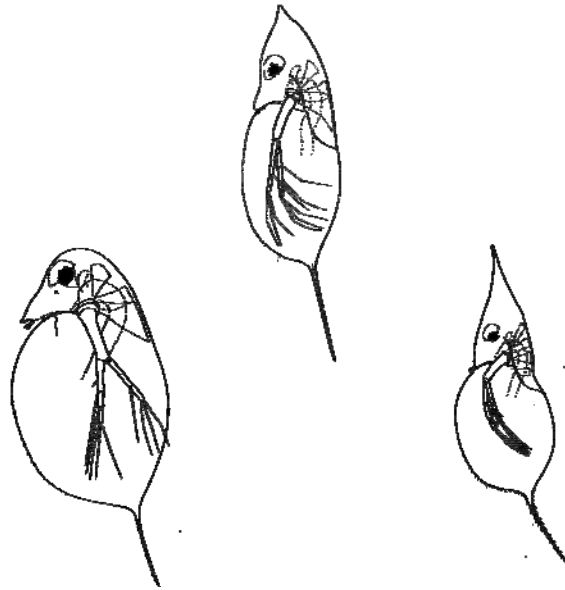


Klonale Diversität, Populationsstruktur  
und Hybridisierung im europäischen  
*Daphnia longispina*-Artkomplex



Diplomarbeit  
im Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Robert H. Kraus

im April 2007



<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Gattung <i>Daphnia</i> .....	1
1.1.1	Systematische Stellung .....	1
1.1.2	Lebensweise .....	2
1.1.3	Der <i>Daphnia longispina</i> -Artkomplex .....	4
1.2	Arten und Artbildung .....	4
1.2.1	Der Artbegriff .....	4
1.2.2	Hybridisierung und Introgression .....	7
1.3	Mikrosatelliten .....	8
1.4	Fragestellung dieser Arbeit .....	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1	Beschreibung der untersuchten Populationen .....	10
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	11
2.2.1	DNA-Präparation .....	11
2.2.2	Amplifizierung des <i>Internal Transcribed Spacer</i> (ITS)-Fragments und Analyse mit dem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) .....	14
2.2.3	Amplifizierung und Analyse der Mikrosatelliten-Marker .....	15
2.3	Statistische Auswertung .....	18
2.3.1	Genetische Struktur der untersuchten Individuen .....	18
2.3.2	Simulation von Hybriden .....	19
2.3.3	Deskriptive Statistik der Mikrosatellitendaten .....	20
2.3.3.1	Genetische Diversität und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht .....	20
2.3.3.2	Genetische Differenzierung .....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>23</b>
3.1	Erfolg der molekularen Analysen .....	23
3.2	Einteilung der Individuen nach Arten, Hybriden und Populationen .....	24
3.2.1	Visualisierung der Mikrosatellitendaten .....	24
3.2.2	Einteilung der Individuen nach Arten und Hybriden .....	26
3.2.2.1	Zuordnung nach <i>NewHybrids</i> .....	26
3.2.2.2	Zuordnung nach <i>Structure</i> .....	27
3.2.2.3	Synthese .....	29
3.2.3	Untersuchung des <i>Daphnia longispina</i> -Komplexes am Beispiel FR-BB ..	33
3.2.4	Untersuchung der Arten auf Substrukturen .....	36
3.3	Genetische Struktur des <i>Daphnia longispina</i> -Artkomplexes .....	37

3.3.1	Zusammenfassende Statistiken und genetische Differenzierung .....	37
3.3.2	Korrelation geographischer und genetischer Distanzen .....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>43</b>
4.1	Arterkennung in einem hybridisierenden Drei-Arten-Komplex .....	43
4.1.1	Erkennung der Arten .....	43
4.1.2	Identifizierung von Hybridklassen .....	45
4.1.3	Möglichkeiten zur Optimierung .....	50
4.2	Vergleichende Diversität und Populationsstruktur.....	52
4.2.1	Differenzierung.....	52
4.2.2	Klonale Diversität und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	53
<b>5</b>	<b>Schluss und Ausblick.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Anlagen.....</b>	<b>79</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>80</b>

# 1 Einleitung

Zu Beginn der Einleitung möchte ich eine kurze Übersicht zur Gattung *Daphnia* geben. Diese Einleitung wird sich vornehmlich mit Themen der systematischen Einteilung und Lebensweise dieser Tiere befassen und in einem vertiefenden Abschnitt den *Daphnia longispina*-Artkomplex näher beschreiben. In einem zweiten Teil wende ich mich dem Artbegriff zu. In diesem Abschnitt werden auch die Themen interspezifische Hybridisierung und Introgression vertieft. In einem methodisch ausgerichteten Abschnitt stelle ich dann das in dieser Studie verwendete Markersystem „Mikrosatelliten“ detaillierter vor, bevor ich mit meiner Fragestellung des Projektes in die Arbeit einleite.

## 1.1 Die Gattung *Daphnia*

### 1.1.1 Systematische Stellung

Die Gattung *Daphnia* O. F. Müller 1885 besteht aus vielzelligen Tieren, die dem Stamm der Arthropoden zuzuordnen sind. Dort gehören sie zu den Crustaceen. In der Klasse Branchiopoda (Blattfußkrebse) sind sie in die Ordnung der Diplostraca (Krallenschwänze) gestellt, wobei viel häufiger die Unterordnung Cladocera angegeben wird, um *Daphnia* in das System einzuordnen (<http://www.cladocera.de>). Andere Quellen (Myers et al. 2006) beschreiben die Cladocera selbst wiederum als Klasse und stellen in der Regel die Familie Daphniidae neben die Familien Bosminidae, Chydoridae und Macrothricidae. Innerhalb der Familie Daphniidae findet die Gattung *Daphnia* ihren Platz neben den Gattungen *Ceriodaphnia*, *Megafenestra*, *Scapholebris* und *Simocephalus*. Ob *Daphniopsis* in die Gattung *Daphnia* gestellt werden sollte, ist Gegenstand kontroverser Diskussion (Benzie 2005, Myers et al. 2006). Die weitere Einteilung in Untergattungen wird durch Benzie (2005) in *Ctenodaphnia* Dybowski & Grochowski, 1895; *Daphnia* s.s. O. F. Müller, 1785 und *Hyalodaphnia* Schödler, 1865 vorgenommen, durch Colbourne & Hebert (1996) und Petrussek et al. (2005) in die drei Gruppen *Ctenodaphnia*, *Daphnia* s.s. (*Daphnia pulex*-Gruppe) und *Hyalodaphnia* (*Daphnia longispina*-Gruppe). Innerhalb der *Daphnia longispina*-Gruppe wurde durch Petrussek et al. (2007) kürzlich eine Revision der Arten vorgeschlagen. Die

Arten *D. hyalina*, *D. rosea* und *D. zschokkei* werden unter dem Namen *D. longispina* O. F. Müller, 1776 zusammengefasst. Die in letzter Zeit in der Literatur als *D. longispina* bezeichnete Art stellt meist Tiere der Art *D. lacustris* G. O. Sars, 1862 dar. In der vorliegenden Arbeit werden die Artnamen und -zuordnungen durchgängig nach dieser Beschreibung verwendet.

Die eben beschriebene Stellung der Gattung soll aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die systematischen Zuordnungen in vielen Untergruppen der Gattung *Daphnia* bis heute nicht eindeutig geklärt werden konnten. Es gibt zwar viele regionale Ansätze oder Untersuchungen von abgegrenzten Systemen, doch aus morphologischer Sicht fehlten bisher Merkmale, die zur Aufklärung der Phylogenie der ganzen Gattung herangezogen werden konnten (Benzie 1986). Eine molekulare Phylogenie von Colbourne & Hebert (1996), klärte zumindest eine Einteilung in Großgruppen auf. Schwenk et al. (2000) konnten das aktuelle Bild um eine detailliertere Untersuchung in Europa erweitern (zusammengefasst in Benzie 2005). Dabei ist eine besondere Herausforderung die Tatsache, dass in einigen Komplexen häufige Hybridisierung solche Ansätze scheitern lässt. Die Beschreibung der Arten erfolgte traditionell durch morphologische Merkmale. Heute ist dieses Artkonzept wegen seiner geringen Auflösung zwar überholt, aber dennoch eine wichtige Grundlage. Vor allem im Hinblick auf die hier untersuchten Arten der Gattung *Daphnia* zeigt sich, dass das Morphospezies-Konzept nicht greift. Es gibt innerhalb der untersuchten nah verwandten Arten nahezu kontinuierliche Übergänge und hohe phänotypische Plastizität in der Morphologie; siehe z.B. Wesenburg-Lund (1926) für *D. cucullata* und Glagolev (1986) für *D. galeata*. Außerdem treten jahreszeitenabhängig unterschiedliche Phänotypen auf (Zyklomorhose), was erstmals durch Wesenburg-Lund (1908) am Beispiel von *D. longispina* beschrieben wurde. Dies erschwert eine systematische Einteilung.

### **1.1.2 Lebensweise**

Die Vertreter der Gattung *Daphnia* stellen eine der am besten bekannten und weltweit verbreiteten Gruppen des Süßwasserzooplanktons dar (Benzie 2005). Ihre weite Verbreitung verdanken sie der großen Breite ihrer ökologischen Nischen. Sie bewohnen von kleinen temporären Tümpeln bis hin zu großen Seen, von sehr klaren bis sehr trüben und von sehr gering salzigen bis hoch salinen Habitaten praktisch das gesamte

Spektrum der Binnengewässer, wobei es keine marinen Formen gibt (Hebert 1978, Benzie 2005). Die größte Diversität an Arten findet man in den gemäßigten und höheren geographischen Breiten (Fernando 2002). In vielen Bereichen der Forschung ist *Daphnia* ein wichtiger Modellorganismus. In der Vergangenheit wurden an Daphnien klassische Arbeiten über Genetik, Evolution und Populationsbiologie verfasst (Banta 1939, Slobodkin 1954, Hutchinson 1967, Hebert 1978, De Meester 1996). Aktuell haben sich diese Tiere als Modellorganismus sowohl in der Ökotoxikologie, Limnologie, Ökologie, evolutionären Genetik und Populationsgenetik (Lynch & Spitze 1994, Stark & Banks 2003) als auch in der Genomik (*The Daphnia Genomics Consortium*: <http://daphnia.cgb.indiana.edu/>) etabliert. Besonders in experimentellen Disziplinen sind Daphnien seit Jahrzehnten sehr beliebt, da sie leicht zu halten sind und klonale Linien bilden können (z.B. Frank 1952, Frank 1957, Small 1962).

Eine weitere Besonderheit dieser Gattung ist ihr Reproduktionszyklus, der überwiegend zyklisch parthenogenetisch erfolgt (Banta 1939, Brooks 1957, Hebert 1978, Zaffagnini 1987). Dabei werden von asexuellen Weibchen zum einen Subitaneier produziert, die sich ohne Befruchtung entwickeln können. Die aus den Subitaneiern resultierenden Nachkommen gleichen genetisch dem Muttertier (Bildung klonaler Linien). Zum anderen sind parthenogenetische Weibchen aber auch in der Lage, bei verschiedenen Verschlechterungen der Umweltbedingungen Männchen und Weibchen zu produzieren, die in einem sexuellen Zyklus so genannte Ehippien bilden, in denen sich bis zu zwei Dauereier befinden können. Die sexuelle Reproduktion dient der Erhöhung der genetischen Diversität durch Rekombination und zusätzlich fungieren die befruchteten Eier als Überdauerungsstadium im Sediment. Dabei bietet die chitinisierte Hülle des Ehippiums besonderen Schutz gegen extreme Bedingungen, wie Temperaturstress und Trockenheit (Benzie 2005). Die Produktion sexueller Individuen wird meist nur bei ungünstigen Umweltbedingungen initiiert, wozu zum Beispiel der Mangel an Nahrung, die Änderung der Photoperiode und zu hohe Populationsdichten zählen (Banta & Brown 1929, Hebert 1978, Hobaek & Larsson 1990, Kleiven et al. 1992).

### 1.1.3 Der *Daphnia longispina*-Artkomplex

Nach Petrušek et al. (2007) besteht der *D. longispina*-Komplex aus *D. lacustris* G. O. Sars, 1862; *D. longispina* O. F. Müller, 1776 ; „*D. umbra*“; *D. cucullata* G. O. Sars, 1862; *D. galeata* G. O. Sars, 1863 in Europa, und den nearktischen Arten *D. mendotae* Birge, 1918; *D. dentifera* Forbes, 1893 und *D. thorata* Forbes, 1893. Bis auf die noch nicht offiziell beschriebene Art „*D. umbra*“ hybridisiert in diesem Komplex jede der Arten mit mindestens einer anderen, wobei *D. galeata* die am stärksten hybridisierende Art ist (Taylor et al. 2005). In dieser Studie sind die drei Arten *D. longispina*, *D. galeata* und *D. cucullata* als *Daphnia longispina*-Artkomplex zusammengefasst, da sie sehr nah verwandt sind. Diese drei Arten lassen sich recht eindeutig anhand ihrer Kopfform, der Ausbildung des Rostrums und des Antennulähügels (*antennula mound*) unterscheiden (Flößner 2000, Benzie 2005). Je nach Morphotyp hat *D. longispina* einen symmetrischen (*D. hyalina*-Morphotyp) bis asymmetrischen (*D. rosea*) Kopf, nach hinten versetzte Antennulae, einen schwach bis gar nicht ausgeprägten Antennulähügel und ein spitzes Rostrum (Abbildung 1A-C). *D. galeata* lässt sich am asymmetrischen Kopf (gelegentlich mit induziertem spitzem Helmfortsatz) und stark ausgeprägtem Antennulähügel erkennen (Abbildung 1F und G). Im Gegensatz zu den anderen beiden Arten hat *D. cucullata* keinen Antennulähügel. Die Antennulae sitzen direkt am stark abgerundeten Rostrum (Abbildung 1E und F). Allerdings gibt es viele Phänotypen, bei denen diese Merkmale meist nicht so deutlich voneinander abzugrenzen sind. Wie oben beschrieben machen phänotypische Plastizität sowie die morphologisch intermediären Hybride die Identifikation der drei Arten allein anhand der Morphologie oft sehr schwierig. Zusätzlich tritt im *D. longispina*-Artkomplex die häufigste Hybridisierung im *D. longispina*-Komplex auf, was die morphologische Zuordnung zu Arten erschwert - siehe zusammenfassende Arbeiten von (Schwenk & Spaak 1997, Schwenk et al. 1998, Giessler et al. 1999).#

## 1.2 Arten und Artbildung

### 1.2.1 Der Artbegriff

Der Begriff „Art“ in der Biologie bezeichnet eine Kategorie der Taxonomie. Obwohl er als basale Einheit von Analysen unerlässlich für viele Felder der Forschung ist (Sites & Marshall 2003) und allgemein verwendet wird, ist seit Jahrzehnten keine



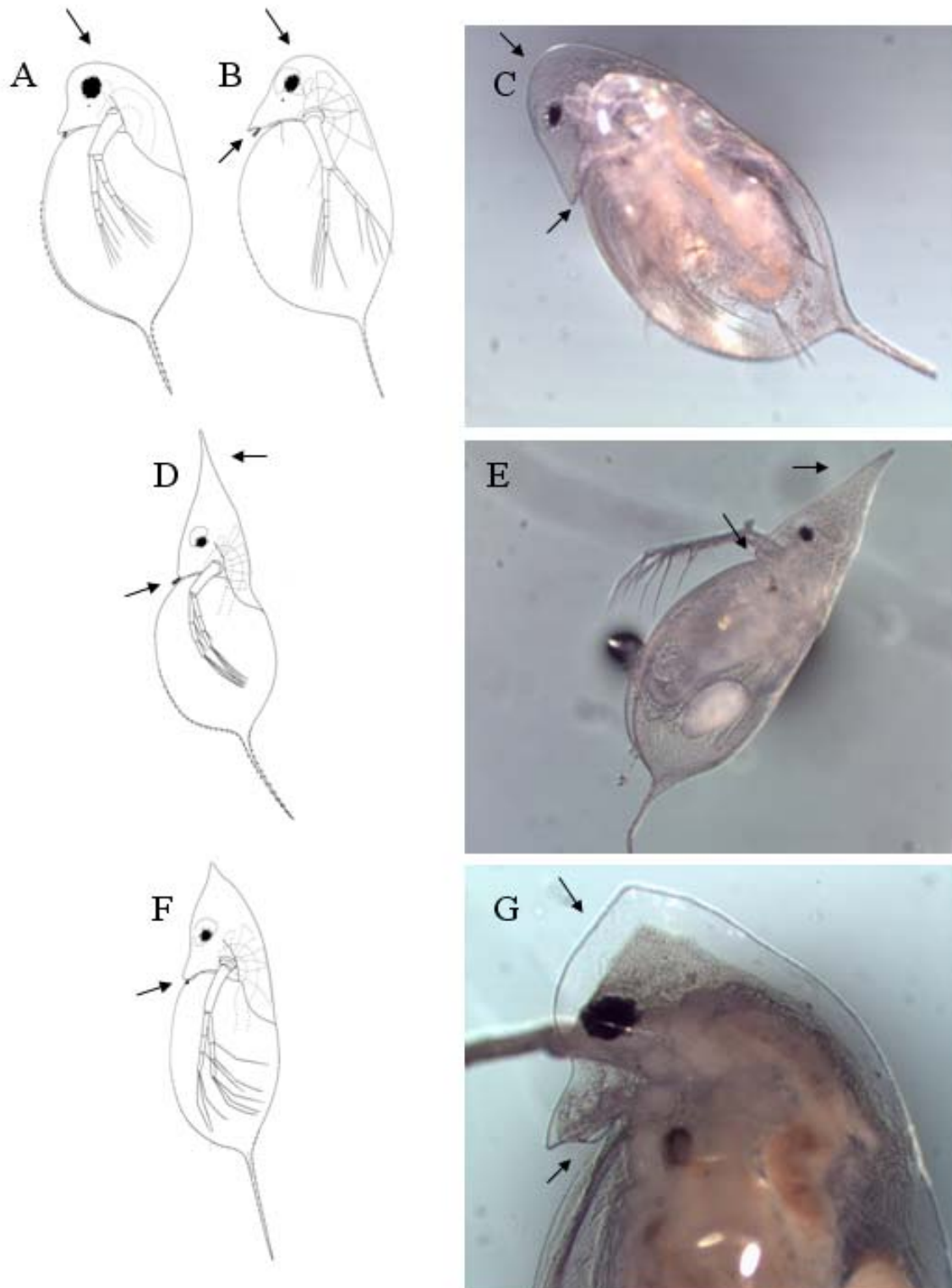


Abb. 1: Arten des *D. longispina*-Artkomplexes. Es sind sowohl schematische Zeichnungen aus Benzie (2005, links) dargestellt als auch digitale Photographien (40x, C, E und G). A-C: *D. longispina* (A: *D. rosea*-Morphotyp; B-C: *D. hyalina*-Morphotyp); D-E: *D. cucullata*; F-G: *D. galeata*. Die Pfeile deuten auf die für die Identifizierung der drei Arten wichtigsten Merkmale hin: Rostrum, Symmetrie des Kopfes, Antennulae und Antennulahügel. Siehe Haupttext für Details.

allgemeingültige klare Definition erreicht worden (Coyne & Orr 2004). Als wissenschaftlicher Ursprung des Artbegriffs kann die Definition gelten, dass gleiche (bzw. sehr ähnliche) Individuen in der kleinsten biologisch realen Kategorie „Art“ zusammengefasst werden. Dieser frühe Artbegriff, auch als Morphospezieskonzept bekannt, wurde von Carl von Linné eingeführt. Er war der Begründer der Taxonomie und teilte die Organismen im 18. Jahrhundert in seiner *Systema Naturae* Arten nach ihren Ähnlichkeiten zueinander ein (Linneaus 1758). Es liegt auf der Hand, dass dieses Artkonzept zu Problemen führt (z.B. bei Sexualdimorphismus). Aus diesem Grunde wurden seit Beginn des 20. Jahrhunderts immer wieder neue Definitionen der Art entwickelt. Keine der Definitionen ist falsch, sie haben alle unterschiedliche Anwendungsgebiete. Das bekannteste dieser Konzepte ist das biologische Artkonzept (Mayr 1942), in dem eine Art als Gruppe von Individuen bezeichnet wird, die sich zumindest potentiell miteinander verpaaren können und reproduktiv von anderen solchen Gruppen isoliert sind. Im vorliegenden Fall der Gattung *Daphnia* findet man beträchtliche Hybridisierung. Hybridisierung ist die erfolgreiche Verpaarung zwischen zwei Arten. Wenn man also mit *Daphnia* arbeitet, sollte man andere Konzepte in Betracht ziehen, die erklären, warum es zwar keine reproduktive Isolation zwischen den nah verwandten Arten gibt, aber dennoch eine gentische Isolation gefunden wird.. Gut geeignet erscheint hier das evolutionäre Artkonzept nach Wiley (1978). Er beschreibt Arten als einzelne Linien von Populationen oder Organismen, die ihre Identität gegenüber anderen solchen Linien bewahren. Dies schließt Hybridisierung nicht aus, lässt aber trotzdem eine Abgrenzung von Arten zu, solange durch Hybridisierung keine vollständige Homogenisierung auftritt. Andere Artkonzepte (zusammengefasst in Futuyma 2005) sind z.B. das phylogenetische Artkonzept (Cracraft 1989, de Queiroz & Donoghue 1990), das genealogische Artkonzept (Baum & Shaw 1995), das Rekognitionsartkonzept (Paterson 1985) und das Kohäsionsartkonzept (Templeton 1989). Im Falle der Daphnien scheinen die letztgenannten Konzepte weniger gut zu passen als das evolutionäre Artkonzept. Das phylogenetische Artkonzept setzt – ähnlich wie das biologische Artkonzept – voraus, dass sich Arten in ihrem Stammbaum immer weiter verzweigen. Hybridisierung führt allerdings zu netzartiger Evolution (Makarenkov & Legendre 2004, Moret et al. 2004). Auch das genealogische Artkonzept, in dem Arten als exklusive Gruppen definiert sind, in denen deren Mitglieder näher zueinander verwandt sind als zu allen anderen Organismen außerhalb dieser Gruppe, hat durchaus Schwierigkeiten mit den Möglichkeiten der Hybridisierung,

---

da Hybride mit beiden Elterarten gleich nah verwandt sind. Eine Bewertung der möglichen adäquaten Artkonzepte für *Daphnia*, besonders bei dem hier untersuchten Artkomplex, folgt im Abschnitt Diskussion.

