., Brochmann, C. & Taberlet, P. (2014). "Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet." *Nature* 506(7486): 47.

Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M.B., Brand, T.B., Hofreiter, M., Bunce, M., Poinar, H.N., Dahl-Jensen, D., Johnsen, S., Steffensen, J.P., Bennike, O., Schwenninger, J.-L., Nathan, R., Armitage, S., de Hoog, C.-J., Alifimov, V., Christl, M., Beer, J., Muscheler, R., Barker, J., Sharp, M., Penkman, K.E.H., Haile, J., Taberlet, P., Gilbert, M.T.P., Casoli, A., Campani, E. & Collins, M.J. (2007). "Ancient Biomolecules from Deep Ice Cores Reveal a Forested Southern Greenland." *Science*

317(111): 4.

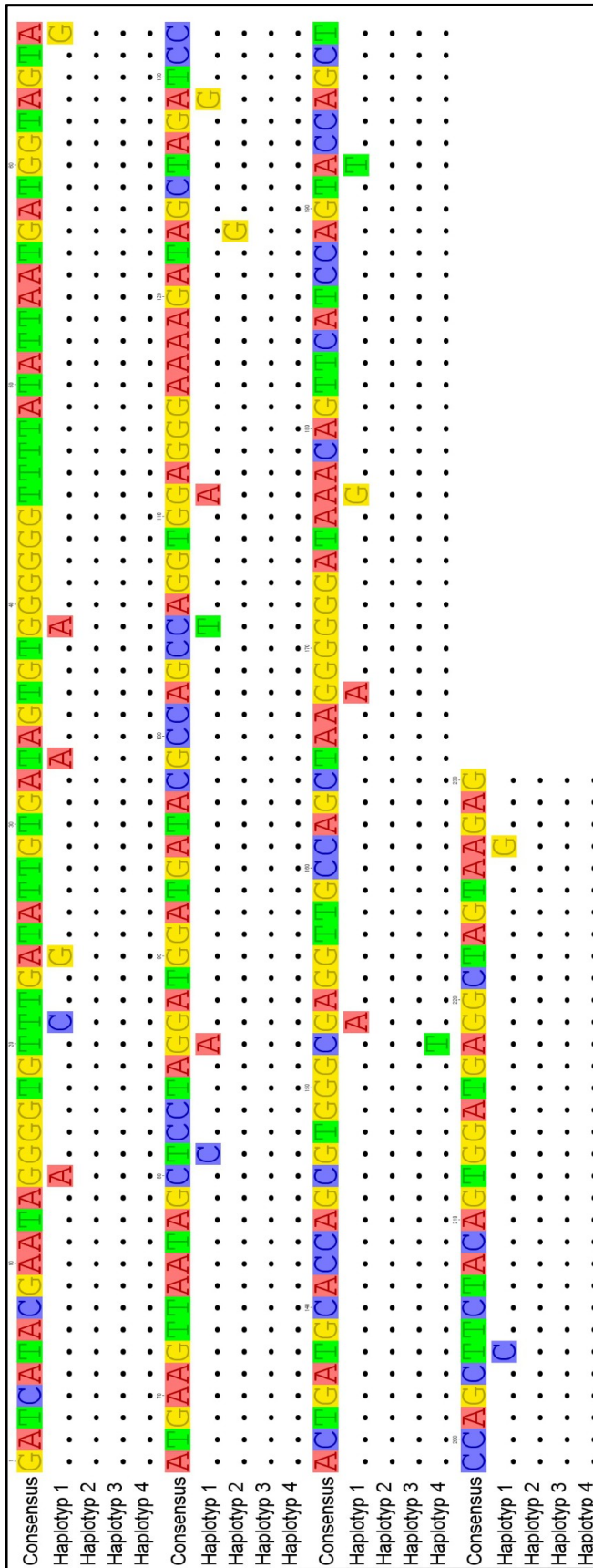
Willerslev, E. & Cooper, A. (2005). "Review Paper. Ancient DNA." *Proceedings of the Royal Society* 272: 14.

Yoccoz, N.G. (2012). "The future of environmental DNA in ecology." *Molecular Ecology* 21: 8. Zamin, T.J. & Grogan, P. (2013). "Caribou exclusion during a population low increases deciduous and evergreen shrub species biomass and nitrogen pools in low Arctic tundra." *Journal of Ecology* 101(3): 13.

Yu, D.W. (2013). "Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding." *Ecology Letters* 16: 13.

Zhang, W., Miller, P.A., Smith, B., Wania, R., Koenigk, T. & Döscher, R. (2013). "Tundra shrubification and tree-line advance amplify arctic climate warming: results from an individual-based dynamic vegetation model." *Environmental Research Letters* 8: 10.

7. Anhang



A1: Consensussequenz und Sequenzen der 4 *Lagopus*-Haplotypen

Haplotyp 1 weicht am meisten von der Consensussequenz ab und wurde später als *L. mutus* identifiziert. Die Haplotypen 2 und 4 weichen in einer Position ab, wohingegen Haplotyp 3 der Consensussequenz genau gleicht. Sequenzen 2, 3 und 4 wurden als *L. lagopus* bestimmt.