### 1.2.2 Hybridisierung und Introgression

Wie beschrieben stellt introgressive Hybridisierung die Forschung in der Evolutionsbiologie, Taxonomie und Ökologie vor besondere Herausforderungen, was die Einteilung von Individuen zu Arten angeht. Dabei variiert die Häufigkeit des Auftretens von Hybridisierung ebenso wie deren Auswirkungen. Zum einen kann Hybridisierung z.B. Sterilität oder erhöhte Sterblichkeit auslösen (Barton & Hewitt 1985), zum anderen, vor allem bei Pflanzen, können höhere Fruchtbarkeit und Wachstumsrate, Resistenz gegen biotische und abiotische Faktoren die Folge sein (Birchler et al. 2003). Weiterhin können aufgrund neuer genetischer Kombinationen neue Arten entstehen (Arnold 1997) oder bereits bestehende durch Konkurrenz verdrängt werden (Wolf et al. 2001). Hybridisierung ist natürlich nur dort möglich, wo Arten sympatrisch auftreten. Dabei hängt das Ausmaß der Hybridisierung von einem Gleichgewicht zwischen der Selektion gegen die Hybride und ihrer Fähigkeit zur Ausbreitung ab. Barton & Hewitt (1985) gehen in ihrem *tension zone model* davon aus, dass das Bestehen einer Hybridzone unabhängig von der Umwelt ist und vielmehr davon abhängt, dass Hybride immer wieder neu von den Elternarten gebildet werden müssen, da sie aufgrund verminderter Fitness nicht zur Reproduktion in der Lage sind. Dahingegen geht Moore (1977) davon aus, dass Hybride ihren Elternarten in bestimmten Umwelten sogar überlegen sind. Dies wurde auch für Daphnien durch Spaak & Hoekstra (1995) nachgewiesen. Sie schildern in ihrer Arbeit, dass nach der *temporary hybrid cline hypothesis* Hybridisierung bevorzugt dann auftritt, wenn sich die ökologischen Parameter im Habitat wandeln, für die die Parentalarten unterschiedliche Präferenzen haben. Bei längerer Dauer der Hybridisierungsereignisse steigt das Introgressionspotential. Anderson (1953) beschreibt Introgression als den Transfer genetischen Materials einer Art in den Genpool einer anderen. Dies geschieht in Abhängigkeit vom Grad der reproduktiven Isolation und der Fitness der Hybride durch Rückkreuzungen mit einer Parentalart. Solche Organismen, die einen Teil des genetischen Materials einer anderen Art tragen, werden als Rückkreuzungshybride bezeichnet.

### 1.3 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten sind tandemartige Wiederholungen von 1-6 bp langen DNA-Sequenzmotiven, die in großer Vielzahl im Genom der meisten Taxa vorkommen (Selkoe & Toonen 2006). Diese Abschnitte sind hoch variabel mit Mutationsraten in der Größenordnung von  $10^{-2}$  (Dallas 1992, Brohede et al. 2004) bis  $10^{-6}$  (Schug et al. 1997, Schlötterer et al. 1998, Schug et al. 1998, Vazquez et al. 2000). Das macht sie in vielen Feldern der Biologie (Genkartierung, Populationsstudien, Vaterschaftstests, Verhaltensökologie, genomische Krebsforschung und forensische Identifikation) zu beliebten Markern (Goldstein & Schlötterer 1999). Einfache Präparation und Lagerung der Proben in Ethanol (im Gegensatz z.B. zu der Lagerung in flüssigem Stickstoff bei Allozymanalysen), gute Amplifizierbarkeit der kleinen Fragmente und der hohe Informationsgehalt dieser codominanten, nach Mendel vererbten Marker haben sie in den letzten Jahren so erfolgreich gemacht. Leider gibt es zur Zeit kein gängiges Mutationsmodell, nach dem diese DNA-Abschnitte evolvieren (Chistiakov et al. 2006, Selkoe & Toonen 2006). Nach der ursprünglichen Idee, dass Mikrosatelliten dem *infinite allele model* (IAM, unendliches Allelmodell) gehorchen, wonach bei jeder Mutation ein neues Allel entsteht (Kimura & Crow 1964), wurde lange das *stepwise mutation model* (SMM, schrittweises Mutationsmodell Kimura & Ohta 1978) angewendet. Verschiedene Studien zum Mutationsverhalten der Mikrosatelliten deckten allerdings auf, dass dieses deutlich komplexer ist, als ursprünglich angenommen. Verschiedene Versuche, das bestehende Modell zu erweitern (Dirienzo et al. 1993, Valdes et al. 1993, Dirienzo et al. 1994) brachten keine grundlegenden Verbesserungen (Balloux & Lugon-Moulin 2002). Balloux & Lugon-Moulin (2002) raten zur Vorsicht bei der Abschätzung von Populationsdifferenzierung mit Mikrosatellitenmarkern. Sobald die Annahmen des SMM nur leicht verletzt werden, liefert das von Slatkin (1995) eingeführte  $R_{ST}$  schlechtere Werte als Wrights  $F_{ST}$  (1951).

### 1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Probleme bei der Artidentifizierung sind weit verbreitet in der Gattung *Daphnia*. Besonders im *D. longispina*-Artkomplex herrschen Zyklomorphose, phänotypische Plastizität und introgressive Hybridisierung vor, eine morphologische Artdifferenzierung ist schwierig, eine Identifizierung der Hybride oder Hybridklassen sogar kaum möglich. Da es aber durchaus ökologische Unterschiede zwischen den Elternarten und deren

Hybriden gibt, ist es wichtig, für regionale ökologische Fragestellungen eine zuverlässige Identifizierung sowohl der Arten als auch der Hybridklassen zu ermöglichen. Die nach Billiones et al. (2004) entwickelte ITS-RFLP-Methode, die auf molekularen Markern beruht, scheint nicht zuverlässig alle europäischen Populationen abzudecken (Skage et al. 2007; eigene Beobachtungen). Das neu entwickelte Mikrosatellitenmarkersystem (Brede et al. 2006) wurde schon in verschiedenen Studien getestet (Sandrock 2005, Thielsch 2005, Heubach 2006, Meier 2006, Claßen 2007). Dabei standen aber ebenfalls immer nur regionale Komplexe im Blickpunkt. Hier sollen diese Marker im gesamten Verbreitungsgebiet der Arten getestet werden. Aus populationsbiologischer Sicht soll getestet werden, welchen Einfluss Hybridisierung auf diese Arten hat und ob es regionale Unterschiede in der Populationsstruktur gibt. Zum Beispiel könnte die introgressive, interspezifische Hybridisierung Einfluss auf die genetische Diversität der Individuen in Populationen haben, in denen eine Art des Komplexes sympatrisch mit mindestens einer ihrer beiden Schwesternarten vorkommt („betroffen“ von Hybridisierung). Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Populationen, die in ihrem Habitat nicht in Kontakt mit ihren Schwesternarten kommen und somit nicht von Hybridisierung „betroffen“ sind. Folgende Fragestellungen wurden in dieser Studie bearbeitet:

- Sind die verwendeten Mikrosatelliten geeignet, um Artidentifizierung im *D. longispina*-Artkomplex im gesamten Verbreitungsgebiet durchzuführen?
- Lassen sich auch die verschiedenen Hybridklassen F1, F2 und Rückkreuzungen identifizieren?
- Durch welche populationsgenetische Struktur sind die Arten *D. galeata*, *D. longispina* und *D. cucullata* gekennzeichnet? Gibt es Unterschiede zwischen sympatrischen und allopatrischen (nicht „betroffen“ von Hybridisierung) Populationen?

## 2 Material und Methoden

Der Abschnitt „Material und Methoden“ gliedert sich in drei Teile. Der erste Teil gibt einen Überblick über die untersuchten Lokalitäten und Populationen. Im zweiten Teil werden die verwendeten molekularbiologischen Methoden dargestellt und der dritte Teil beschreibt die Methoden zur statistischen Auswertung.

### 2.1 Beschreibung der untersuchten Populationen

In der vorliegenden Studie wurden 1155 Individuen der drei Arten *Daphnia longispina*, *Daphnia galeata* und *Daphnia cucullata* molekularbiologisch untersucht. Die Tiere stammen aus 33 Lokalitäten aus ganz Europa (Abb. 2, Tab. 1). Eine Übersicht über die

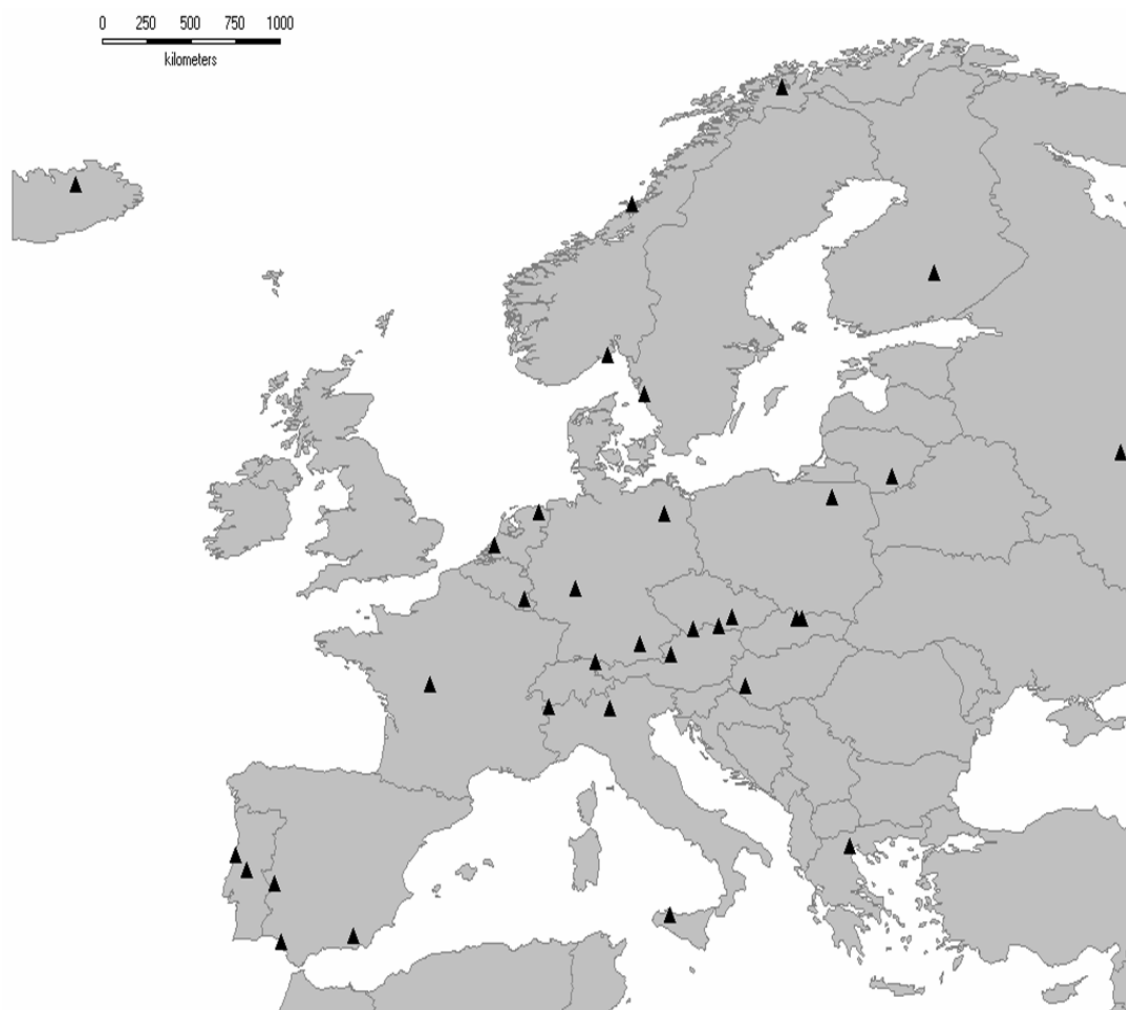


Abb. 2: Übersicht über die Lokalitäten. Jedes Dreieck zeigt den Sammelort einer Probe.

verwendeten Abkürzungen der Lokalitäten, Anzahl der Individuen pro Lokalität sowie Informationen zur geographischen Lage und Herkunft der Proben gibt Tabelle 1. Dabei waren manche der Proben (GR-AL, CZ-BR, LT-DR, FR-BB, NL-GRO, RU-GL, IS-MY, FI-PY, PL-M) bereits nach Morphologie (Flößner 2000, Benzie 2005, Petrusek et al. 2005) durch die zur Verfügung stehenden Personen vorsortiert, weshalb mir nicht alle dort vorkommenden, sondern nur bestimmte Taxa zur Analyse zur Verfügung standen. Aus den unsortierten Gesamtzooplanktonproben (SP-CO, HU-KB, IT-PDA, LU-ES, DE-UHW) wurden von mir zunächst die Individuen ausgesucht, die morphologisch den Arten des *Daphnia longispina* Artkomplexes zuzuordnen waren. Zu den Populationen SP-BA, DE-BO, PT-CB, NL-DH, NO-GOK, SE-GB, AT-MS, SK-NJ, NO-NFV, IT-PI, CZ-RM, SK-SAT, CH-B, DE-SS, NO-SV, PT-V, CZ-VR und SP-ZH wurden von den in Tab. 1 erwähnten Personen die Mikrosatelliten-Genotypinformationen bereitgestellt. Als Vergleichstiere wurden die Laborklone mit den Bezeichnungen 33 (*D. cucullata*), 100 (*D. galeata*) sowie X1, X4, X5, X16 (Hybride aus ♀33 und ♂100) und GCL1 (Hybrid aus ♀100 und ♂33) analysiert. Diese Klone wurden in (Schwenk et al. 2001) unter den Bezeichnungen C2 (33), G1 (100), CG1 (X1), CG4 (X4), CG5 (X5) sowie CG8 (GCL1) eingeführt und bereits in anderen Untersuchungen verwendet, z.B. (Billiones et al. 2004). Die Mikrosatelliten-Genotypinformationen der Laborklone stammen aus einer Untersuchung von (Thielsch et al. 2007).

Wenn möglich, wurden von fünf Individuen der meisten Lokalitäten mit der Software „Motic Images Plus 2.0“ digitale Fotos durch das Mikroskop erstellt (moticom2000, 2 Megapixel an Leica DME Mikroskop; 40fache Vergrößerung).

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 DNA-Präparation**

Alle Proben wurden unmittelbar nach der Probennahme in 70-90% Ethanol eingelegt und gelagert. Um den Ethanol zu entfernen, wurden die einzelnen Individuen vor der DNA-Präparation mindestens vier Stunden oder über Nacht in 1 ml 1x TE-Puffer (10x: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) gegeben. Je nach Größe der Tiere wurden diese

Tab. 1: Übersicht über die untersuchten Populationen. Die Populationsbezeichnung ergibt sich aus dem Sammelort der Proben. In der Spalte „N<sub>i</sub>“ ist die Anzahl der analysierten Individuen angegeben, die Herkunftsländer sind entsprechend dem ISO 3361 Standard (ISO3166 2007) abgekürzt. Außerdem ist angegeben, welche Personen die Proben bereitgestellt haben („Quelle“), und ob es sich um die bereits analysierten Mikrosatelliten-Genotypen gehandelt hat<sup>1)</sup>.

Populationsbezeichnung	Populationsabkürzung	N <sub>i</sub>	Land	geographische Breite	geographische Länge	Quelle
Aliakmona	AL	5	GR	40,564	22,504	K. Schwenk
Badajoz <sup>1)</sup>	BA	32	SP	39,178	-6,846	A. Thielsch
Bodensee <sup>1)</sup>	BO	33	DE	47,567	9,517	N. Brede
Brno	BR	39	CZ	49,260	16,455	A. Petrussek
Castelo do Bode <sup>1)</sup>	CB	25	PT	39,670	-8,232	J. Pereira, B. Castro
Cogollo	CO	33	SP	37,210	-2,835	K. Schwenk
Delftse Houd <sup>1)</sup>	DH	28	NL	51,980	4,350	A. Thielsch
Drabuzis	DR	38	LT	54,567	24,650	K. Schwenk
Esch-sur-Sûre	ES	30	LU	49,903	5,875	I. Thys
Etang de Bellebouche	BB	50	FR	46,711	1,103	K. Schwenk
Goksjo <sup>1)</sup>	GOK	32	NO	59,173	10,165	A. Thielsch
Göteborg <sup>1)</sup>	GB	32	SE	57,700	12,000	A. Thielsch
Groningen	GRO	12	NL	53,217	6,633	K. Schwenk
Ismaning <sup>1)</sup>	IS	32	DE	48,221	11,772	A. Thielsch
Kis-Balaton	KB	7	HU	46,635	17,172	J. Nedli
Lake Glubokoe	GL	21	RU	55,450	36,310	K. Schwenk
Lake Myvatn	MY	30	IS	65,583	-16,983	A. Einarsson



Tab. 1: Fortsetzung

Populationsbezeichnung	Populationsabkürzung	N <sub>i</sub>	Land	geographische Breite	geographische Länge	Quelle
Lake Pyhajarvi	PY	16	FI	62,292	26,769	K. Schwenk
Mikolajkie	M	12	PL	53,775	21,592	P. Dawidowicz
Mondsee <sup>1)</sup>	MS	24	AT	47,850	13,390	A. Thielsch
Nizne Jamnicke <sup>1)</sup>	NJ	32	SK	49,203	19,772	A. Thielsch
Nordfjordvatn <sup>1)</sup>	NFV	32	NO	69,273	19,021	A. Thielsch
Piana Degli Albanesi	PDA	26	IT	37,977	13,301	F. Marrone
Piano <sup>1)</sup>	PI	32	IT	45,780	10,230	A. Thielsch
Rimov <sup>1)</sup>	RM	39	CZ	48,807	14,491	A. Thielsch
Satanie <sup>1)</sup>	SAT	31	SK	49,170	20,063	A. Thielsch
St. Bernard <sup>1)</sup>	B	32	CH	45,871	7,170	A. Thielsch
Stechlinsee <sup>1)</sup>	SS	30	DE	53,150	13,033	A. Thielsch
Storveavatn <sup>1)</sup>	SV	32	NO	64,844	11,376	A. Thielsch
Usingen, Hattstein Weiher	UHW	36	DE	50,344	8,509	R. H. Kraus
Vela <sup>1)</sup>	V	22	PT	40,269	-8,794	J. Pereira, B. Castro
Vranov resevoir <sup>1)</sup>	VR	241	CZ	48,908	15,817	S. Ruthová
Zahillo <sup>1)</sup>	ZH	32	SP	36,990	-6,510	A. Thielsch
LABORKLONE		7				

danach in 30-100  $\mu\text{l}$  H3-Puffer (1x: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 0,05 M Kaliumchlorid, 0,005% Tween-20 und 0,005% NP-40) überführt, mit 2  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Sigma Aldrich) versetzt und mindestens vier Stunden oder über Nacht im Wasserbad bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch Erhitzen auf 95-100°C für 12 min. Die Proben wurden danach bei 4°C gelagert.

### **2.2.2 Amplifizierung des *Internal Transcribed Spacer* (ITS)-Fragments und Analyse mit dem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)**

Um eine genetische Zuordnung zu den verschiedenen Taxa des *D. longispina*-Artkomplexes und deren Hybriden vornehmen zu können, wurde für jedes Individuum das ITS-Fragment amplifiziert. Dieses nukleäre DNA-Fragment setzt sich aus den Genen ITS2, 5.8S, ITS1 und einem Teil von 18S zusammen und weist für Hyalodaphnien artspezifische Sequenzunterschiede auf (Schwenk et al. 2000, Billiones et al. 2004). Bei dieser Methode wird mit den Restriktionsenzymen *Sau96 I* und *Mwo I* (beide NEB) in zwei getrennten Ansätzen das ITS-PCR-Produkt geschnitten (Billiones et al. 2004). Jedoch wurde durch die detaillierten Untersuchungen von (Petrušek et al. 2005) festgestellt, dass es einige *D. galeata*-Genotypen gibt, die das Schnittmuster von *D. galeata x cucullata* Hybriden zeigen. Aus diesem Grund haben Skage et al. (2007) ein neues Protokoll mit den Restriktionsenzymen *BsrB I* und *Eag I* (NEB) entwickelt („*double digest*“).

Im Originalprotokoll ist das ITS-Fragment etwa 1450 Basenpaare (bp) lang. Bei dem auf die PCR (Saiki et al. 1985) folgenden Verdau wird bei allen Arten des *D. longispina*-Komplexes davon ein 75 bp großes Fragment abgeschnitten, das einen erfolgreichen Verdau anzeigt. In der Praxis hat sich gezeigt, dass diese Bande aufgrund ihrer geringen Größe auf dem Gel nur schwer zu identifizieren ist. Darum habe ich zur Amplifizierung des ITS-Fragments ein nach Skage et al. (2007) verändertes Protokoll (siehe Skage et al. 2007, Appendix) verwendet, in dem der *forward*-Primer durch den folgenden ersetzt wurde: 5'-GGT AAC CGC TGA ACC TCC TTC-3'. Ein Reaktionsansatz besteht aus 1x Amplifikationspuffer, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu\text{M}$  jedes Primers und 1 Unit/ $\mu\text{l}$  *Taq*-Polymerase (alles Invitrogen). Das Volumen des Ansatzes wurde mit sterilem destilliertem Wasser (< 0,05  $\mu\text{S}$ , Seralpur Pro 90 CN Seradest-Anlage) auf 7,5  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

Die Amplifikation wurde in einer PCR-Maschine PTC-225 Engine Tetrad (MJ Research) mit folgendem Programm durchgeführt: Vordenaturierung bei 94°C für 3 min; 35 Zyklen: Denaturierung bei 94°C für 1 min Anlagerung bei 60°C für 1 min, Synthese bei 72°C für 1 min und abschließender Synthese nach allen Zyklen bei 72°C für 8 min. Der Erfolg der PCR wurde durch Vergleich mit einem 100 bp Größenstandard (100 ng/µl, Invitrogen) stichprobenartig auf einem 1,4% TBE-Agarosegel überprüft (~20 min in 1x TBE-Puffer (0,89 mM Bohrsäure, 0,98 mM Tris Base, 20 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Spannung von 130 V). Dazu wurde jeweils 1 µl PCR-Produkt, versetzt mit 2 µl 6x Ladepuffer (Sigma), aufgetragen. Nach anschließender Färbung des Gels in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µl/ml) für 10 min wurde es auf einem UV-Tisch durch Licht der Wellenlänge 320 nm zur Fluoreszenz angeregt und digital fotografiert.

Das PCR-Produkt wurde in der RFLP-Analyse mit den isoschizomeren Enzymen zu *BsrB* I und *Eag* I (*Mbi* I und *Eco52* I, Fermentas) verdaut. Dabei wurden zu jedem PCR-Produkt 0,7 µl *Eco52* I Puffer (10x, Fermentas), 0,2 µl *Mbi* I und 0,1 µl *Eco52* I gegeben und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert (nach Skage et al. 2007). Nach dem Verdau wurden die Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt und durch UV-Licht sichtbar gemacht. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 3 µl 6x Ladepuffer gemischt und zusammen mit einem 100 bp Größenstandard (3 µl) und einem gemischten 100 bp/25 bp (3 µl/3 µl) Größenstandard auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 130 V und dauerte etwa 2,5 Stunden. Nach Färbung in Ethidiumbromidlösung wurde auch hier fotografiert. Die Auswertung erfolgte nach Skage et al. (2007).

### 2.2.3 Amplifizierung und Analyse der Mikrosatelliten-Marker

Als genetische Marker wurden zwölf Mikrosatelliten-Loci aus Brede et al. (2006) verwendet, die in Multiplex-PCRs amplifiziert wurden: SwiD 12, SwiD 6, SwiD 18 („grün1“); Dgm 105, Dgm 109, Dgm 112 („grün2“); Dp 281NB, SwiD 14, DaB 10/14 („blau1“); DaB 17/17, Dp 196NB, Dp 519 („blau2“). Die Farbstoffe zur Markierung der Primer waren folgende: Alexa 647 (Invitrogen) für die *forward*-Primer der Loci Dp 281NB, SwiD 14, DaB 10/14, DaB 17/17, Dp 196NB und Dp 519; IRD 700 (MWG) für die *forward*-Primer der Loci SwiD 6, SwiD 12, SwiD 18, Dgm 105, Dgm 109 und Dgm 112.

Die Reaktionen wurden in 10 µl Ansätzen durchgeführt: 2 µl präparierte DNA, 1x Amplifikationspuffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM dNTPs, 1 Unit/µl *Taq*-Polymerase (alles Invitrogen), 0,2 mg/ml BSA (NEB) und 1x DMSO (Roth). Die Konzentrationen der Primer betragen für die Loci Dgm 112, Dp 281NB, DaB 17/17, Dp 196NB je 0,1 µM, je 0,2 µM bei den Loci SwiD 12, SwiD 6, SwiD 18, SwiD 14, DaB 10/14 und je 0,3 µM bei Dgm 105, Dgm 109, Dp 519. Das Restvolumen wurde mit destilliertem, sterilem Wasser aufgefüllt. Das Grundprogramm für die PCRs war folgendes (nach Brede et al. 2006): Vordenaturierung bei 95°C für 3 min, 35 Zyklen: Denaturierung bei 95°C für 1 min, Anlagerung für 1 min, Synthese bei 72°C für 1 min, Abschließende Synthese bei 72°C für 7 min. Die Anlagerungstemperaturen variierten zwischen den verschiedenen Ansätzen wie folgt: Multiplex „blau1“, „grün1“ und „grün2“ 55°C, „blau2“ 53°C. Als PCR-Maschinen wurden dabei für die Multiplex-PCRs „grün1“, „blau1“ und „blau2“ die DNA Engine Tetrad PTC-225 (MJ Research) verwendet und für „grün2“ die PTC-100 (MJ Research). Die Amplifikation einzelner Loci in Fällen, in denen Lücken im Datensatz geschlossen werden mussten, erfolgte ebenfalls in 10 µl Ansätzen: 1x Amplifikationspuffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM dNTPs 1 U/µl *Taq*-Polymerase 0,1 mg/ml BSA und einer Primer-Konzentration von 0,2 µM (SwiD 12 und SwiD 18 aber 0,1 µM). Der Erfolg der PCR wurde wie oben für das ITS-Fragment beschrieben durch Elektrophorese, anschließendes Färben in Ethidiumbromid und digitales Fotografieren überprüft. Dabei wurden nur stichprobenartig die jeweils ersten fünf Individuen eines PCR-Durchgangs überprüft, und es wurde davon ausgegangen, dass die übrigen Proben einen ähnlichen Erfolg bei der Amplifikation lieferten.

Die amplifizierten, fluoreszenzmarkierten Mikrosatellitenfragmente wurden danach verdünnt, um bei der späteren Detektion per Laser ein gleichmäßig starkes Signal möglichst aller Fragmente zu erhalten. Als Grundlage der Verdünnung dienten dabei die Abschätzung der Menge des PCR-Produktes anhand der Stärke der Banden auf dem oben beschriebenen Gel zur Überprüfung der PCR, sowie die unterschiedlich starke Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe: Blaue Farbstoffe geben ein doppelt so starkes Fluoreszenzsignal. Es ergaben sich daraus in der Regel Verdünnungen im Bereich von 10-50x für blau und 1-20x für grün. Die verdünnten PCR-Produkte wurden anschließend zu zwei Poolplex-Ansätzen („Poolplex1“ und „Poolplex2“) zusammengefasst. „Poolplex1“ setzt sich aus „blau1“ und „grün1“ und „Poolplex2“ aus „grün2“ und „blau2“ zusammen. Pro Ansatz wurde 1 µl der jeweiligen Verdünnung und

1 µl je Standard „60plus“ und „180plus“ mit deionisiertem Formamid (mindestens 99,5%, Sigma) auf ein Volumen von 30 µl aufgefüllt.

Die Größenstandards „60plus“ (Fragmente der Längen 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 120 bp, 140 bp und 160 bp) und „180plus“ (180 bp, 220 bp, 260 bp, 280 bp, 340 bp, 380 bp, 400 bp und 420 bp) sind Mischungen, die aus mehreren Fragmenten definierter Länge bestehen. Die einzelnen Fragmente wurden mit fluoreszenzmarkierten *forward*-Primern und Lambda-DNA als Vorlage amplifiziert (Symonds & Lloyd 2004). Dafür wurde folgendes Standardprotokoll verwendet: je 2 µl Lambda-DNA (0,3 µg/200 µl; Fermentas), 2,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Amplifikationspuffer, 0,25 mM dNTPs, 0,2 µM je Primer (Fluoreszenzmarkierung des *forward*-Primers IRD 800, MWG) und 0,5 Units/µl *Taq*-Polymerase (alles Invitrogen). Der Reaktionsansatz wurde mit sterilem dH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Das PCR-Programm für die Amplifizierung der einzelnen Fragmente entspricht dem zuvor beschriebenen Mikrosatelliten-Programm nach Brede et al. (2006; Anlagerungstemperatur aber 60°C). Nach einer visuellen Kontrolle mittels eines 1,4% Agarose-Gels und einem 100 bp Längenstandard wurden die Fragmente aufgereinigt (Pure Link<sup>TM</sup> PCR Purification Kit, Invitrogen) und daraufhin in gleichen Anteilen gemischt. Dann wurden die Konzentrationen der einzelnen Fragmente nach einer Analyse mit dem Sequenzierer CEQ 2000 (BeckmanCoulter) aufeinander abgestimmt, sodass die Fragmente der Größenstandards bei der späteren Laserdetektion gleichmäßig starke Signale zeigen.

Der Ansatz von Mikrosatellitenfragmenten, Größenstandard und Formamid wurde mit dem DNA-Sequenzierer CEQ 2000 (BeckmanCoulter) mit dem Programm Frag-3 (Denaturierung bei 90°C für 2 min; Injektion bei 2,0 kV für 30 sec; Trennung bei 6,0 kV für 45 min) aufgetrennt und die einzelnen Fragmente währenddessen mit Hilfe des Lasers detektiert. Die Rohdaten wurden mit der Analysesoftware CEQ 8000 (BeckmanCoulter) automatisch analysiert und die erhaltenen Fragmentlängen anschließend manuell in ein standardisiertes *Excel*-Format (Microsoft Corp.) übertragen. Dabei wurde festgestellt, dass die Allele der Mikrosatelliten scheinbar nicht immer in der den Schritten ihrer Sequenzmotive entsprechenden Größen vorliegen (SMM, siehe Abschnitt 1.3), sondern auch Mutationen möglich sind, die nicht in der Motivlänge des Mikrosatelliten liegen.

## 2.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse wurden auf ihre Vollständigkeit überprüft. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen mit den verwendeten Loci (Thielsch 2005) wurden nur Individuen in die Analysen mit einbezogen, bei denen an maximal vier der zwölf Mikrosatelliten-Loci keine Daten verfügbar waren.

### 2.3.1 Genetische Struktur der untersuchten Individuen

Um genetische Distanzen – berechnet mit *GenAlEx* 6 (Peakall & Smouse 2006a) nach Huff et al. (1993) und Maguire et al. (2002) – zwischen den Individuen graphisch darstellen zu können, wurden Hauptkomponentenanalysen (*principal component analysis*, PCA) basierend auf der Methode von Orloci (1978) durchgeführt (ebenfalls in *GenAlEx* 6). Dabei wurden fehlende Daten nicht interpoliert. Aufgrund der räumlichen Anordnung im Koordinatensystem wurden erste Aussagen über die Zugehörigkeit der Individuen zu entweder den Elternarten oder Hybridklassen getroffen. Um Individuen in Hybridklassen einteilen zu können, wurde die Software *NewHybrids* (Anderson & Thompson 2002) benutzt. Dabei wurde die posteriore Wahrscheinlichkeit (nach Bayes) berechnet, dass ein bestimmtes Individuum einer bestimmten Hybridklasse oder einer der Parentalarten angehört. Das Verfahren ermöglichte die Zuordnungen zu Elternarten oder Hybridklassen (F1-, F2-, oder Rückkreuzungshybrid zu der einen oder anderen Elternart) ohne auf Vorkenntnisse über die Allelfrequenzen der Elternarten oder Kenntnisse über fixierte Artunterschiede angewiesen zu sein. Da diese Software nur Hybridkomplexe aus zwei Elternarten analysieren kann, wurde eine hierarchische Einteilung des Gesamtdatensatzes vorgenommen. Dafür wurden Datensätze vorbereitet, die entweder nur den Artkomplex *D. cucullata/galeata*, *D. galeata/longispina* oder *D. longispina/cucullata* repräsentierten. In einer ersten Analyse mit *NewHybrids* wurde der Artkomplex *D. galeata/longispina* analysiert. Danach wurden die Individuen ausgewählt, die zu > 99% posteriorer Wahrscheinlichkeit als „reine“ *D. galeata* erkannt wurden. Diese wurden gemeinsam mit allen putativen *D. cucullata x galeata*-Hybriden und „reinen“ *D. cucullata* in einem neuen Datensatz analysiert, um auch hier nach den gleichen Kriterien die sicher „reinen“ *D. cucullata*-Individuen zu identifizieren. Nachdem für *D. galeata* und *D. cucullata* die mit hoher Wahrscheinlichkeit „reinen“ Individuen identifiziert wurden, wurden in drei weiteren Analysen die Artkomplexe *D. cucullata/galeata*, *D. galeata/longispina* oder *D. longispina/cucullata* gegeneinander

berechnet. Als Kriterium für die Korrektheit der Zuordnung zu einer Parentalart oder Hybridklasse wurde eine Schwelle von 95% posteriorer Wahrscheinlichkeit definiert. Es wurden außerdem einige weitere Läufe durchgeführt, bei denen ausgewählte Lokalitäten einzeln analysiert wurden. Bei allen Läufen mit *NewHybrids* wurden mindestens die ersten 30 000 Berechnungen, die während der Konvergenzphase entstanden, verworfen. Bei manchen Analysen sogar noch mehr (siehe Ergebnisteil). Die Ergebnisse aller Analysen basieren auf den Mittelwerten von mindestens 1 000 000 Berechnungen nach der Konvergenzphase.

Als zweite Methode zur Analyse der genetischen Strukturen wurde nach Pritchard et al. (2000) und Falush et al. (2003) mit der Software *Structure* 2.1 gearbeitet. Im Gegensatz zu der allelfrequenzbasierten wird hierbei eine distanzbasierte Einteilung der Daten vorgenommen. Dabei wird nach der Bayes'schen Gruppierungsmethode anhand der Multilocus-Genotypen die posteriore Wahrscheinlichkeit für ein Individuum berechnet, dass dieses zu einer der simulierten Gruppen gehört. Die Anzahl der simulierten Gruppen (K) ist dabei eine *a priori*-Information. Dies hat den Vorteil, dass beliebig viele Elternarten in einem Lauf mit in die Analyse einbezogen werden können. Der Nachteil ist allerdings, dass unterschiedliche Hybridklassen nicht voneinander unterschieden werden (z.B. F1- und F2-Hybride). Alle Analysen mit *Structure* wurden mit den Standardeinstellungen im *admixture*-Modus ausgeführt, wobei Alpha über alle Simulationen variieren konnte. In der Konvergenzphase wurden jeweils die ersten 100 000 Berechnungen verworfen, die Ergebnisse basieren auf 1 000 000 Simulationen. Alle Läufe wurden in drei Replikaten durchgeführt.

### **2.3.2 Simulation von Hybriden**

Um die Ergebnisse von *NewHybrids* zu überprüfen, wurde exemplarisch an einer Lokalität, die die beiden Arten *D. galeata* und *D. cucullata* sowie deren Hybride enthielt (Vorinformationen aus ITS-RFLP-Analysen und Morphologie), eine Simulation durchgeführt. Als Testlokalität wurde FR-BB gewählt. Durch die kombinierten *NewHybrids*- und *Structure*-Analysen wurden hier sichere Elterarten sowie Hybride gefunden. Die durch *NewHybrids* mit > 95% posteriorer Wahrscheinlichkeit den Elterarten zugeordneten Individuen wurden mit der Software *Hybridlab* 1.0 (Nielsen et al. 2007) als Elternngenpool ausgewählt. Dazu wurden aus den 30 gefundenen *D. galeata*

und sechs *D. cucullata* 100 artifizielle F1-Hybride generiert und mit *NewHybrids* analysiert.

### 2.3.3 Deskriptive Statistik der Mikrosatellitendaten

Der Gesamtdatensatz wurde für verschiedene Analysen in unterschiedliche Datensätze umgruppiert: i) Gesamtdatensatz nach Lokalitäten oder Populationen, ii) klonaler Gesamtdatensatz nach Lokalitäten oder Populationen, iii) nur reine Arten (ohne Hybride und nicht zugeordnete Individuen), sowohl als Datensatz, der alle Individuen enthält („individueller Datensatz“), als auch als Datensatz, in dem mehrfache Multilocus-Genotypen (MLGs) entfernt wurden („klonaler Datensatz“). Die Identifizierung mehrfacher MLGs wurde mit *GenAlEx* 6 (verschiedene Menüpunkte unter „*Multilocus, matches...*“) durchgeführt, indem eine Liste der Individuen mit übereinstimmenden MLGs erstellt wurde. Die Liste wurde dann manuell editiert, weil *GenAlEx* bei der Auflistung ohne identische MLGs, diejenigen, die in allen Loci übereinstimmen, aber an einer Stelle fehlende Daten aufweisen, als zwei verschiedene MLGs klassifiziert. Die konservative Annahme, dass bei ansonsten gleichen MLGs auch die fehlenden Daten als Übereinstimmung an einem Locus interpretiert werden, wurde in dieser Arbeit durchgehend angewendet.

#### 2.3.3.1 Genetische Diversität und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Für alle Populationen wurde die klonale Diversität  $D_c$  berechnet ( $D_c = N_c / N_i$ ;  $N_c$ : Anzahl der MLGs;  $N_i$ : Anzahl der Individuen). Mit *GenAlEx* wurden auch die Allelfrequenzen der Arten berechnet. Dazu wurde der Datensatz, bestehend aus reinen Arten (individuelle Ebene), so formatiert, dass jede Art als eine Population berechnet wurde. Für die Berechnungen der erwarteten (Lynch & Milligan 1994, Maguire et al. 2002) und beobachteten Heterozygotie (Hartl & Clark 1997) –  $H_E$  und  $H_O$  – in *GenAlEx* wurde der Datensatz verwendet, der nur unterschiedliche MLGs enthält. Da *GenAlEx*  $H_E$  und  $H_O$  für jeden Locus einzeln ausgibt, wurden der Übersicht halber Mittelwerte für die jeweilige Population berechnet. Für die Populationen aus reinen Elternarten (nur unterschiedliche Klone) wurden mit *GenePop* (Raymond & Rousset 1995) in der Version 3.4 (Internet-Version: <http://GenePop.curtin.edu.au/>) exakte Tests auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) durchgeführt (mit Standardeinstellungen: Konvergenzphase: 1000 Berechnungen, Stapelgröße: 100, 1000 Berechnungen pro



Stapel). Dabei wurden die Populationen, die nur aus einem Individuum bestehen, nicht in die Analyse mit einbezogen. Als Null-Hypothese wird das HWG angenommen (Haldane 1954, Weir 1990). Mit einer Monte-Carlo-Markov-Kettenmethode (Guo & Thompson 1992) wurde das Ergebnis auf statistische Signifikanz geprüft. Ebenfalls berechnet wurde die Wahrscheinlichkeit für ein Heterozygotendefizit (Konvergenzphase 1000 Berechnungen, Stapelgröße: 10, 1000 Berechnungen pro Stapel). Hierzu wurde der in *GenePop* implementierte U-Test genutzt.

Um die klonale Diversität und Heterozygotie der untersuchten Arten miteinander zu vergleichen, wurden mit der Software Statistika 6.1 (StatSoft, Inc.) t-Tests durchgeführt. Dabei wurden zum einen paarweise Vergleiche der Mittelwerte von  $D_c$  und  $H_o$  der Elternarten, Rekombinanten und Nicht-Zuzuordnenden durchgeführt. Zum anderen wurden die Populationen der reinen Elternarten in zwei Klassen eingeteilt: Populationen, von denen i) bekannt ist, dass sie sympatrisch mit anderen Taxa oder Rekombinanten des Artkomplexes vorkommen; und ii) Populationen, von denen dies nicht bekannt ist. Innerhalb der Elternarten wurden wiederum jeweils die Mittelwerte von  $D_c$  und  $H_o$  der beiden Klassen miteinander verglichen.

### **2.3.3.2 Genetische Differenzierung**

Um einen Artkomplex auf seine Differenzierung, vor allem im Hinblick auf den Speziesstatus seiner Arten, hin zu untersuchen, eignet sich eine Analyse der molekularen Varianz AMOVA (*analysis of molecular variance*, Excoffier et al. 1992). Dabei wird gemessen, auf welche Ebenen sich die Varianz im Datensatz verteilt. Die Genetische Differenzierung zwischen und innerhalb der Populationen, jeweils für jede Art getrennt, wurde für den Datensatz der reinen Arten (nur unterschiedliche Klone) mittels einer AMOVA in *GenAlEx* mit 9999 Permutationen berechnet. In einer zweiten AMOVA wurde als dritte hierarchische Ebene das Element „Art“ hinzugefügt. Dadurch wurden die Anteile der Variation des Gesamtdatensatzes durch die Diversität zwischen den Arten, zwischen den Populationen innerhalb der Arten und innerhalb der Populationen berechnet. Es wurden alle Populationen eingesetzt, die mehr als einen Klon enthielten. Bei der Berechnung der nötigen Distanzmatrizen wurde kein Interpolieren der fehlenden Daten durchgeführt. Im Rahmen der AMOVA wurden ebenfalls die  $F_{ST}$ -Werte (Wright 1951) der Arten nach Peakall et al. (1995) berechnet.

$R_{ST}$  (Slatkin 1995) wurde nicht berechnet, weil die verwendeten Mikrosatelliten offensichtlich nicht dem SMM gehorchen.

Ein Vergleich der genetischen Distanzen mit den geographischen Distanzen (Test auf *isolation by distance* Wright 1943) wurde mittels eines Mantel-Tests (Mantel 1967, Smouse et al. 1986, Smouse & Long 1992) in *GenAlEx* durchgeführt (die geographische Distanzmatrix wurde nach Peakall & Smouse (2006b) berechnet). Die Analyse wurde mit den gleichen Datensätzen durchgeführt, die auch in der AMOVA verwendet wurden, wobei auch diejenigen Klone in die Analyse mit einbezogen wurden, die alleine einer Population zugeordnet waren. Die genetische Distanzmatrix wurde vor dem Mantel-Test linearisiert und die Anzahl der Permutationen auf 99 999 eingestellt.

### 3 Ergebnisse

In den Ergebnissen werde ich drei Abschnitte beschreiben. Zunächst wird darauf eingegangen, wie erfolgreich die DNA-Präparation und die darauf folgenden molekularen Analysen waren. Im zweiten Teil wird beschrieben, welche Zugehörigkeiten der Individuen zu Arten, Hybriden und Populationen ermittelt werden konnten. Danach wende ich mich der genetischen Struktur und Konstitution des *D. longispina*-Artkomplexes auf verschiedenen Ebenen des Datensatzes zu.

#### 3.1 Erfolg der molekularen Analysen

Ursprünglich wurden deutlich mehr Individuen isoliert, als später im Datensatz analysiert werden konnten. Da einige der Proben relativ alt waren (manche aus den 1990er Jahren) und teilweise schelcht gelagert wurden, haben viele molekulare Analysen nicht funktioniert, da die DNA unter solchen Bedingungen schnell degradiert. In dieser Arbeit habe ich Rohdaten von 18 Lokalitäten sammeln können und zusätzliche analysierte Genotypen aus weiteren 15 Lokalitäten erhalten (siehe Tabelle 1). Bei den meisten der Lokalitäten (z.B. DE-UHW, SP-CO) wurden 40 Individuen der DNA-Präparation unterzogen. Ausnahmen davon waren Populationen, von denen nicht genug Individuen in der Probe vorhanden waren (z.B. NL-GRO, FI-PY). Der Erfolg der DNA-Präparationen kann aus den Ergebnissen der ITS- und Mikrosatelliten-PCRs abgeleitet werden. Bei einigen Proben (z.B. IS-MY, CZ-BR) konnten ohne Probleme größere Mengen an PCR-Produkt auch für das vergleichsweise große ITS-Fragment erreicht werden. Mit anderen Proben waren die PCRs nicht so erfolgreich (schwache Banden auf dem Gel, z.B. SP-CO, LU-ES) oder es konnte kein PCR-Produkt bei alle isolierten Individuen der Lokalität amplifiziert werden (z.B. FI-PY, GR-AL). In den meisten Fällen konnten aber aus Proben, von denen das ITS-Fragment nicht amplifiziert werden konnte, dennoch die viel kleineren Mikrosatellitenloci (70bp bis 270bp) amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Trotzdem waren auch hier Qualitätsunterschiede in der präparierten DNA zu beobachten, die sich darin äußerten, dass man als Ergebnis der PCRs teilweise sehr unterschiedlich starke Banden auf den Gelen zur Erfolgskontrolle der PCR sehen konnte. Außerdem funktionierten meist nicht alle Amplifikationen einer Multiplex-PCR gleich gut, sodass nach der Auswertung der Mikrosatellitendaten Lücken im Datensatz blieben, die auch durch wiederholtes Amplifizieren der Loci in

Einzel-PCRs nicht geschlossen werden konnten. Insgesamt gab es bei den 1155 Individuen 27 720 Loci (zwölf diploide Loci pro Individuum, also  $24 \cdot 1155$ ). Von diesen hatte ich an 1924 keine Daten (6,9%). Davon entfällt ein Großteil der Lücken auf die Loci Dgm 112 (382; 1,4%), Dgm 109 (380; 1,4%), SwiD 12 (358; 1,3%) und SwiD 6 (168; 1%). Die restlichen Loci trugen jeweils unter 1% zu den fehlenden Loci bei. Besonders auffällig ist, dass vor allem bei *D. cucullata*-Populationen die Loci Dgm 112, SwiD 12 und SwiD 6 Probleme bereiten. Dgm 112 ließ sich oft nicht oder nur schlecht amplifizieren, SwiD 12 und SwiD 6 lagen bei *D. cucullata* in überschneidenden Fragmentlängenbereichen, wodurch eine Aufnahme der Fragmentlänge bei bestimmten Allelkombinationen in der Analyse des Poolplex 1 praktisch unmöglich war.

### 3.2 Einteilung der Individuen nach Arten, Hybriden und Populationen

#### 3.2.1 Visualisierung der Mikrosatellitendaten

Mit dem Programm *GenAlEx 6* (Peakall & Smouse 2006a) wurde zunächst eine PCA durchgeführt, die zeigen sollte, ob sich Arten und Populationen aufgrund ihrer genetischen Distanz einteilen lassen. Abbildung 3. stellt die ersten beiden Hauptkomponenten dar, die zusammen 57,44% der Gesamtvariation erklären. Es zeigt sich eine deutliche Strukturierung in drei große „Punktwolken“ (*cluster*), wobei einer der *cluster* mit jeweils den beiden anderen teilweise fließende Übergänge bildet. Die Punkte in Abbildung 3, die jeweils ein Individuum repräsentieren, wurden sowohl anhand ihrer Morphologie (soweit verfügbar und eindeutig) als auch vor allem aufgrund ihres Schnittmusters in der RFLP-Analyse als Elternarten oder Hybriden identifiziert. Es konnte auf diese Weise von ausreichend vielen Individuen eine Zuordnung zu Elternart oder Hybrid getroffen werden (Daten nicht gezeigt), sodass auch den *clustern* in der PCA-Darstellung Artidentitäten zugeordnet werden konnten. Auffällig ist, dass bei einigen Individuen die RFLP-Schnittmuster nicht zu der Position in der PCA-Darstellung passen. So zeigen einige Individuen aus CZ-BR ein *D. galeata x cucullata*-Schnittmuster (Hybrid aus *D. cucullata* und *D. galeata*), obwohl sie durch die PCA den reinen *D. cucullata* zugeordnet werden. Gleiches gilt für die meisten Individuen der Lokalitäten DE-UHW, einige aus FR-BB, CZ-RM und PL-M. Alle Individuen der

Lokalität IS-MY zeigen hingegen ein reines *D. galeata*-Schnittmuster, werden aber etwas außerhalb des *D. galeata* clusters zum *D. cucullata* cluster hin positioniert.

Die Individuen einiger Lokalitäten fallen relativ nah zusammen in nur einen der *cluster* (z.B. DE-UHW, NO-SV, FI-PY), wohingegen in anderen Lokalitäten Vertreter mehrerer Taxa und Hybride zu finden sind, z.B. FR-BB: *D. galeata*, *D. cucullata* und deren Hybride, oder auch CZ-VR: *D. galeata*, *D. cucullata*, *D. longispina* sowie *D. galeata x cucullata*- als auch *D. galeata x longispina*-Hybride.

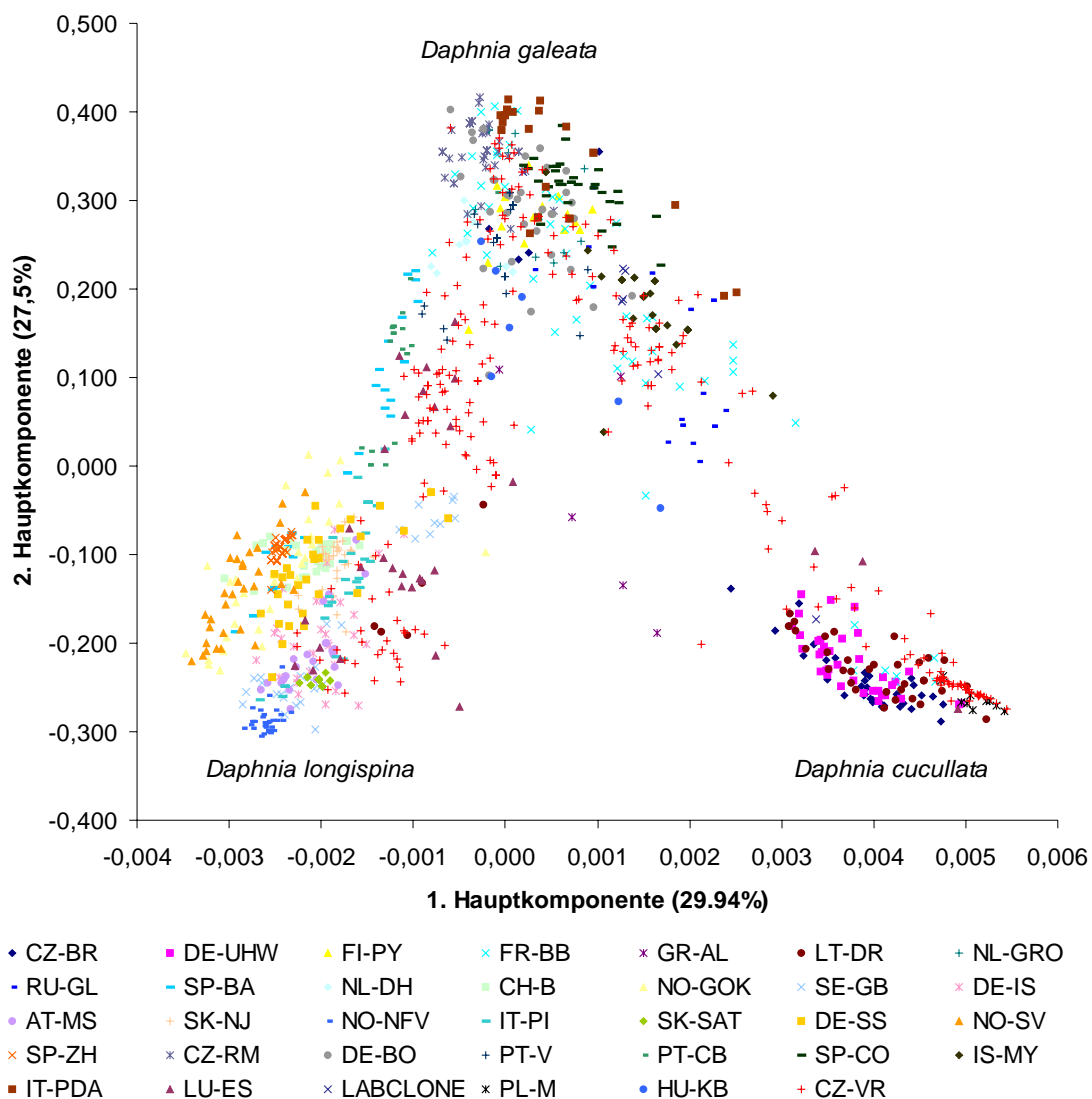


Abb. 3: Darstellung der ersten beiden Hauptkomponenten der PCA der Mikrosatellitendaten aller Individuen. Jeder Punkt repräsentiert ein Individuum und die Farbe und Form der Punkte symbolisiert die Zugehörigkeit zu einer der Lokalitäten. Die Punkte bilden ein Dreieck, an dessen Ecken jeweils die reinen Elternarten des *D. longispina*-Artkomplexes zu finden sind. Individuen, die zwischen den *clusters* liegen, sind putative Hybride.

### 3.2.2 Einteilung der Individuen nach Arten und Hybriden

#### 3.2.2.1 Zuordnung nach *NewHybrids*

Nach dem wie im Methodenteil beschriebenen Vorgehen wurden die Ergebnisse für die drei Zwei-Art-Komplexe innerhalb des Datensatzes miteinander verglichen. Die meisten Individuen wurden in zwei dieser drei Artkomplexe analysiert, einige nur in einem. Nach den Einzelläufen wurden nach dem 95%-Kriterium die Individuen den Elternarten oder Hybridklassen zugeordnet. Das Individuum wurde keiner Klasse zugeordnet, wenn es in keinem der verschiedenen Läufe nach dem 95%-Kriterium zugeordnet werden konnte ( $N = 219$ , z.B. viele Individuen aus IS-MY, IT-PI oder RU-GL) oder wenn sich in den verschiedenen Läufern der Zwei-Art-Komplexe Konflikte in der Zuordnung ergaben ( $N = 23$ ), was z.B. bei Individuen aus GR-AL, LU-ES und CZ-VR der Fall war. Zusammengenommen konnten also 242 von 1155 Individuen nicht zugeordnet werden, was einer Rate von 21% entspricht.

Die grafische Oberfläche von *NewHybrids*,  $Gf(MC)^2$  (Anderson 2002), gibt für jeden Locus die Kullback-Leibler Divergenz an (Kullback & Leibler 1951). Je höher dieser Wert ist, desto informativer ist der Locus für die Analyse (Anderson 2003). Da sich die Kullback-Leibler Divergenzen der zwölf verwendeten Loci teilweise stark voneinander unterscheiden, habe ich die Analyse der Datensätze erneut nur mit den sechs, bzw. drei informativsten Loci wiederholt. Tabelle 2 zeigt die Kullback-Leibler Divergenzen der verwendeten Mikrosatelliten-Loci. Für die Wiederholungen der Analysen wurden die sechs informativsten Loci <sup>1)</sup> oder die drei informativsten Loci <sup>2)</sup> verwendet. Abbildung 4 zeigt Balkendiagramme, in denen vergleichend die Zuordnung zu Elternarten oder Hybridklassen bei diesen Analysen dargestellt ist. Man sieht, dass es kaum Unterschiede in der Zuordnung gibt, wobei mit abnehmender Locuszahl im direkten Vergleich einige falsche Zuordnungen getroffen werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem werden bei nur drei verwendeten Loci praktisch keine Individuen mehr den Hybridklassen zugeordnet. Dafür steigt der Anteil der Individuen, die nicht zugeordnet werden können. Außerdem ist auffällig, dass hauptsächlich F2-Hybride gefunden werden.

Tab. 2: Kullback-Leibler Divergenzen der verwendeten Mikrosatelliten-Loci bei den *NewHybrids*-Analysen des Gesamtdatensatzes. Die jeweils sechs höchsten Kullback-Leibler Divergenzen sind mit <sup>1)</sup> gekennzeichnet, die jeweils drei höchsten mit <sup>2)</sup>.

Locus	Kullback-Leibler Divergenz		
	<i>D. galeata/longispina</i>	<i>D. galeata/cucullata</i>	<i>D. cucullata/longispina</i>
Dp 281 DB	14	1	15
SwiD 18	18 <sup>1)</sup>	32 <sup>1)2)</sup>	18
DaB 17/17	4	15	13
SwiD 12	17	13	45 <sup>1)2)</sup>
Dgm 112	36 <sup>1)2)</sup>	4	33 <sup>1)</sup>
Dp 196	5	3	3
SwiD 6	26 <sup>1)</sup>	43 <sup>1)2)</sup>	25 <sup>1)</sup>
Dp 519	25 <sup>1)</sup>	23	36 <sup>1)2)</sup>
SwiD 14	10	45 <sup>1)2)</sup>	34 <sup>1)2)</sup>
Dgm 105	32 <sup>1)2)</sup>	28 <sup>1)</sup>	31
DaB 10/14	27 <sup>1)2)</sup>	21 <sup>1)</sup>	22
Dgm 109	1	28 <sup>1)</sup>	23 <sup>1)</sup>

Einige der Populationen, in denen Hybride vorkommen, wurden einzeln mit *NewHybrids* getestet (Daten nicht gezeigt). IT-PI konnte so als Mischpopulation aus *D. galeata*, *D. longispina* und deren F1-Hybriden identifiziert werden. Dabei zeigte sich aber bei der Beobachtung des *NewHybrids*-Laufes im  $Gf(MC)^2$ , dass die Monte-Carlo-Markov-Ketten im Vergleich zu den Läufen mit dem Gesamtdatensatz erst nach viel längerer Konvergenzphase ein Maximum gefunden haben. Es wurden die ersten 400 000 Iterationen verworfen und über 6 000 000 Iterationen gemittelt. Bei anderen Populationen, die im Gesamtdatensatz schlecht zugeordnet werden konnten, wurden auch nach vergleichsweise langen Konvergenzphasen (> 500 000) und vielen Iterationen (> 5 000 000) keine eindeutigen Ergebnisse geliefert (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2.2 Zuordnung nach *Structure*

Mit dem Programm *Structure* wurde der Gesamtdatensatz analysiert. Dabei wurde mit  $K = 3$  getestet, mit welcher posterioren Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Individuum zu einer der drei putativen Gruppen (hier Arten) zugeordnet werden kann. Wurde ein Individuum dabei mit > 95% einer der Gruppen zugeordnet, wurde sie als „reine“

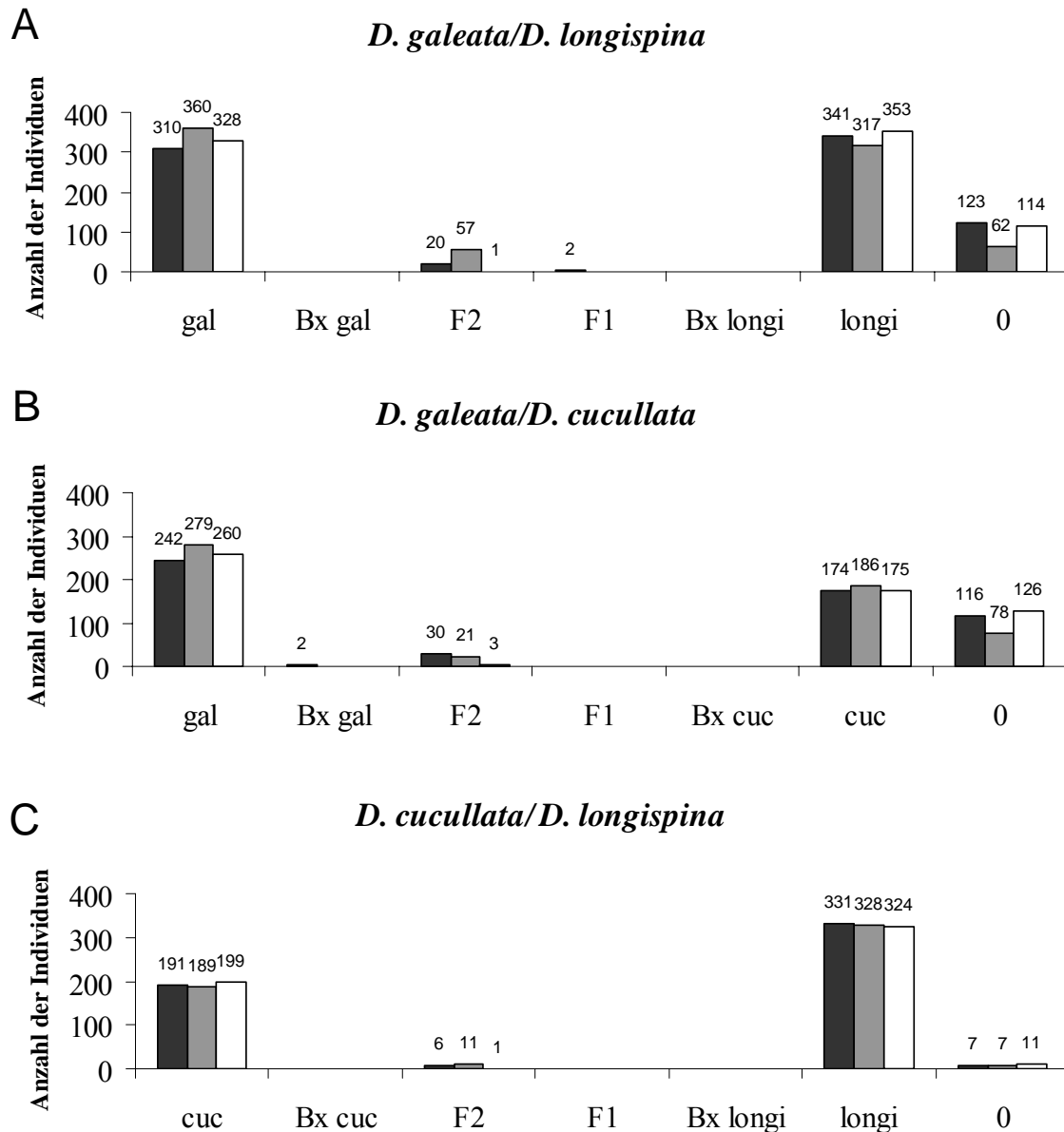


Abb. 4: Vergleich der Zuordnung zu Elternarten oder Hybridklassen der verschiedenen *NewHybrids*-Analysen des Gesamtdatensatzes mit allen zwölf Loci (schwarz), den sechs informativsten Loci (grau) und den drei informativsten Loci (weiß). Die Höhe der Säulen gibt die Anzahl der identifizierten Individuen wieder (genaue Anzahl ist oberhalb der Balken angegeben). Bx [Taxon] steht dabei für einen Rückkreuzungshybriden zu der einen Elternart hin. „0“ bezeichnet den Anteil der Individuen, die nicht mit  $> 95\%$  posteriorer Wahrscheinlichkeit einer der Elternarten oder Hybridklassen zugeordnet werden konnten.

Elternart definiert. Individuen mit Werten kleiner  $\leq 95\%$  wurden als Rekombinante definiert. Die Gruppen wurden anhand von Morphologie, ITS-Daten und vorläufigen Ergebnissen der PCA-Analyse den Elternarten zugeordnet. Ein F1-Hybrid hat dabei per Definition eine posteriore Wahrscheinlichkeit von 50% der einen Gruppe und ebenfalls 50% der anderen Gruppe anzugehören; ein Rückkreuzungshybrid sollte entsprechend mit 75% posteriorer Wahrscheinlichkeit der einen Elterart und mit 25% der anderen



Elternart zugeordnet werden. Die Analyse wurde in drei unabhängigen Replikaten durchgeführt, die alle ähnliche Ergebnisse lieferten. Es werden hier nur die Ergebnisse einer Analyse beschrieben. Im Datensatz wurden dabei von den 1155 getesteten Individuen 367 *D. longispina* (31,8%), 266 *D. galeata* (23%) und 166 *D. cucullata* (14,4%) gefunden, also insgesamt 799 Individuen von 1155 (69,2%) einer der reinen Elternarten zugeordnet. Abbildung 5 stellt die Struktur der Elternarten und rekombinanten Individuen dar. Dabei sind die Individuen nach ihrem Anteil am Genom der jeweils dargestellten Art geordnet. Ein Y-Wert von 1 zeigt an, dass bei diesem Individuum 100% des Genoms, repräsentativ vertreten durch die zwölf Mikrosatelliten, der dargestellten Art zugeordnet wurden; ein Wert von 0 zeigt an, dass bei diesem Individuum der Anteil des Genoms der dargestellten Art 0% beträgt. Individuen mit z.B. 50% Anteil *D. galeata*-Genom sind Hybride von *D. galeata* mit entweder *D. longispina* oder *D. cucullata*. Wie man sieht, macht bei dieser Analyse *D. longispina* (Abb. 5A) den Hauptanteil des Datensatzes aus. Bei dieser Art sind relativ wenige F1-Hybride, aber dennoch einige rekombinante anderer Hybridklassen (mit Anteilen von *D. longispina*-Genom unter 95%) zu finden. Vor allem bei *D. galeata* (Abb. 5B) fällt auf, dass es relativ viele Rekombinante mit 40-60% *D. galeata*-Genom gibt (per Definition putative F1-Hybride), aber dafür weniger Rückkreuzungen, wobei ein größerer Teil zu *D. galeata* hin rückgekreuzt zu sein scheint (Anteile am *D. galeata*-Genom um die 75%). Ein ähnliches Bild bietet Abb. 5C, in der kaum Rückkreuzungshybride zu *D. cucullata* zu sehen sind, aber dafür ein recht großer Anteil an Individuen, die 30-40% *D. cucullata*-Genom zu enthalten scheinen.

### 3.2.2.3 Synthese

Die Ergebnisse der *NewHybrids*- und *Structure*-Analysen wurden miteinander verglichen. In 123 Fällen stimmten die Zuordnungen durch die beiden Programme nicht überein. In 102 Fällen wurden durch *Structure* Individuen nicht als reine Arten erkannt, wobei *NewHybrids* diese als reine Elternart klassifizierte. In den anderen Fällen verhielt es sich umgekehrt, wobei es drei Fälle gab (LU-ES 43, LU-ES 45 und CZ-VR C857), bei denen die Zuordnung von beiden Programmen zu jeweils unterschiedlichen Elternarten vorgenommen wurde. Der größte Teil der 123 nicht übereinstimmenden Zuordnungen (83) entfiel dabei auf die Lokalitäten SP-BA (21), PT-CB (23), LU-ES (21) und CZ-VR (18). Tabelle 3 zeigt einen Vergleich der Zuordnungen nach den beiden verwendeten Methoden. Wichtig ist zu beachten, dass die Abwesenheit

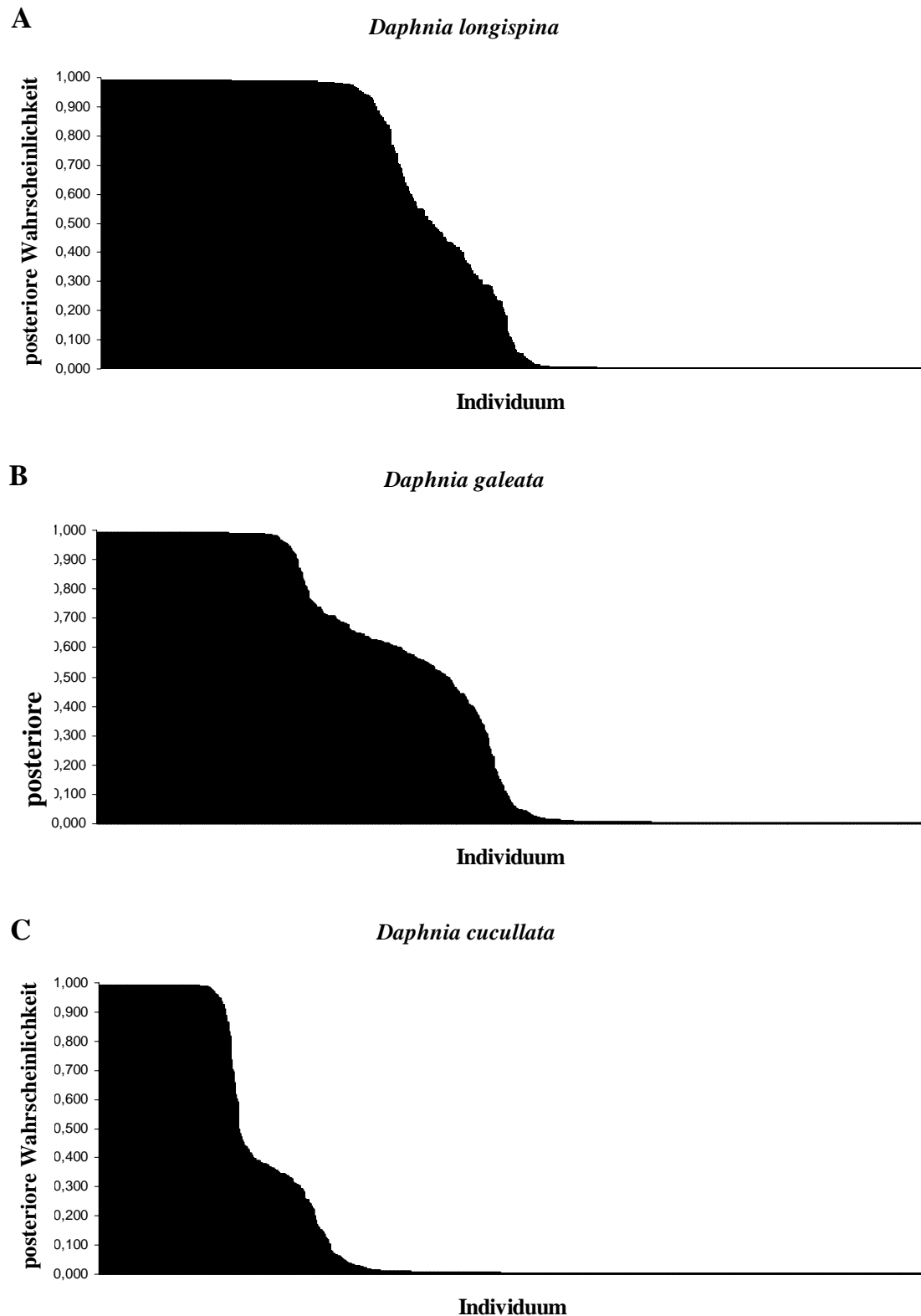


Abb. 5: Posteriore Wahrscheinlichkeiten der Individuen, den Arten *D. longispina* (A), *D. galeata* (B) und *D. cucullata* (C) anzugehören (Analyse im Gesamtdatensatz; N = 1155 Individuen). Auf der X-Achse sind dabei die nach der Höhe der jeweiligen posterioren Wahrscheinlichkeiten sortierten Individuen als Balken dargestellt. Aufgrund der Vielzahl der Balken erscheinen diese eher als Fläche.

bestimmter Taxa in einer Lokation nur bedeutet, dass diese nicht analysiert wurden. Es bedeutet aber nicht, dass sie dort nicht vorkommen. Weiterhin ist zu beachten, dass alle Individuen, die in der *Structure*-Analyse nicht zu  $> 95\%$  einer der Elterarten zugeordnet wurden, als angehörige einer der Hybridklassen gewertet wurden. Außerdem wurden in dieser Übersicht alle möglichen Hybridklassen, die mit *NewHybrids* erkannt wurden, nur als „Hybrid“ klassifiziert um eine Vergleichbarkeit mit *Structure* zu ermöglichen. Bei der Einteilung der Individuen einer Lokalität zu unterschiedlichen Populationen wurden auch solche Individuen als reine Elternart definiert, die nur in einer der beiden Analysen als rein erkannt wurden. Die Einteilung erfolgte in die Klassen: reine Elternarten pro Lokalität, rekombinante Individuen pro Lokalität („rek.“) und nicht zuzuordnende Individuen pro Lokalität („???“). Abbildung 6 stellt eine PCA-Analyse wie in Abbildung 3 dar. Diesmal wurden nach den Zuordnungen durch *NewHybrids* und *Structure* allerdings die Farben der Individuen manipuliert. *D. galeata*-Tiere sind als

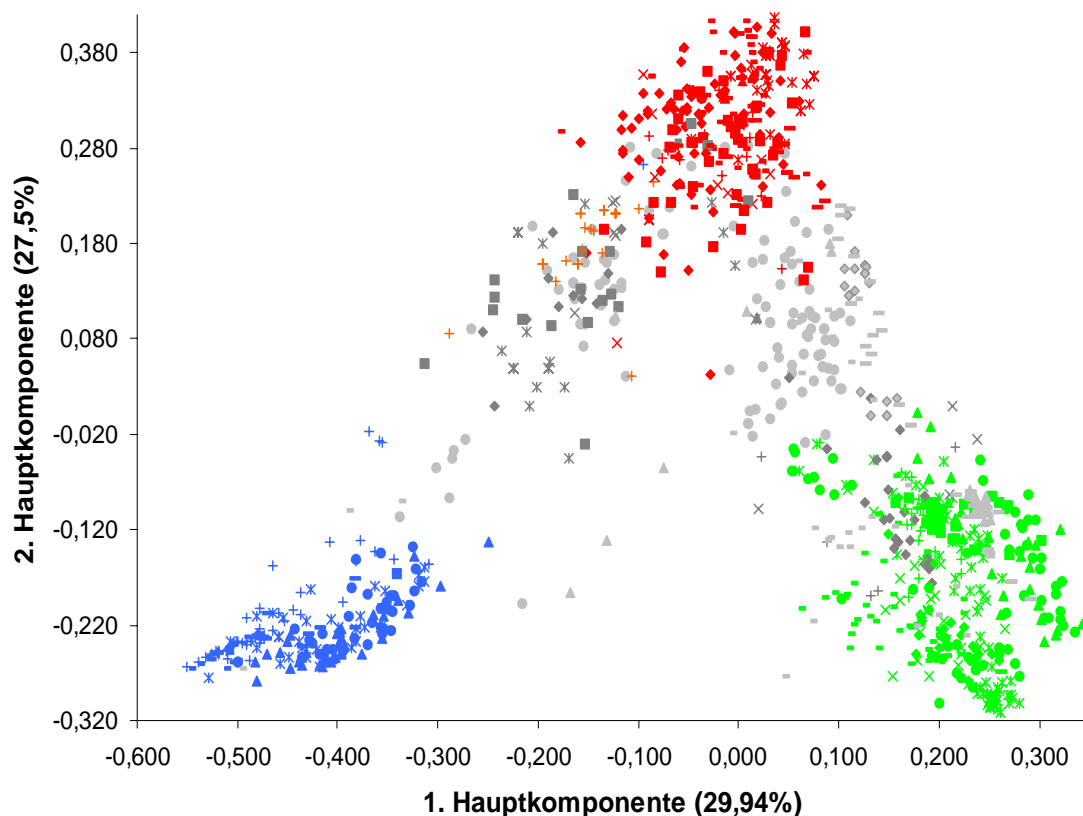


Abb. 6: Hauptkomponentenanalyse des Gesamtdatensatzes, nachdem dieser mit den Programmen *NewHybrids* und *Structure* in Populationen eingeteilt wurde. *D. galeata*-Individuen sind rot markiert, *D. longispina*-Individuen grün und *D. cucullata*-Individuen blau. Rekombinante sind hellgrau und Individuen, die nicht zuzuordnen waren, dunkelgrau markiert. Die unterschiedlichen Formen der Individuen geben Aufschluss über die Zugehörigkeit zu einer Population, sind aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht extra in einer Legende erklärt.

Tab. 3: Vergleich der Zuordnungen von *NewHybrids* und *Structure*. Gezeigt sind die Häufigkeiten der als ein bestimmtes Taxon identifizierten Individuen nach den Methoden *NewHybrids/Structure*. In der Spalte „???” ist nur die Anzahl der Individuen angegeben, die durch *NewHybrids* nicht signifikant den Elternarten oder einer der Hybridklassen zugeordnet werden konnte. gal = *D. galeata*, longi = *D. longispina*, cuc = *D. cucullata*, g x l = *D. galeata/longispina*-Hybrid, g x c = *D. galeata/cucullata*-Hybrid, c x l = *D. cucullata/longispina*-Hybrid.

Population	gal	longi	cuc	g x l	g x c	c x l	???
CZ-BR	4/4		35/33		0/2		
DE-UHW			36/36				
FI-PY	15/14				1/2		
FR-BB	25/22		6/6		2/29		17
GR-AL					1/5		4
LT-DR		0/1	33/31			0/6	5
NL-GRO	11/11			0/1			1
RU-GL	4/4				3/17		14
SP-BA	10/0	0/14		10/18			12
NL-DH	26/28						2
CH-B		32/30		0/2			
GOK-NO		28/23		0/8		0/1	4
SE-GB		32/30		0/2			
DE-IS		32/25		0/6		0/1	
AT-MS		24/24					
SK-NJ		32/31				0/1	
NO-NFV		32/32					
IT-PI		7/7		5/25			20
SK-SAT		31/31					
DE-SS		30/29		0/1			
NO-SV		31/31		0/1			1
SP-ZH	31/0	0/32					1
CZ-RM	38/39						1
DE-BO	32/29			0/4			1
PT-V	20/15			0/7			2
PT-CB	24/1			0/24			1
SP-CO	31/32				0/1		2
IS-MY	2/3				0/27		28
IT-PDA	24/24						
LU-ES	19/0	0/4	2/1	0/22		0/3	8
PL-M			12/12				
HU-KB	3/3				0/4		4
CZ-VR	33/33	29/22	55/46	3/65	11/74		108

rote Symbole dargestellt, *D. longispina* als grüne und *D. cucullata* als blaue. Mit dunkelgrau sind Rekombinante gekennzeichnet, mit hellgrau die Individuen, die durch *NewHybrids* nicht mit > 95% zugeordnet werden konnten.

### 3.2.3 Untersuchung des *Daphnia longispina*-Komplexes am Beispiel FR-BB

In der Lokalität FR-BB wurden die Arten *D. galeata* und *D. cucullata* sowie deren Hybride gefunden. Bei der Analyse des Gesamtdatensatzes (*NewHybrids*) wurden aber keine F1-Hybride gefunden, sondern nur die beiden Elternarten und Individuen, die mit mehr oder weniger hoher posteriorer Wahrscheinlichkeit entweder als F2-Hybrid oder als *D. galeata*-Rückkreuzungshybrid klassifiziert wurden. Eine *NewHybrids*-Analyse, in der die Tiere aus FR-BB alleine auf ihre Zugehörigkeit zu Elternarten oder Hybridklassen getestet wurden, lieferte andere Ergebnisse. Es wurden neben den beiden Elternarten F1-Hybride gefunden. Eine Simulation mit dem Programm *Hybridlab* 1.0 (Nielsen et al. 2007) und anschließender ein Testlauf mit *NewHybrids* ergab, dass *NewHybrids* die meisten simulierten F1-Hybride mit hohen posterioren Wahrscheinlichkeiten erkennt. Es gab von 100 simulierten F1-Hybriden nur zwei, die nicht eindeutig als solche erkannt wurden. Außerdem wurde im *NewHybrids*-Lauf des simulierten Datensatzes ein Individuum, das vorher als *D. galeata* identifiziert und als Elterart in die Analyse gegeben wurde, mit 71% posteriorer Wahrscheinlichkeit als F2-Hybrid erkannt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 7A-C dargestellt.

Eine Darstellung der genetischen Distanzen der Tiere aus FR-BB mittels einer PCA-Analyse wurde ebenfalls durchgeführt und auch mit einer PCA der verwendeten Laborklone verglichen. Dabei fallen die Individuen, die *D. cucullata* zugeordnet wurden, als eigene Gruppe. Auf der anderen Seite erkennt man einen überlappenden *cluster* aus *D. galeata*-Individuen und Hybriden (Abbildung 8A). Die PCA der Laborklone zeigt ein ähnliches Bild (Abbildung 8B). Der Klon 33, *D. cucullata*, liegt weit außerhalb des zweiten *clusters*, in dem der Klon 100 (*D. galeata*) und die F1-Hybride X1.1, X4.1, X5.1, X16.1 und GCL1.2 liegen.

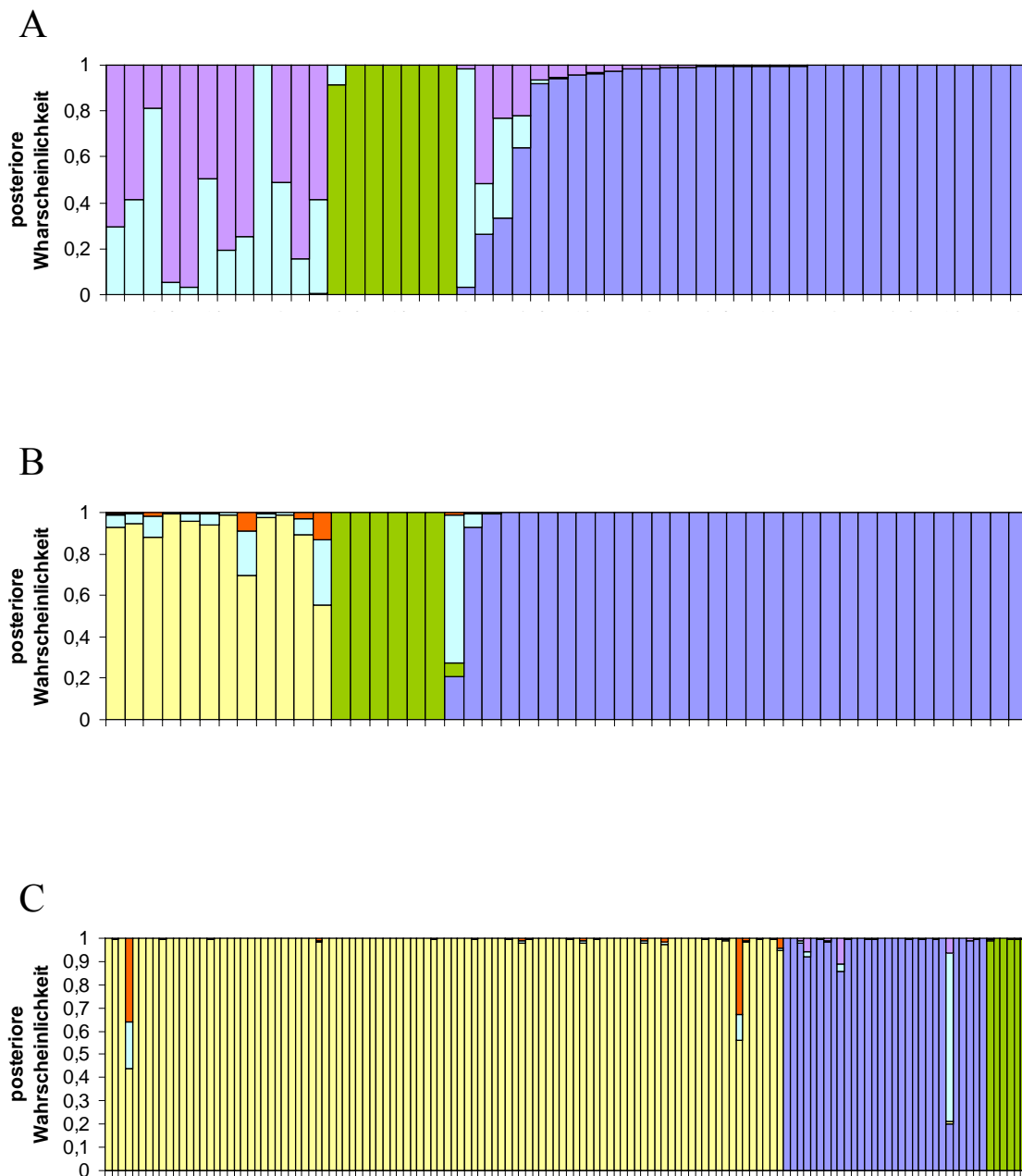


Abb. 7: Ergebnisse der Analyse mit *NewHybrids* für die Lokalität FR-BB. A: Auszug aus der Analyse mit dem Gesamtdatensatz, B: Analyse der Population, C: Ergebnisse der Simulation mit Hybridlab 1.0, bei der aus den identifizierten Elterarten der Lokalität artifizielle Hybride generiert wurden. Jeder Balken repräsentiert dabei ein Individuum. Die Höhe der Balken zeigt den Prozentsatz der posterioren Wahrscheinlichkeit an, mit dem ein Individuum einer bestimmten Gruppe angehört. *D. galeata* ist durch blaue Balken dargestellt, *D. cucullata* durch grüne. F1-Hybride sind gelb und F2-Hybride hellblau dargestellt, *D. galeata*-Rückkreuzungen sind lila und *D. cucullata*-Rückkreuzungen sind orange gefärbt.

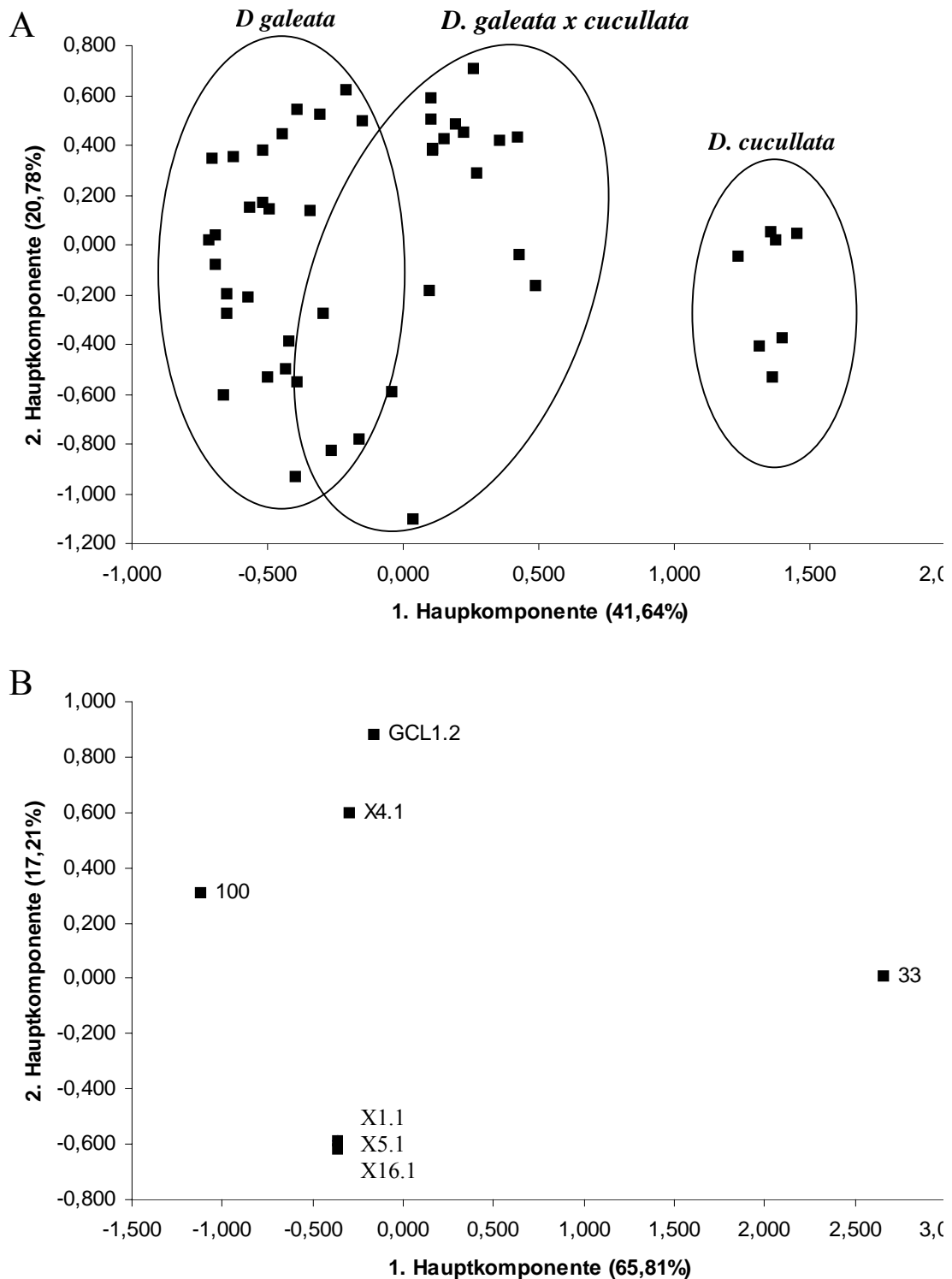


Abb. 8: Darstellung der PCA von FR-BB (A) und der Laborklone (B). In A sind die Bezeichnungen der Punkte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angezeigt. Der in der rechten Diagrammhälfte liegende *cluster* besteht aus den *D. cucullata*-Individuen, in der Mitte der Darstellung finden sich (nicht klar abgegrenzt von *D. galeata*) die Hybride. In B entspricht die Bezeichnung der Punkte dem Namen des jeweiligen Laborklones: 33 = *D. cucullata*, 100 = *D. galeata*, die anderen Individuen sind F1-Hybride dieser Klone.

### 3.2.4 Untersuchung der Arten auf Substrukturen

Um zu testen, ob innerhalb der Populationen Substrukturen existieren, wurden weitere Analysen mit dem Programm *Structure* durchgeführt. Für jede Art wurden die Individuen ausgewählt, die sicher als reine Spezies identifiziert wurden. Die Populationen LU-ES und CZ-VR wurden bei dieser Analyse nicht berücksichtigt, da die meisten Individuen dieser Populationen sehr unsichere Ergebnisse lieferten (LU-ES eigene Beobachtung; CZ-VR persönliche Mitteilung, S. Ruthová). Wie im Handbuch von *Structure* (Pritchard & Wen 2004) beschrieben, wurde nach dem Bayes'schen Theorem getestet, welches K den Datensatz am besten erklärt. Die Analyse von *D. longispina* wurde mit den Populationen CH-B, NO-GOK, SE-GB, DE-IS, AT-MS, SK-NJ, NO-NFV, SK-SAT, DE-SS und NO-SV ( $N_p = 10$ ,  $N = 303$ ) durchgeführt. Als *D. galeata*-Populationen wurden FI-PY, FR-BB, NL-GRO, NL-DH, SP-ZH, CZ-RM, DE-BO, PT-V, SP-CO, IS-MY, IT-PDA und HU-KB analysiert ( $N_p = 12$ ,  $N = 291$ ) und als *D. cucullata*-Populationen CZ-BR, DE-UHW, FR-BB, LT-DR und PL-M

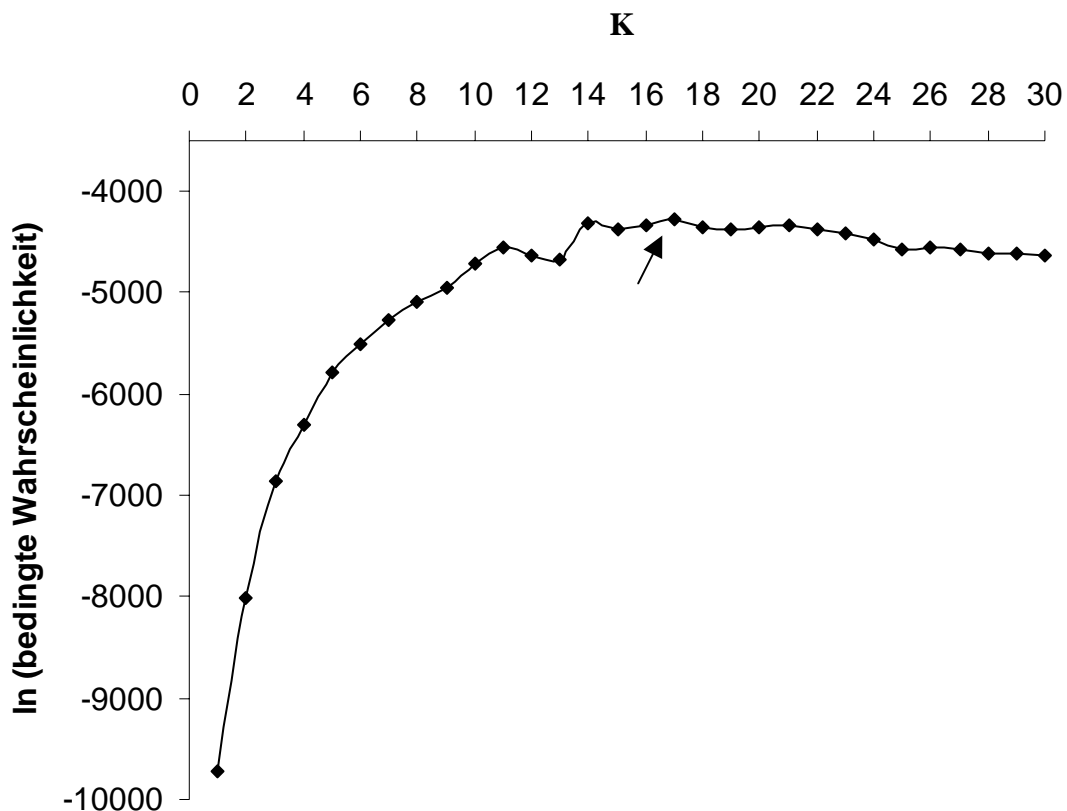


Abb. 9: Bedingte Wahrscheinlichkeiten (logarithmiert) der getesteten Werte von K bei *D. galeata*. Das Maximum der Kurve liegt bei  $K = 17$  (durch einen Pfeil markiert). Nur die Anzahl von 17 Gruppen konnte nicht signifikant abgelehnt werden ( $p = 1$ ).



( $N_p = 5$ ,  $N = 126$ ). Jede Population bestand ausschließlich aus Individuen der reinen Elternart, basierend auf der oben vorgenommenen Einteilung. Dabei wurden die Analysen jeweils für ein  $K$  von 1 bis  $3N_p$  durchgeführt (also unter der Annahme, dass es maximal drei Subpopulationen in jeder Population gibt). In jeder der Analysen konnten alle  $K$  bis auf jeweils eines hoch signifikant abgelehnt werden ( $p < 0,001$ ). Im Datensatz *D. longispina* wurde mit  $p=1$  eine Anzahl von  $K = 13$  Populationen gefunden, bei *D. galeata*  $K = 17$  ( $p = 1$ ) und bei *D. cucullata*  $K = 7$  ( $p = 0,99$ ). Abbildung 9 zeigt die Mittelwerte der logarithmierten bedingten Wahrscheinlichkeiten am Beispiel von *D. galeata* für jedes getestete  $K$ .

### 3.3 Genetische Struktur des *Daphnia longispina*-Artkomplexes

#### 3.3.1 Zusammenfassende Statistiken und genetische Differenzierung

Für alle Populationen (eingeteilt wie in Abschnitt 2.3.3.2) wurde die klonale Diversität  $D_c$ , also der Anteil der Klone an den Individuen der Population, ermittelt. Er lag bei 31 der 57 Populationen bei 1, das bedeutet, dass jedes Individuum aus der Probe der Population einen anderen MLG hat. Weitere zusammenfassende Statistiken der untersuchten Populationen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Dort ist zu jeder Population die Anzahl der Individuen  $N_i$ , die Anzahl der Klone (= Anzahl der MLGs)  $N_c$  sowie die resultierende klonale Diversität  $D_c$  gezeigt. Zusätzlich sind beobachtete und erwartete Heterozygotie ( $H_o$  und  $H_e$ ) sowie die Ergebnisse der statistischen Tests auf Heterozygotendefizit ( $H_{def.}$ ) und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) wiedergegeben. Ein Großteil der Populationen befindet sich nicht im HWG und zeigt ein Heterozygotendefizit. Die Populationen, bei denen das HWG nicht signifikant abgelehnt werden konnte, haben allerdings Stichprobengrößen von  $N_c < 10$ .

Die durchgeführten paarweisen t-Tests der Mittelwerte der Elternarten, Rekombinanten und nicht Zugeordneten für  $D_c$  ergaben keine signifikanten Unterschiede. Die Tests, ob  $H_o$  zweier Gruppen gleich ist, lieferten jedoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Paaren *D. galeata* und *D. cucullata*, *D. galeata* und Rekombinante, *D. cucullata* und *D. longispina*, *D. cucullata* und Rekombinante, *D. cucullata* und Nicht-Zuzuordnende sowie *D. longispina* und Rekombinante. Es wurden weiterhin Klassen innerhalb der Elternarten eingeführt, in denen diejenigen Populationen, die

sympatrisch mit Populationen anderer Taxa vorkommen, von denen getrennt wurden, die alleine an ihrer Lokalität gefunden wurden („[Taxon] +“ und „[Taxon]“). Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten von  $D_c$  und  $H_O$  der beiden Klassen, wobei der t-Test auf Gleichheit von  $D_c$  (gal +) und  $D_c$  (gal) mit  $p = 0,09$  nahe am Signifikanzlevel liegt. Bei diesen Tests wurden die Populationen PT-CB und IS-MY nicht berücksichtigt. Die Individuen aus PT-CB wurden zwar mit *NewHybrids* und *Structure* als *D. galeata* identifiziert, liegen in der PCA teilweise intermediär. Individuen der Lokalität IS-MY wurden zu einem Großteil nicht als *D. galeata* erkannt, obwohl Morphologie und ITS-RFLP sie als solche ausweisen (Vergleiche Abschnitt 3.2.2).

Tab. 4: Genetische Diversität der untersuchten Populationen. Gezeigt ist die Anzahl der Individuen  $N_i$ , die Anzahl der Klone  $N_c$ , die klonale Diversität  $D_c$ , die beobachtete und erwartete Heterozygotie ( $H_O$  und  $H_E$ ) sowie die Ergebnisse der Tests auf Heterozygotendefizit ( $H_{def.}$ ) und Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG). Es sind nicht nur die Elternarten aufgelistet (gal = *D. galeata*, longi = *D. longispina*, cuc = *D. cucullata*), sondern auch die rekombinanten Genotypen einer Lokalität (rek.) sowie diejenigen, die nicht signifikant einer der Elternarten bzw. Hybridklassen zugeordnet werden konnten (???). Ein „+“ hinter dem Kürzel einer Lokalität zeigt an, dass dort neben der Elternart auch noch andere Taxa bzw. Rekombinante vorkommen. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Population	Taxon	$N_i$	$N_c$	$D_c$	$H_O$	$H_E$	$H_{def.}$	HWG
CZ-BR +	cuc	35	35	1,00	0,29	0,36	***	***
CZ-VR +	cuc	56	51	0,91	0,24	0,31	***	***
DE-UHW	cuc	36	36	1,00	0,32	0,36	**	*
FR-BB +	cuc	7	6	0,86	0,08	0,18	***	0,08
LT-DR +	cuc	33	30	0,91	0,22	0,33	***	***
PL-M	cuc	12	11	0,92	0,08	0,16	***	**
CZ-BR +	gal	4	4	1,00	0,51	0,47	0,28	0,6
CZ-RM	gal	39	28	0,72	0,38	0,41	0,1	***
CZ-VR +	gal	33	30	0,91	0,43	0,51	***	***
DE-BO	gal	32	30	0,94	0,35	0,40	***	**
FI-PY	gal	15	15	1,00	0,41	0,40	**	**
FR-BB +	gal	27	27	1,00	0,44	0,53	***	***
HU-KB +	gal	3	3	1,00	0,50	0,38	0,85	0,84
IT-PDA	gal	24	11	0,46	0,15	0,17	0,12	0,2
NL-DH	gal	28	8	0,29	0,53	0,46	0,85	0,24
NL-GRO	gal	11	10	0,91	0,40	0,43	0,07	**
PT-V	gal	20	7	0,35	0,47	0,37	0,97	0,82
RU-GL +	gal	4	3	0,75	0,40	0,31	0,8	1

Tab. 4: Fortsetzung

Population	Taxon	N <sub>i</sub>	N <sub>c</sub>	D <sub>c</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	H <sub>def.</sub>	HWG
SP-CO	gal	32	26	0,81	0,34	0,36	0,25	***
PT-CB	gal?	24	10	0,42	0,79	0,54	1	***
AT-MS	longi	24	23	0,96	0,36	0,39	**	***
CH-B	longi	32	30	0,94	0,21	0,24	**	**
CZ-VR +	longi	30	30	1,00	0,49	0,55	***	***
DE-IS	longi	32	32	1,00	0,55	0,66	***	***
DE-SS	longi	30	30	1,00	0,45	0,52	***	**
IT-PI +	longi	7	6	0,86	0,38	0,37	0,32	0,27
NO-GOK +	longi	28	28	1,00	0,43	0,54	***	***
NO-NFV	longi	32	32	1,00	0,21	0,22	*	0,1
NO-SV	longi	31	31	1,00	0,43	0,48	***	**
SE-GB	longi	32	32	1,00	0,36	0,60	***	***
SK-NJ	longi	32	32	1,00	0,38	0,39	***	*
SK-SAT	longi	31	7	0,23	0,07	0,08	0,42	1
CZ-VR	rek.	14	14	1,00	0,46	0,64	***	***
FR-BB	rek.	16	16	1,00	0,54	0,62	***	***
HU-KB	rek.	4	4	1,00	0,54	0,43	0,61	0,93
IT-PI	rek.	25	19	0,76	0,74	0,56	1	***
LT-DR	rek.	4	4	1,00	0,57	0,57	0,05	0,85
NO-GOK	rek.	4	4	1,00	0,50	0,53	0,05	0,66
RU-GL	rek.	17	11	0,65	0,53	0,43	0,54	***
IS-MY	rek.?	28	9	0,32	0,53	0,37	0,99	***
CZ-VR	???	108	95	0,88	0,60	0,69	***	***
GR-AL	???	5	5	1,00	0,49	0,59	**	*
LU-ES	???	30	30	1,00	0,60	0,70	***	***
SP-BA	???	32	25	0,78	0,65	0,67	**	***
SP-ZH	???	32	21	0,66	0,21	0,20	0,19	***

Eine AMOVA wurde zum einen einzeln für jede Art durchgeführt, zum anderen für alle Arten gemeinsam mit der Art als dritter hierarchischer Ebene durchgeführt. Die Ergebnisse der AMOVAs sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Die Untersuchung der Allelspektren ergab, dass an den meisten Loci die Fragmentlängen bei unterschiedlichen Arten zwar variieren, aber in ihrer Größe stark überlappen (Daten nicht gezeigt). Dennoch sieht man an der Frequenzverteilung durchaus deutliche Unterschiede zwischen den Arten: Am Locus DaB 17/17 kommt das

Allel 100 bp bei *D. longispina* und *D. cucullata* mit nur 0,2% bzw. 0,4% vor, bei *D. galeata* dagegen mit 96,7%. *D. longispina* hat am Locus Dgm 112 nur Allele in der Größe zwischen 105 bp und 117 bp, wohingegen die anderen beiden Taxa nur Allele von den Größen 116 bp bis 130 bp tragen. Dp 519 scheint der Locus zu sein, mit dem man am besten die Arten auftrennen kann. Hier hat *D. longispina* die höchsten Allelfrequenzen bei 140 bp und 141 bp, *D. galeata* bei 144 bp bis 147 bp und *D. cucullata* trägt Allele an diesem Locus erst ab 150bp. *D. galeata* und *D. cucullata* lassen sich besonders gut am Locus DaB 10/14 unterscheiden: *D. galeata* trägt mit einer Frequenz von 79,3% dort das Allel 232 bp, *D. cucullata* mit 96,9% das Allel 227 bp. Die übrigen Loci sind weniger informativ, besonders der Locus Dp 196NB. Hier haben *D. longispina*, *D. galeata* und *D. cucullata* Allelfrequenzen von 47,9%, 99,4% und 66,4% für das gleiche Allel 120 bp.

Tab. 5: Analyse der molekularen Varianz (AMOVA). Pop. = Populationen; \*\*\* =  $p < 0,001$

Quelle der Variation	Freiheitsgrade	Anteil an Gesamtvariation	F <sub>ST</sub>	p
<u><i>D. longispina</i></u>			0,52	
Zwischen Populationen	11	52%		***
Innerhalb Populationen	301	48%		***
Total	312			
<u><i>D. galeata</i></u>			0,40	
Zwischen Populationen	12	40%		***
Innerhalb Populationen	189	60%		***
Total	201			
<u><i>D. cucullata</i></u>			0,42	
Zwischen Populationen	5	42%		***
Innerhalb Populationen	163	58%		***
Total	168			
<u>Alle Arten</u>				
Zwischen Arten	2	29%	0,29	***
Zwischen Pop., in Arten	28	36%		***
Innerhalb Populationen	751	35%		***
Total	781			

### 3.3.2 Korrelation geographischer und genetischer Distanzen

Die Theorie der *isolation by distance* wurde mit einem Manteltest überprüft, indem die geographischen mit den genetischen Distanzen verglichen wurden. Der Test zeigt für alle drei Arten das gleiche Bild. Auf hohem Niveau signifikante ( $p < 0,001$ ), aber schwache Korrelationen:  $R^2$ : 0,22; 0,09 und 0,07 – jeweils für *D. longispina*, *D. galeata*, *D. cucullata* (Abbildung 10). Das bedeutet, dass nur 22%, 9% und 7% der Varianz in der Analyse durch einen statistisch signifikanten Zusammenhang erklärt wird. Die Regressionsgeraden steigen ebenfalls nur sehr schwach an.

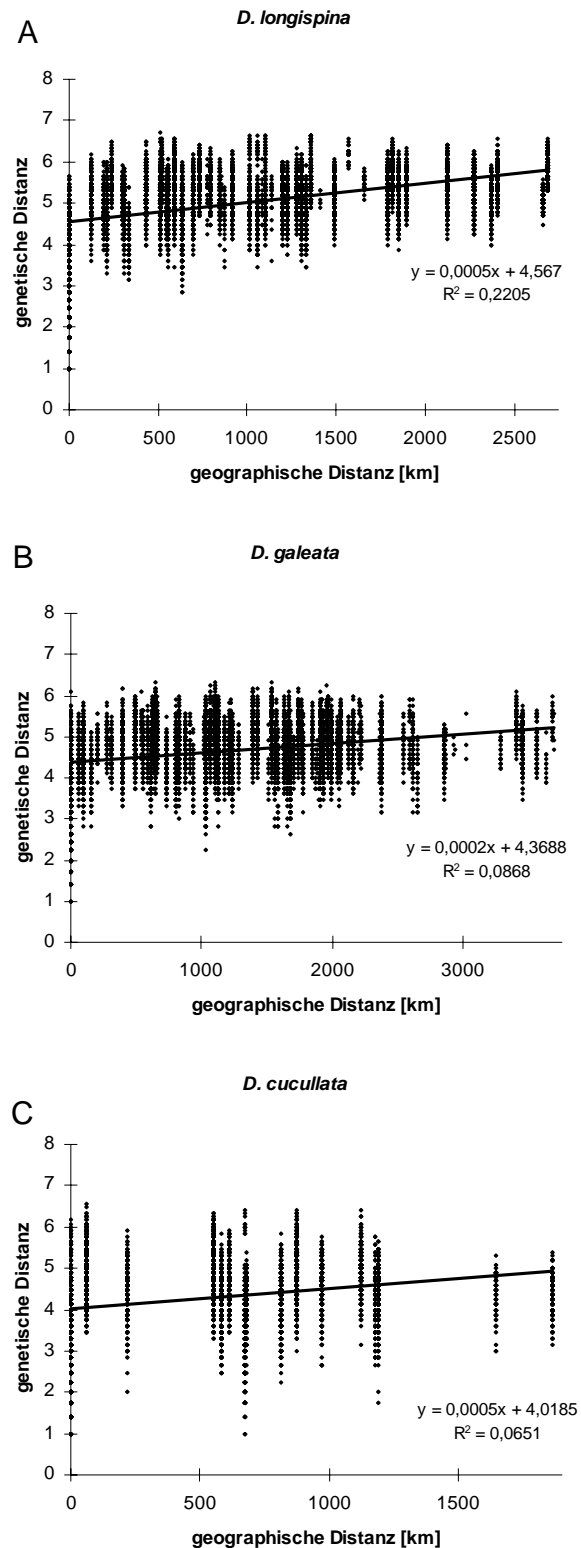


Abb. 10: Mantel-Tests für die Korrelation der genetischen mit den geographischen Distanzen (*GenAlEx*). A: *D. longispina*, B: *D. galeata*, C: *D. cucullata*. Jeder Punkt ist ein Individuenpaar, das in einer bestimmten Klasse von geographischer Distanz eine bestimmte genetische Distanz zueinander hat. Mit angegeben sind jeweils die Gleichungen der Regressionsgraden und der Korrelationskoeffizient  $R^2$ .

## 4 Diskussion

Die Diskussion befasst sich mit den beiden grundlegenden Fragen dieser Arbeit. Zum einen wird beurteilt, mit welchen Ansätzen es möglich ist, in einem Artkomplex aus drei hybridisierenden Arten diese zu erkennen und abzugrenzen. Weiterhin wird am Beispiel des *D. longispina*-Artkomplexes die vorgeschlagene Methodik erklärt, spezielle Probleme erläutert und der Erfolg des Ansatzes dargestellt. Weiterhin werden Möglichkeiten zur Optimierung diskutiert. Im zweiten Teil wird vergleichend die Diversität und Populationsstruktur des *D. longispina*-Artkomplexes behandelt.

### 4.1 Arterkennung in einem hybridisierenden Drei-Arten-Komplex

#### 4.1.1 Erkennung der Arten

Es wurden zwei Methoden zur Erkennung von nah verwandten Arten und deren Hybriden durchgeführt. Abbildung 3 zeigt, dass die genetischen Marker den Gesamtdatensatz schon ohne statistische Verfahren in einer einfachen PCA in drei Großgruppen einteilen können. Diese Methode basiert rein auf der genetischen Distanz der Individuen zueinander. Die drei *cluster* konnten durch Vergleich mit morphologischen und RFLP-Daten den Arten zugeordnet werden. Einige Individuen, die genetisch intermediäre Genotypen zeigen und damit interspezifische Hybride sind, werden zwischen die *cluster* positioniert. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den theoretischen Erwartungen und praktischen Erfahrungen anderer Studien. Sowohl Morphologie (z.B. Schwenk et al. 2001) als auch *life history*-Parameter (z.B. Spaak & Hoekstra 1995) von Hybriden aus *D. galeata* und *D. cucullata* wurden in der Vergangenheit als intermediär zu den Elternarten bestimmt. Detailliertere Untersuchungen mit molekularen Markern in diesem System zeigten ebenfalls intermediäre Genotypen (Billiones et al. 2004) und genetische Untersuchungen anhand von Allozymen gaben auch Hinweise auf Rückkreuzungen (Spaak 1996).

Trotz Hybridisierung und bekannter phänotypischer Plastizität wurden in vorangegangenen Studien zwischen den Arten 11-15% mitochondriale Sequenzdivergenz und damit klar getrennte Matrilinien gefunden (Schwenk 1993, Schwenk & Spaak 1995). Der in dieser Untersuchung verwendete Ansatz bestätigt auf nukleärer Ebene diese Erkenntnisse. Die genetische Distanz, die in dieser Untersuchung ermittelt wurden, deuten auf klare Arten im Sinne des evolutionären Artkonzeptes (Wiley 1978) hin. Ebenfalls zutreffend könnte das genealogische Artkonzept sein. Man könnte in diesem Fall die Hybride als eigene Art beschreiben, was aber meiner Ansicht nach in den entstehenden Netzwerken zu Komplikationen führt. Es können durch Hybridisierung Verwandtschaftsbeziehungen entstehen, in denen Arten über Hybridisierung auf kategoriellen Ebenen oberhalb der Arten falsch zusammengefasst werden. Zum Beispiel hätte ein *D. galeata* x *lacustris*-Hybrid in einem solchen Netzwerk eine Verbindung von *D. galeata* mit *D. lacustris* auf über-artlicher Ebene zur Folge, die mit den Verwandtschaftsbeziehungen im untersuchten *D. longispina*-Artkomplex überlappt. Eine solche Überlappung von genealogischen Beziehungen oberhalb des Artlevels macht in der dieser Definition der Arten aber wenig Sinn. Trotz der potentiellen fortwährenden Vermischung von Arten durch introgressive Hybridisierung bleiben die Genome der drei Elternarten voneinander isoliert (Schwenk & Spaak 1995, Spaak 1996, Schwenk & Spaak 1997). Es ist aber bekannt, dass introgressive Hybridisierung bei Daphnien des *D. longispina*-Artkomplexes zur Durchmischung der Genome führen kann, was in einer Invasion des Genoms der einen Art durch Anteile des Genoms einer anderen begründet ist (Mallet 2005, Brede et al. 2007). Aber nicht nur Rückkreuzungshybride, sondern auch F2-Hybride wurden in der Vergangenheit gefunden. Hobaek et al. (2004) und Jankowski & Straile (2004) fanden Indizien für *D. galeata* x *longispina* F2-Hybride. Auch im nordamerikanischen *D. longispina*-Komplex wurden F2-Hybride zwischen *D. galeata mendotae* und einem speziellen *D. rosea*-Morphotyp gefunden (Taylor & Hebert 1992). Dass die in der vorliegenden Studie gefundenen Arten sich dennoch deutlich voneinander abgrenzen, ist ein Hinweis darauf, dass reproduktive Barrieren allerdings immer noch existieren. Hinweise hierauf werden in Schwenk et al. (2000) gegeben. Coyne & Orr (2004) fassen reproduktive Barrieren zusammen: i) Vor der Verpaarung; ii) nach der Verpaarung, präzygotisch; iii) postzygotisch. Für Daphnien im Allgemeinen sind Beispiele auf verschiedenen Ebenen der reproduktiven Isolation bekannt: Brewer (1998) fand heraus, dass z.B. *D. pulicaria* durchaus ein selektives Paarungsverhalten zeigt und Winsor &



Innes (2002) beschrieben die Vermeidung von Inzucht durch *D. pulex*. Schwenk et al. (2001) hatten in Experimenten einen relativ geringen Schlupferfolg von c x g Hybriden (28%), wobei nur 3,6% von diesen bis zur Reife heranwuchsen. Man kann also von unvollständiger reproduktiver Isolation auf verschiedenen Ebenen ausgehen.

#### 4.1.2 Identifizierung von Hybridklassen

Ziel der Untersuchung war außerdem, nicht nur die Parentaltaxa, sondern auch verschiedene Hybridklassen zu identifizieren. Dies wurde nur bedingt erreicht. Zwar wurde in der Vergangenheit erfolgreich *NewHybrids* für diesen Zweck im hier bearbeiteten Komplex eingesetzt (z.B. Jankowski & Straile 2004, Brede et al. 2007), jedoch wurde auch durch eine simulationsbasierte Untersuchung von Vähä & Primmer (2006) gezeigt, dass Rückkreuzungen erst mit einer relativ hohen Anzahl von Loci (mindestens 48) erkannt werden können. Diese Voraussage stützt sich jedoch auf einen  $F_{ST}$ -Wert von 0,21. Der hier gefundene Wert liegt mit 0,29 noch ein Stück höher. Um F1-Hybride zu identifizieren, sollten bei einem  $F_{ST}$ -Wert von mindestens 0,21 sogar nur 12 Loci nötig sein. Der hier verwendete Ansatz hatte also gute Voraussetzungen, um zumindest diese Hybride zu identifizieren. Wie man in Abbildung 4 jedoch sieht, wurden relativ wenige Individuen sicher einer der Hybridklassen zugeordnet. Die einzigen beiden Rückkreuzungshybride (von insgesamt 1155 getestet; ~0,2%) wurden im Komplex *D. galeata/cucullata* gefunden, die einzigen beiden F1-Hybride im Komplex *D. galeata/longispina*, jedoch wurden in den beiden Komplexen einige F2-Hybride, 30 und 20 Individuen, gefunden. Es konnten jeweils über 100 Individuen nicht sicher zugeordnet werden. Die Ergebnisse aus den *Structure*-Analysen (Abbildung 5) deuten jedoch darauf hin, dass die meisten dieser Individuen Hybride sein müssen, nur einige könnten auch Individuen der Parentaltaxa darstellen. Auch bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse von *NewHybrids* (Daten nicht gezeigt) stellt sich heraus, dass viele der nicht als sicher zugeordneten Individuen durchaus posteriore Wahrscheinlichkeiten von über 80% hatten, einer der Gruppen (Elternart oder einer der Hybridklassen) anzugehören. Diese Zuordnungen waren nach der hier vorgenommenen Definition allerdings nicht eindeutig genug. Ein viel größerer Teil der Hybride (als man rein intuitiv erwarten würde) wurde als F2-Hybrid identifiziert, wenn auch meist nicht auf dem geforderten Signifikanzlevel von 95%. Dies war vor allem in der Population CZ-VR der Fall, in der alle Elternarten und die Hybride *D. galeata x cucullata* sowie

*D. galeata* x *longispina* vorkommen. Bei der Betrachtung der Populationen FR-BB, die einzeln (also nicht im Gesamtdatensatz) analysiert wurde, zeigt sich, dass *NewHybrids* durchaus in relativ kleinen Datensätzen nur einer Population bessere Zuordnungen trifft als im großen Gesamtdatensatz. Die Gründe dafür werden im weiteren Verlauf dieses Abschnitts noch detaillierter diskutiert. Im Gesamtdatensatz liefert *NewHybrids* nur für die Elternarten hohe posteriore Wahrscheinlichkeiten, wohingegen rekombinante Individuen mit jeweils geringen posterioren Wahrscheinlichkeiten entweder als F2-Hybride oder Rückkreuzungen zu *D. galeata* identifiziert werden (Abbildung 7A). Allein analysiert werden die rekombinanten Individuen mit deutlich höheren posterioren Wahrscheinlichkeiten als F1-Hybride erkannt (Abbildung 7B). Als weiterer Test, ob *NewHybrids* in der Lage ist, unter den gegebenen Bedingungen Hybridklassen zu identifizieren, wurde zusätzlich eine Hybridsimulation mit realen Genotypen als Elternarten durchgeführt. Dabei erkannte *NewHybrids* mit nur zwei Ausnahmen in einem Datensatz von 136 Individuen korrekt Elternarten und F1-Hybride (Abbildung 7C). *NewHybrids* ist in der Lage, Hybride und Elternarten gut zu erkennen, solange man einzelne Populationen untersucht, die beide Elternarten enthalten. Weitere Indizien, dass es Probleme bei einer Betrachtung des gesamteuropäischen Komplexes gibt, liefern die folgenden Beobachtungen: Im Gesamtdatensatz sind zwischen den *D. galeata*- und *D. longispina*-clustern Hybride verschiedener Klassen gleichmäßig in Richtung beider Elternarten verteilt. Im *D. galeata/cucullata*-Komplex liegt allerdings ein Großteil der Hybride näher an *D. galeata* (Abbildung 6). Experimentelle Hybride sind aufgrund ihrer genetischen Distanzen der hier verwendeten Loci in einer PCA näher an das Elternteil *D. galeata* gruppiert als an *D. cucullata* (Abbildung 8B). Auch in der allein betrachteten realen Population FR-BB zeigt sich dieses Muster sehr deutlich (Abbildung 8A). Rein theoretisch sollten F1-Hybride in einer solchen Darstellung mittig zwischen den beiden Eltern liegen. Die Beobachtungen könnten verschiedene Erklärungen haben: i) *meiotic drive*; ii) Aufspaltung der Genotypen einer Population in Subpopulationen, von denen manche hybridisieren und andere nicht; iii) Unzulänglichkeiten im Markersystem.

i) Unter *meiotic drive* versteht man das „Verhalten“ einiger DNA-Abschnitte, nicht in einem 1:1 Verhältnis durch die Gameten eines Heterozygoten vererbt zu werden. Man nennt dieses Phänomen auch Störung der Segregation (*segregation distortion*). Zum Beispiel konnte in Experimenten an Mäusen ein Verhältnis von 1:10 für das

Vorhandensein eines bestimmten Gens in den Spermien festgestellt werden (Futuyma 2005). Allerdings wird *meiotic drive* meist in Zusammenhang mit anderen „egoistischen genetischen Elementen“ (*selfish genetic elements*) im Rahmen von Selektion und Adaption diskutiert (Hurst & Werren 2001). Dennoch wird z.B. in phylogenetisch divergenten Populationen der Stabaugenfliege *Cyrtodiopsis sp.* ein Zusammenhang zwischen Mikrosatellitenvariation und *meiotic drive* vermutet (Wright et al. 2004). Mit den hier erhobenen Daten kann dies für den *D. longispina*-Artkomplex nicht bestätigt, aber auch nicht abgelehnt werden. Weitere experimentelle Arbeiten wären dazu nötig.

ii) Die zweite Hypothese, dass Subpopulationen, die nicht oder in deutlich geringerem Ausmaß an der Hybridisierung teilnehmen, existieren, wurde in dieser Studie untersucht. Die Ergebnisse des Abschnitts 3.2.4 deuten darauf hin, dass es innerhalb der Populationen der reinen Arten durchaus Substrukturen gibt. Für *D. longispina*, *D. galeata* und *D. cucullata* wurden 10, 12 und 5 Populationen mit *Structure* getestet, wobei in den Datensätzen mit hoher statistischer Signifikanz 13, 17 und 7 Gruppen gefunden wurden. In jeder der drei Arten scheint es also Substrukturen zugeben. Um welche der Populationen es sich dabei handelt, und ob einige der Untergruppen weniger (bzw. gar nicht) zur Hybridisierung beitragen, müssen detailliertere Untersuchungen zeigen, die sowohl empirisch als auch experimentell ausgelegt sein sollten.

iii) Da die eingesetzten Marker zwar in einem groß angelegten Test in verschiedenen Arten von Daphnien des *D. longispina*-Komplexes getestet wurden (Brede et al. 2006), ursprünglich aber für *D. pulicaria* (Colbourne et al. 2004, Dp), allgemein europäische Hyalodaphnien (Ender et al. 1996, DaB) und für nordamerikanische *D. galeata mendotae* (Fox 2004, Dgm) entwickelt wurden, kann es durchaus sein, dass diese Marker nicht alle auf der hier untersuchten großräumigen Skala perfekt funktionieren (nur die Marker mit den Bezeichnungen SwiD wurden durch Brede et al. 2005 speziell für *D. galeata* entwickelt). Der Mikrosatellit Dgm 112, der die schlechteste Erfolgsrate bei der Amplifikation zeigte, wurde ursprünglich für *D. galeata mendotae* entwickelt. Es zeigte sich, dass fast nur *D. cucullata* von der schlechten Amplifizierbarkeit dieses Locus betroffen ist. Eventuell treten bei dieser Art an diesem Locus Null-Allele auf. Das sind Fragmente, die aufgrund von Punktmutationen in der *primer*-Bindungsregion außerhalb des Mikrosatelliten nicht

amplifiziert werden (Paetkau & Strobeck 1995, Selkoe & Toonen 2006). Dies führt dazu, dass gar keine oder nur manche der vorkommenden Allele amplifiziert werden. Zusätzlich kommt es zwischen den Loci SwiD 12 und SwiD 6 bei *D. cucullata* zu Überlappungen in den Fragmentgrößen, die es in *D. galeata* und *D. longispina* nicht gibt. Diese beiden Loci konnten also – wie im Ergebnisteil beschrieben – sehr oft nicht ausgewertet werden. Dadurch könnten die Analysen gestört sein, da es bei *D. cucullata* nicht-zufällige Muster von fehlenden Loci im Datensatz gibt. Zur Zeit wird diese Beobachtung im Rahmen des „decade project“ von Anne Thielsch (Thielsch et al. 2007) überprüft. Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass eben diese Loci die hier beobachteten Schwierigkeiten verursachen, Hybride korrekt zu identifizieren. Zusätzlich wurden Simulationen durchgeführt, in denen die Laborklone 33 und 100 als Elternarten eingesetzt wurden (vergleiche Abschnitt 2.3.2 und 3.2.3). Dabei fanden aber nicht alle zwölf Marker Verwendung, sondern nur sechs, von denen in Einzelamplifikationen eindeutige Allele gefunden wurden. Vorläufige Ergebnisse (K. Schwenk, persönliche Mitteilung) zeigen, dass die simulierten Hybride und auch die experimentellen mit diesen sechs Markern genetisch wirklich intermediär sind (Hauptkomponentenanalyse, Daten nicht gezeigt).

Ich vermute, dass die in dieser Studie gefundenen Schwierigkeiten, Hybridklassen korrekt im Gesamtdatensatz zu identifizieren, als Ursache eine Kombination aus komplexen Substrukturen innerhalb von Populationen und einer suboptimalen Wahl der Marker haben. Weiterhin spielt sicherlich auch die große Varianz zwischen den Populationen innerhalb der Arten eine entscheidende Rolle. In wie weit *meiotic drive* für die gemachten Beobachtungen verantwortlich ist, muss mit einem neuen Versuchsaufbau getestet werden.

Während die Identifizierung von Hybridklassen mit *NewHybrids* problematisch war, liefert die Auswertung mit *Structure* dennoch interessante Ergebnisse. Aus Abbildung 5 kann man die Anteile der reinen Elternarten und deren Hybride am Gesamtdatensatz abschätzen. Die drei untersuchten Arten haben durchaus unterschiedliche Charakteristika, was ihre Fähigkeiten angeht, Hybride mit anderen Arten zu bilden. *D. longispina* scheint einen geringen Anteil an F1-Hybriden mit den anderen beiden Arten zu bilden, jedoch konnten einige Rückkreuzungen gefunden werden, und zwar in

ähnlichen Anteilen in Richtung der anderen Elternart wie in Richtung zu sich selbst. Dies deutet darauf hin, dass zwar immer wieder F1-Hybride gebildet werden, aber einen geringeren Erfolg haben als die Rückkreuzungen. Im Falle von *D. galeata* sieht das Bild ganz anders aus. Man findet im Bereich der Genomanteile, in dem man F1-Hybride erwarten würde (~40-60%) eine große Zahl an Individuen wieder, die dort eine Art „Plateau“ bilden. Der Anteil an Rückkreuzungen ist im Vergleich zum Anteil der F1-Hybride eher gering. Bei *D. cucullata* findet man ein ganz ähnliches Bild, auch wenn hier die Stichprobengröße von Individuen mit *D. cucullata*-Genom leider deutlich geringer ist. Im F1-Hybrid-Bereich gibt es ein Plateau. Hier sind aber im Gegensatz zu *D. galeata* und *D. longispina* viel weniger Rückkreuzungen zur eigenen Art zu sehen. Rückkreuzungen zu den anderen Arten hingegen scheinen ähnlich häufig zu sein. Dass die Hybride von *D. galeata* eher mit einem Anteil von mehr als 50% am *D. galeata*-Genom liegen und die Hybride von *D. cucullata* mit einem Anteil von eher unterhalb 50% am eigenen Genom, ist vermutlich auch eine Folge der oben diskutierten Markerprobleme und sollte nicht überinterpretiert werden. Kombiniert mit der Aussage der PCA ergibt sich folgendes Bild für die Hybridisierung im *D. longispina*-Artkomplex: *D. longispina* selbst bildet Hybride mit *D. galeata*, aber nicht (oder so selten, dass ich keine gefunden habe) mit *D. cucullata*. Zwar wurden *D. cucullata* x *longispina*-Hybride in einer Studie von Gießler (1997) gefunden, sie sind aber sehr selten (persönliche Mitteilung, K. Schwenk). Hybride zwischen *D. galeata* und *D. cucullata* scheinen dagegen wiederum ebenso häufig zu sein, wie diejenigen zwischen *D. galeata* und *D. longispina*. Leider konnte ich keine exakten Zahlenverhältnisse bestimmen, da die Ergebnisse aus *Structure* für sich genommen keine sichere Zuordnung zu Hybridklassen erlauben und ich aufgrund der unsicheren Ergebnisse von *NewHybrids* diese Analysen nicht durchgeführt habe. Es wäre interessant testen zu können, ob der Anteil der Hybride nicht nur vom Habitat und seiner Ökologie (z.B. Spaak & Hoekstra 1995), sondern auch von den Taxa abhängen könnte, wenn unterschiedliche Taxa unterschiedliche Fähigkeiten zur Hybridisierung aufweisen (Mallet 2005). Dies müsste in Experimenten ermittelt werden, in denen unter gleichen ökologischen Bedingungen die Hybridisierungsrate zwischen verschiedenen Paaren der Parentaltaxa ermittelt würde.

### 4.1.3 Möglichkeiten zur Optimierung

Bei der Identifizierung der Elternarten und Hybridklassen gab es einige Schwierigkeiten. Eine Fehlerquelle liegt auf der Hand: Für viele Lokationen konnten nicht alle dort vorkommenden Taxa des *D. longispina*-Artkomplexes untersucht werden, weil die Zeit es nicht zuließ. Zum Beispiel in der Lokalität RU-GL kommen neben den in dieser Arbeit als rekombinant identifizierte Tiere zusätzlich alle drei Elternarten des Komplexes vor (Glagolev 1986), von denen aber keine Individuen in die vorliegende Untersuchung eingebunden sind. Introgressive Hybridisierung hat sicherlich einen erheblichen Einfluss auf die dort vorkommenden Genotypen (vergleiche Brede et al. 2007). Gerade diese Lokalität lieferte in der vorliegenden Untersuchung uneindeutige Ergebnisse, genauso wie CZ-VR, in der ebenfalls alle drei Arten des Komplexes vorkommen und hybridisieren. Für viele der Populationen, die nicht vollständig untersucht wurden, existiert noch Material. Außerdem ist die gesamteuropäische Abdeckung noch nicht für alle Arten erreicht. Für *D. cucullata* z.B. stehen noch Proben aus Sizilien und Skandinavien zur Verfügung, für *D. galeata* z.B. aus England, Schottland und Irland. Der stellenweise unbefriedigende Erfolg der DNA-Amplifikationen, der entweder auf schlechter Konservierung der Proben (methyliertes oder vergälltes Ethanol, zu niedrige Endkonzentrationen des Ethanols beim Lagern) oder auf Problemen mit dem verwendeten H3-Puffer beruhte, könnte erhöht werden. Dazu sollte man den Partnern vor Ort noch detailliertere Informationen zum Sammeln und Lagern des Materials geben, bzw. bei der DNA-Präparation häufiger den H3-Puffer frisch ansetzen, da dieser oft ein großes Problem zu sein scheint. Außerdem sollten noch möglichst viele der fehlenden Loci bei den hier verwendeten Tieren ergänzt werden. Dies könnte große Vorteile bei der Erkennung von rekombinanten Genotypen haben. Der Locus Dgm 112 sollte bei Untersuchungen, in denen auch *D. cucullata* unter den zu analysierenden Tieren ist, nicht mehr eingesetzt werden, da er bei dieser schwer zu amplifizieren ist.

Abbildung 4 und Tabelle 2 sowie die Allelfrequenzen (siehe Abschnitt 3.3.1) geben wichtige Hinweise darauf, dass es für die Frage nach der Arterkennung zum einen zwar besonders informative Loci gibt, zum anderen aber auch Loci, die nicht informativ waren. Der Locus Dp 196 wurde durch *NewHybrids* z.B. als besonders uninformativ identifiziert, egal, welche Artkombination getestet wurde. Der Locus SwiD 6 hingegen

hat in allen durchgeführten Analysen einen sehr hohen Informationsgehalt. Ansonsten sind viele Loci für die Analysen bestimmter Artkombinationen geeignet, aber nicht für eine andere Analyse. Zum Beispiel hat der Locus Dgm 109 hohe Kullback-Leibler Divergenzen in Analysen, in denen *D. cucullata* mit einer der beiden anderen Arten analysiert wurde, aber einen besonders geringen Wert in der Analyse *D. galeata/longispina*. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Locus SwiD 14. Abbildung 4 gibt allerdings einen starken Hinweis darauf, dass die Reduzierung der Loci auf die sechs, bzw. drei informativsten keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Um dies zu bestätigen müssen weitere statistische Test durchgeführt werden. Außerdem wurden die Analysen über die informativen Loci nur am Gesamtdatensatz vorgenommen. Es sollten weitere Untersuchungen angestellt werden, ob die Ergebnisse solcher Analysen an Einzelpopulationen vom Ergebnis der Analysen am Gesamtdatensatz abweichen. Trotz der Tatsache, dass an dieser Stelle noch einiges an Arbeit investiert werden muss, scheint es möglich zu sein für die Art- und Hybridklassenerkennung die Anzahl der benötigten Loci noch weiter auf besonders informative Loci zu reduzieren. Dies spart sowohl Kosten als auch Zeit. Allerdings sollte beachtet werden, dass bei populationsgenetischen Analysen auch die hier als uninformativ dargestellten Loci ihren Wert besitzen, wenn es z.B. um Berechnungen der Diversität einzelner Populationen geht (HWG, Heterozygotie, Klonalität).

Es gibt wenig Literatur über Studien, in denen ein System aus drei miteinander hybridisierenden Arten untersucht wurde. Gießler (1997) untersuchte ebenfalls den *D. longispina*-Artkomplex, jedoch mit einer Kombination aus Allozymen und Morphologie. Es war zwar möglich, Elternarten und Hybride zu unterscheiden, jedoch nicht die Einteilung der Hybride in verschiedene Klassen. Eine Arbeit, die auch RFLP mit Mikrosatellitendaten (10 Loci) kombinierte, wurde von Lancaster et al. (2006) an Pelzrobben durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls das Programm *Structure* eingesetzt mit dem gute Ergebnisse erzielt wurden, jedoch keine Analysen mit *NewHybrids*, die vermutlich eine bessere Auflösung der Hybridklassen ermöglicht hätte. Die hier verwendete Kombination aus den Analyseprogrammen *NewHybrids* und *Structure* erwies sich prinzipiell als sinnvoll. Jedoch scheint eine Voreinteilung des Datensatzes in die jeweiligen Zweiartkomplexe des Gesamtkomplexes aufgrund der in der PCA dargestellten genetischen Distanzen mit anschließender hierarchischer Analyse – wie sie hier durchgeführt wurde – als umständlich und subjektiv. Um reine Arten zu finden

eignet sich *Structure* sehr gut. Da man durch Morphologie und ITS-Analysen weiß, dass es drei Arten im Komplex gibt, die in ihren genetischen Distanzen deutlich getrennte Gruppen bilden, ist der *Structure*-Lauf mit  $K = 3$  sehr informativ und vermag, die reinen Arten zu finden. Erst danach sollten die Zweiartkomplexe zusammen mit ihren putativen Hybriden in *NewHybrids* analysiert werden, um bei den Hybridklassen eindeutige Zuordnungen zu erhalten.

## 4.2 Vergleichende Diversität und Populationsstruktur

### 4.2.1 Differenzierung

Tabelle 5 zeigt, dass die einzelnen Populationen hoch differenziert sind. Die  $F_{ST}$ -Werte der Arten deuten daraufhin, dass kaum Genfluss durch Migration zwischen den Populationen stattfindet. Die hier gefundenen Werte für  $F_{ST}$  zwischen von 0,4 bis 0,52 in den einzelnen Arten zeigen eine sehr hohe Divergenz der Populationen (Conner & Hartl 2004). Die Variabilität zwischen den Arten, zwischen den Populationen innerhalb der Arten und innerhalb der Populationen ist etwa gleich groß. Die Arten und Populationen sind also hoch differenziert. Solche Muster lassen oft auf eine Isolation der Populationen schließen. Bei sehr geringem Genfluss, wie er hier gefunden wurde, sollten nah beieinander liegende Populationen sich dennoch ähnlicher sein, als weit auseinander liegende (*isolation by distance*, Futuyma 2005). Dies wurde hier nicht festgestellt. Abbildung 10 zeigt zwar eine leichte Tendenz, dass geographisch weiter voneinander entfernt liegende Individuen auch eine höhere genetische Distanz zueinander aufweisen. Dies ist sogar statistisch signifikant, aber bei den geringen Werten biologisch nicht relevant. Dies geht einher mit den Ergebnissen von Bernatchez & Wilson (1998, Fische), De Meester et al. (2002, aquatische Organismen), Hebert et al. (2003, *D. ambigua*), De Gelas & De Meester (2005, *D. magna*) und Thielsch (2005, *D. longispina*). Die Theorie des „Provinzialismus“ (Hebert & Wilson 1994) sagt für zyklisch parthenogenetische Organismen, die sich schnell verbreiten können, ein solches Muster aber voraus. Obwohl auf den ersten Blick klar zu sein scheint, dass planktonische Organismen das Habitat nicht wechseln können, ist diese Beobachtung zunächst aber unerwartet, da für Dauereier produzierendes Zooplankton schon seit Lyell (1832) und Darwin (1859) weite und schnelle Verbreitung durch Wasservögel (Proctor 1964, Figuerola & Green 2002) oder auch durch andere Verbreitungsmechanismen wie



Wind (Brendonck & Riddoch 1999), Regen oder menschliche Aktivität (Havel & Shurin 2004) vermutet wird. Dieses Paradox, dass Mechanismen zur schnellen und effektiven Verbreitung verfügbar sind, diese aber sich nicht in erhöhtem Genfluss äußern, wurde durch De Meester et al. (2002) mit der Monopolisierungshypothese erklärt. Als Grundlage dienen ihr Annahmen über Gründereffekte in Kombination mit hohen klonalen Wachstumsraten und der Etablierung von Dauereierbanken im Sediment. Dadurch wird das Habitat sehr schnell und effizient von einigen präadaptierten Genotypen besiedelt, deren Nachkommen auch Winter- oder Trockenperioden als Dauerstadien überstehen. Bei erneut guten Bedingungen vermehren sich diese explosionsartig und bilden hohe Populationsdichten, sodass Neubesiedler sich nicht etablieren können. Daraus resultiert ein sehr geringer Genfluss. Die empirische, experimentelle und theoretische Überprüfung der Hypothese wird zur Zeit im ESF-Projekt BIOPOOL durchgeführt.

#### **4.2.2 Klonale Diversität und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht**

Die klonale Diversität aller untersuchten Populationen variiert sehr stark (zwischen 0,23 bei SK-SAT oder 0,29 bei NL-DH und 1 bei einer Vielzahl von Populationen). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung waren bei *D. longispina*  $0,91 \pm 0,22$ , bei *D. galeata*  $0,78 \pm 0,26$ , bei *D. cucullata*  $0,93 \pm 0,06$ , bei den Rekombinanten  $0,93 \pm 0,14$  und  $0,86 \pm 0,15$  bei den nicht zuzuordnenden. Die Unterschiede zwischen den drei Arten und Rekombinanten sind allerdings nicht signifikant. Für parthenogenetische Tiere wurden in der Vergangenheit einige Untersuchungen durchgeführt, bei denen entgegen der intuitiven Annahme, dass asexuelle Fortpflanzung zu genetischer Armut durch Anhäufung von letalen Mutationen führt (Petrunkevitch 1905, Williams 1975), ebenfalls eine hohe klonale Diversität festgestellt wurde (Bell 1982, Hughes 1989, Vrijenhoek 1989). In Untersuchungen an arktischen *D. pulex* und *D. tenebrosa* wurde dies bestätigt (Dufresne & Hebert 1995). Eine detailliertere Untersuchung am *D. longispina*-Artkomplex zeigte jedoch Unterschiede der klonalen Diversität zwischen *D. galeata* und deren Hybriden (Müller & Seitz 1995). *D. galeata* hatte eine höhere sexuelle Fortpflanzungsrate, aber eine geringere klonale Diversität als die Hybride. Dies kann hier nicht signifikant bestätigt werden, aber im Vergleich von *D. galeata* mit den Rekombinanten zeigen die Ergebnisse dieser Studie durchaus eine Tendenz, dass bei dieser Kombination ein Unterschied bestehen könnte. Durch die geringen

Stichprobengrößen (der Anzahl der Populationen pro Taxon) wurde dieser aber nicht gefunden. Die Ergebnisse dieser Studie, die durch Mikrosatellitendaten gewonnen wurden, decken sich also mit den oben erwähnten, in denen in der Regel Allozyme Verwendung fanden, die eine deutlich geringere Variabilität aufweisen. Dass die gefundene Werte der Populationen innerhalb der Taxa stark schwanken, liegt daran, dass auch ökologische Parameter wie Größe oder Permanenz des Gewässers Einfluss auf die genetische Diversität von parthenogenetischen Zooplanktonpopulationen haben (De Meester 1996). So durchlaufen z.B. Bewohner temporärer, periodisch austrocknender Gewässer häufiger sexuelle Stadien, um ihre Dauereier zu produzieren. Solche Parameter wurden in dieser Untersuchung allerdings nicht analysiert.

Bei der beobachteten Heterozygotie zeigen einige Vergleiche signifikante Unterschiede. Dabei fällt auf, dass sich *D. galeata* (Mittelwert  $0,41 \pm$  Standardabweichung  $0,1$ ) und *D. longispina* ( $0,36 \pm 0,14$ ) durch nicht signifikant unterschiedliche Heterozygotien auszeichnen, wohingegen *D. cucullata* ( $0,21 \pm 0,1$ ) eine signifikante geringere Heterozygotie als diese beiden zeigt. Die Rekombinanten ( $0,54 \pm 0,09$ ) zeigen eine signifikant höhere Heterozygotie als die drei Elternarten. In der Literatur über *Daphnia* gibt es bisher in Platt & Spitze (2000) nur eine Zusammenfassung der beobachteten Heterozygotie, in der Allozyme als Marker dienten. Dort bewegen sich die Werte von  $0,02$  bei *D. thorata* bis  $0,21$  bei *D. carinata* (beide Benzie 1986) mit einem Mittelwert aller in Platt & Spitze (2000) aufgelisteten Arten von  $0,1$ . Diese Werte sind natürlich deutlich geringer als die hier gefundenen, da Allozyme weniger variabel sind als Mikrosatelliten. Nach den Erwartungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts zeigen aber die meisten der untersuchten Populationen dennoch ein Heterozygotendefizit. Das ist relativ ungewöhnlich für parthenogenetische Organismen. Denn theoretisch sollte unter Abwesenheit von Sexualität die Heterozygotie zunehmen, da durch die Anhäufung von Mutationen ein Heterozygotenüberschuss entsteht. Man nennt dies den Meselson-Effekt (Birky 1996, Judson & Normark 1996). Dieses Phänomen konnte z.B. in empirischen Studien an urtümlichen asexuellen Rotiferen bestätigt werden (Butlin 2000, Welch & Meselson 2001). Der Unterschied zwischen den obligat asexuellen Rotiferen und Daphnien ist allerdings, dass die Daphnien des hier untersuchten Komplexes häufig zwischen sexueller und asexueller Phase wechseln. Es gibt also durchaus Sexualität, die die Heterozygotie wieder verringern kann. Wenn das HWG nicht erfüllt ist, kann sogar ein Defizit die Folge sein. Diese Abweichung vom HWG

wurde in allen der hier untersuchten Populationen mit angemessener Stichprobengröße ( $N_c > 10$ ) tatsächlich gefunden. Die Gründe, warum das HWG abgelehnt wird können vielfältig sein. Es basiert auf Annahmen, die z.B. Futuyma (2005) aufzählt: i) zufällige Verpaarung; ii) die untersuchte Population ist unendlich groß; iii) kein Genfluss zwischen Populationen (es herrscht Panmixie); iv) keine Mutation und v) keine Selektion. Wird eine dieser Annahmen verletzt, kann dies zu Abweichungen vom HWG führen.

Eine Daphnienpopulation hat meist sehr viele Individuen mit hohen Populationsdichten. Daher kann Annahme ii) zu einem gewissen Grad bejaht werden. Wie in dieser und anderen Untersuchungen schon festgestellt wurde, herrscht auch sehr wenig Genfluss zwischen den Populationen (siehe oben), wodurch auch die Annahme iii) erfüllt ist. Annahmen, die in einer Daphnienpopulation offensichtlich nicht erfüllt sind, stellen i) und iv) dar. Wie diese Studie zeigt, gibt es Substrukturen innerhalb der Populationen (vergleiche Abschnitt 3.2.4). Dies könnte eine Folge nicht zufälliger Verpaarung sein. Auch die Heterozygotendefizite selbst könnten als Wahlund-Effekt (Wahlund 1928) interpretiert werden. Dieser kommt dadurch zustande, dass die beiden Subpopulationen unterschiedliche Allelfrequenzen haben, aber in der Analyse als eine Population betrachtet werden. Die Annahme iv), dass es keine Mutation gibt, kann bei den hohen Mutationsraten der verwendeten Mikrosatellitenmarker ebenfalls als verletzt gelten. Die fünfte Annahme des HWG, dass keine Selektion stattfindet, wird zwar in dieser Studie vorausgesetzt, da die eingesetzten Marker als neutral gelten, aber in den letzten Jahren wurde die Neutralität von Mikrosatelliten immer wieder kontrovers diskutiert (Kashi & Soller 1999 und Zitate darin, Li et al. 2002, Selkoe & Toonen 2006). Also könnten auch die Marker selbst der Selektion unterliegen, was aber hier nicht getestet wurde. Abweichungen vom HWG bei den hier untersuchten Daphnien basieren also auf Substrukturen innerhalb der Populationen, einem resultierenden Wahlund-Effekt und den verwendeten Markern (aufgrund derer hoher Mutationsraten) sowie Selektion.

Teilt man die drei Elternarten in die zwei Klassen [Taxon] + und [Taxon] ein, so zeigt ein Vergleich der Mittelwerte von  $D_c$  und  $H_o$  keine signifikanten Unterschiede. Diese Beobachtung ist kontraintuitiv, da das sympatrische Vorkommen der nah verwandten Arten und die introgressive Hybridisierung zu erhöhter Diversität führen sollte (Kim &

Rieseberg 1999, Soliva & Widmer 2003). Auch hier spielt aber vermutlich die Stichprobengröße eine entscheidende Rolle. Am Beispiel von *D. galeata* sieht man zwar den Trend, dass [Taxon]+ und [Taxon] sich eventuell doch in ihrer genetischen Diversität unterscheiden könnten, er ist aber nicht signifikant. Diese Art hat dennoch den größten Stichprobenumfang, wobei man bei Stichprobenumfängen von fünf (gal+) und acht (gal) sehr vorsichtig beim Treffen von gültigen Aussagen sein sollte. Es würde sich also lohnen, diese Berechnungen mit größeren Stichproben für die beiden Klassen zu wiederholen, um dadurch auch schwächere Unterschiede aufzudecken. Bisher scheint es, als hätte Hybridisierung keinen Effekt auf die Diversität der hier untersuchten Populationen. Weitere Analysen, die Effekte von Hybridisierung aufdecken könnten, sollten durchgeführt werden. Auch wenn die Diversität der Populationen nicht beeinflusst ist, könnten dennoch die genetischen Distanzen zwischen Populationen von Taxa, die syntop mit mindestens einer ihrer beiden Schwesterarten aus dem *D. longispina*-Artkomplex leben ([Taxon]+) und Taxa, die in ihrem Habitat keinen Kontakt zu ihren Schwesterarten haben (allopatrisch, [Taxon]), größer sein als diejenigen zwischen den [Taxon]-Populationen.

## 5 Schluss und Ausblick

Die eingesetzten Mikrosatellitenmarker sind insgesamt gut geeignet, um die drei Elternarten *D. galeata*, *D. longispina* und *D. cucullata* voneinander zu unterscheiden. Es gibt zwar einige Populationen, die eine so hohe genetische Distanz zu den anderen Populationen der selben Taxa aufweisen, dass sie im Gesamtdatensatz evtl. nicht als reine Arten erkannt werden können, aber die meisten reinen Elternarten lassen sich gut erkennen. Die Mikrosatelliten als molekulare Marker selbst haben vor allem gute Erfolge bei der Amplifizierung aus schlecht konservierten Proben gezeigt, aus denen größere Fragmente, wie das ITS-Fragment, nicht amplifiziert werden können. Es zeigt sich, dass durch die starke Hybridisierung in diesem Komplex die Arten nicht streng nach Mayr (1942) definiert werden können (biologisches Artkonzept). Dennoch bleibt die reproduktive Isolation zu einem ausreichenden Grad erhalten, so dass keine Homogenisierung des Genpools aller drei Arten stattfindet. Es ist also korrekt, in diesem Komplex von Arten zu sprechen, wenn man diese nach Wiley (1987) definiert (evolutionäres Artkonzept).

Größere Probleme bereitet die Differenzierung zwischen den verschiedenen Hybridklassen. In diesem Fall scheint vor allem die nicht zufällige Verteilung in den fehlenden Daten dies zu verursachen. Die Loci SwiD 6 und SwiD 12 müssen schon in der Methodik anders behandelt werden, damit sie ausgewertet werden können. Dies wird entweder durch einzelnes Amplifizieren oder durch Amplifizieren in unterschiedlichen Multiplex-PCRs und Poolplexes erreicht werden. Bei *D. cucullata* lässt sich der Locus Dgm 112 oft schlecht amplifizieren und er scheint dort Null-Allele zu besitzen. Dieser Locus sollte nicht verwendet werden, wenn in dem zu untersuchenden Datensatz auch *D. cucullata* oder zumindest Hybride mit *D. cucullata* erwartet werden. Zusätzlich sollten alle Arten und Hybridklassen (des untersuchten Komplexes) einer Lokalität mit in die Analysen einbezogen werden. Es kann sich mitunter als unmöglich herausstellen, sehr divergente Populationen im Gesamtdatensatz korrekt zuzuordnen. Es müssen zwar noch mehr Daten gesammelt werden, um diese Probleme zu beheben, ich schlage dennoch folgendes Vorgehen bei der Analyse eines hybridisierenden Drei-Arten-Komplexes vor:

- a) Analyse des Gesamtdatensatzes in einer PCA.
  - Zeigen sich dort drei klare *cluster*, ist es vermutlich möglich, die reinen Elternarten zu identifizieren. Dies sollte im Vergleich mit gut zu erkennenden morphologischen Merkmalen oder anderen molekularen Analyse-Techniken (in meinem Fall ITS-RFLP) einiger gut zu identifizierender Individuen möglich sein.
  
- b) Analyse des Gesamtdatensatzes in *Structure* mit  $K = 3$ .
  - Individuen, die mit hohem Anteil ihres Genoms einer der drei Gruppen zugeordnet werden (z.B. > 95%), sind reine Elternarten.
  
- c) Diese Elternarten werden in der PCA wieder gefunden und dann in drei hierarchischen Analysen durch *NewHybrids* zusammen mit putativen Hybriden überprüft.
  - Vorsicht: Bei sehr divergenten Populationen im Datensatz steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Hybridklassen falsch zugeordnet werden!
  
- d) Es sollte dann überprüft werden, inwieweit die Identifizierung im Gesamtdatensatz mit der Identifizierung nur innerhalb ausgewählter Lokalitäten übereinstimmt (es müssen mindestens beide Elternarten plus Hybride in diesen Lokalitäten analysiert werden!).
  - Im Zweifelsfall sollte über Hybridsimulationen getestet werden, welche Hybridklassen tatsächlich vorkommen.

Nachdem Elternarten und Hybride identifiziert sind, lassen sich weitere interessante Beobachtungen machen. Bei der Analyse der Differenzierung der Arten und Populationen konnte ich feststellen, dass die Populationen hochgradig differenziert sind. Die Differenzierung zwischen den Populationen in den Arten übersteigt dabei sogar leicht die Differenzierung zwischen den drei Arten. Zusätzlich wurde keine Abhängigkeit der genetischen Distanzen von den geographischen Distanzen gefunden. Dieses Phänomen ist zunächst kontraintuitiv, da sich im bekannten Modell *isolation by distance* die genetische Distanz der Individuen und Populationen mit ihrem zunehmenden Abstand zueinander erhöhen sollte. Das hier gefundene Muster entspricht

dem Provinzialismus, den Hebert & Wilson (1994) beschrieben. De Meester et al. (2002) erklären diese Phänomene mit der Monopolisierungshypothese.

Die klonale Diversität ist vergleichsweise hoch. Dies deutet darauf hin, dass die hier untersuchten zyklisch parthenogenetischen Arten zwar auch gelegentlich hohe asexuelle Vermehrung aufweisen, aber dennoch genug sexuelle Reproduktion vorkommt. Wie in anderen Untersuchungen gefunden wurde, wird hohe Klonalität vor allem durch extrinsische biotische und abiotische Faktoren beeinflusst und weniger durch intrinsische Veranlagung. Es konnten hier keine signifikanten Unterschiede in der Klonalität der Arten untereinander gefunden werden, wobei die geringe Stichprobengröße die Aussagekraft der Statistik vermutlich stark beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurden auch Analysen der Populationsstruktur unter den Gesichtspunkten des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts durchgeführt. Dort wurde festgestellt, dass die mittlere Heterozygotie bei *D. cucullata* signifikant kleiner ist als bei den anderen beiden Arten. Die Rekombinanten zeigen wie erwartet eine signifikant höhere Heterozygotie als die reinen Arten. Dass bei den meisten Populationen dennoch ein Heterozygotendefizit besteht, zeigt deutlich, die untersuchten Arten nicht obligat parthenogenetisch sind, da man sonst einen Meselson-Effekt erwarten würde, bei dem durch die Anhäufung von Mutationen ein Heterozygotenüberschuss entsteht. Auch wurde das HWG an sich praktisch immer abgelehnt, wenn die Stichprobe größer als zehn Individuen in der Population war. Gründe dafür könnten Substrukturen innerhalb der Populationen sein, die einen Wahlund-Effekt (Heterozygotendefizit, so wie in dieser Studie gefunden) zur Folge haben. Außerdem sind Mikrosatelliten durch überdurchschnittliche Mutationsraten gekennzeichnet. Es wurde zwar nicht explizit auf die Neutralität der Marker getestet, aber es existiert eine Vielzahl von Studien, in denen Selektion an Mikrosatelliten-Loci nachgewiesen werden konnte. Auch dies würde eine Verletzung der Voraussetzungen des HWG bedeuten.

Ein Einfluss der Hybridisierung auf die genetische Konstitution der Populationen in gemischten Lokalitäten [Taxon] + im Vergleich zu Populationen, die alleine in einer Lokalität vorkommen [Taxon], konnte nicht signifikant festgestellt werden. Dabei wurden die Mittelwerte von  $D_c$  und  $H_o$  von [Taxon] + und [Taxon] miteinander verglichen. Im Fall von *D. galeata* wurde aber das Signifikanzniveau des Vergleiches der Mittelwerte von  $D_c$  nur knapp verfehlt ( $p = 0,08$ ). Dies ist zumindest Indiz dafür,

dass Hybridisierung auf diese Parameter Einfluss haben könnte. Deutlich größere Stichproben werden nötig sein, um dies zu bestätigen.

Der bestehende Datensatz sollte in Zukunft vervollständigt und erweitert werden. Die hier vorgestellte Methode bietet einen guten Rahmen, um die Elternarten des *D. longispina*-Artkomplexes zu identifizieren – auch wenn Zyklomorphose und phänotypische Plastizität eine morphologische Erkennung schwierig machen. Außerdem bietet der Ansatz, diesen Artkomplex mit mehreren nukleären Markern zu untersuchen, eine Lösung für die bisherigen Schwierigkeiten eine zuverlässige Artidentifikation auf gesamteuropäischer Ebene durchzuführen. Die bisherige Methode (ITS-RFLP) ist immer noch nicht allgemein gültig. An neuen Sammelorten ist die Bestätigung, dass die ITS-RFLP-Analyse (nur ein einzelner Marker) korrekte Ergebnisse liefert, nur durch Vergleich mit einer Vielzahl (in dieser Arbeit zwölf) unabhängiger Mikrosatellitenmarker möglich. Daher müssen einige Regionen Europas noch für einige der Arten dichter abgedeckt werden. Ob die Probleme bei der Hybridklassenidentifikation weiterhin bestehen, wenn vorhandene Lücken im Datensatz aufgefüllt und detaillierte Daten über gemischte Lokalitäten vorliegen, ist schwer abzuschätzen. Ich vermute, dass eine aussagekräftige Zuordnung meist nur in Einzelanalysen innerhalb von gemischten Lokalitäten möglich ist, da die hier eingesetzten Marker im Zusammenhang mit hoher Differenzierung der Populationen innerhalb der Arten zu variabel sind. Auf die Frage, ob es Artunterschiede innerhalb des *D. longispina*-Artkomplexes in Bezug auf genetische Strukturen gibt konnte ich nicht klar beantworten. Es gibt zwar Tendenzen, aber um ein Gesamtbild zu entwerfen fehlen noch einige Populationen, die analysiert werden müssen. Wenn es Artunterschiede geben sollte, wäre es sehr interessant zu testen, welche ökologischen Parameter diese erklären.



## 6 Zusammenfassung

Daphnien sind ein wichtiger Bestandteil des Süßwasserzooplanktons und in einer Vielzahl von biologischen Disziplinen als Modellorganismus etabliert. Ihr zyklisch parthenogenetischer Lebenszyklus und die hohen Raten von interspezifischer Hybridisierung mancher Artkomplexe machen sie zu einem interessanten Forschungsobjekt. Die vorliegende Arbeit bietet Einblicke in die Populationsstruktur einer dieser Komplexe, des *D. longispina*-Artkomplexes, und testete ein neu entwickeltes Markersystem bei diesen Tieren auf gesamteuropäischer Ebene (33 Sammelorte, 1155 Individuen). Es wurden dazu molekulare Analysetechniken mit zwölf polymorphen Mikrosatelliten-Markern mit etablierten ITS-RFLP-Analysen verglichen.

Durch statistische Auswertemethoden mit den Programmen *NewHybrids* und *Structure* konnten Elternarten gut zugeordnet werden. Die Betrachtung der Kullback-Leibler Divergenzen in den Analysen durch *NewHybrids* deuten sogar darauf hin, dass die Anzahl der Mikrosatellitenmarker auf wenige besonders informative Loci reduziert werden kann, was bei Fragestellungen zur Art- und Hybrididentifizierung Zeit und Kosten spart. Ein Protokoll zur Vorgehensweise bei der Art- und Hybrididentifizierung wurde entwickelt.

Die Arten und Populationen selbst waren hoch differenziert. Zwischen den drei untersuchten Arten wurde ein  $F_{ST}$  von 0,29 gefunden. Ergebnisse aus einer AMOVA zeigten sogar, dass die Differenzierung zwischen den Populationen innerhalb der Arten leicht über dieser interspezifischen Differenzierung liegt (*D. galeata* 0,40; *D. longispina* 0,52 und *D. cucullata* 0,42). Da auch keine *isolation by distance* gefunden wurde, lassen die Ergebnisse meiner Analysen auf „Provinzialismus“ schließen – ein Konzept, das genau dieses Muster voraussagt. Erklärt wird dieser Provinzialismus durch die Monopolisierungshypothese. Die Beobachtung, dass in der Regel in den untersuchten Populationen ein Heterozygotendefizit vorliegt, obwohl klonale Vermehrung oft zu einem Heterozygotenüberschuss führt (Meselson-Effekt), zeigt häufig vorkommende sexuelle Vermehrung an. Das Heterozygotendefizit deutet ebenfalls auf einen Wahlund-Effekt hin.

Es wurde weiterhin getestet, ob das Vorkommen von introgressiver, interspezifischer Hybridisierung in bestimmten Lokalitäten im Vergleich mit Lokalitäten, in denen ein Taxon allopatrisch lebt, einen Einfluss auf die Populationsstruktur hat. Die klonale Diversität sowie die beobachtete Heterozygotie standen dabei im Mittelpunkt der Analysen. Es wurde kein statistisch signifikanter Einfluss der Hybridisierung auf die Diversität gefunden.

## 7 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Betreuer PD dr Klaus Schwenk danken, dass er mich so großartig unterstützt hat. Er stellte mir sein kombiniertes Wissen über Analysemethoden, Theorie und Praxis sowie eine exzellente Infrastruktur in der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Außerdem danke ich auch Herrn Prof. Dr. Bruno Streit, der durch den Stil, in dem er seine Arbeitsgruppe leitet, die Bedingungen für interessante und konkurrenzfähige Forschung schafft.

Ganz speziell möchte ich auch Anne Thielsch danken, die mich nicht nur in die molekulare Arbeitsweise der Daphniengenetik eingeführt hat, sondern auch jederzeit bei der praktischen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterer Dank geht an das „Team“ der evolutionären Ökologie. Nora Brede, Christian Claßen, Katja Heubach, Kerstin Kuhn und Moritz Salinger, die sich mit mir den Raum teilten. Vor allem danke ich auch Moritz Salinger und Christian Claßen für sinnfreie Diskussionen und erfolgreiche Schlachten in pararealen Umgebungen. Joao Barateiro, Mathilde Cordellier, Ruth Jesse, Carsten Nowak und Markus Pfenninger schufen auch außerhalb „meines Raumes“ eine äußerst angenehme Atmosphäre und boten Gelegenheit zum wissenschaftlichen und privaten Austausch.

Nicht zu vergessen sind Holger Geupel, Elke Völker und Eva Wörner, die technischen Assistenten. Ohne sie wäre effizientes Arbeiten im Labor überhaupt nicht möglich. Dies gilt auch für Melanie Lebschy, die sich um die Bürokratie kümmert und nie zu wenig Auswahl hat an Stiften, Papier, Lochern, Tackern, Kleber, Briefumschlägen, Scheren, Tonern, .....

Viel Freude bereitet hat mir auch die Arbeit mit unseren Gästen Adam Petrussek, Stepanka Rutova (beide Tschechische Republik) und Judit Nedli (Ungarn) und den Praktikanten, die mehr oder weniger direkt in mein Projekt eingebunden waren: Leo Leitner, Larissa Schroer (beide maßgeblich beteiligt an den Daten zu FR-BB) und Heike Althen (12S-Sequenzierung einiger meiner Proben).

Natürlich wäre das ganze Projekt nicht möglich ohne die Mitarbeit der wissenschaftlichen Gemeinschaft. Durch die unerwartet große Resonanz auf meine Anfrage an Limnologen/Ökologen in ganz Europa konnte ich so viele Proben bekommen, dass sie kaum alle analysiert werden können. Den Personen, von denen ich Proben erhalten habe (auch wenn nicht alle der Proben bisher in das Projekt eingearbeitet sind), danke ich hier: Kestudis Arbasciauskas, Anton Brancelj, Tomek Brezinski, Nora Brede, Bruno Castro, Piotr Dawidiwicz, Arni Einarsson, Aders Hobaek, Martina Hudcovicova, Ken Irvine, Jennifer Johnson, Paavo Junttila, Federico Marrone, Judit Nedli, Aleksandar Ostojic, Joana Pereira, Adam Petrussek, Stepanka Ruthova, Rory Sanderson, Klaus Schwenk, Tatjana Simcic, Anne Thielsch und Isabelle Thys.

Auch außerhalb der Uni haben mich die Menschen in meiner Arbeit unterstützt und dabei durch Ablenkung und Übernahme von vielfältigen Aufgaben zu meinem Erfolg beigetragen. Es sind die Mitglieder, vor allem die Kinder, der Badmintonabteilungen des RV Hoch-Weisel und des Usinger TSG, die mir immer wieder gezeigt haben, wofür es sich auch außerhalb meines kleinen wissenschaftlichen Dunstkreises zu arbeiten lohnt. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Firma Adam Hall GmbH, besonders dem Lager-Team, dass sie mich in der Endphase des Studiums so flexibel und eigenverantwortlich haben arbeiten lassen. Die finanzielle Basis konnte ich so trotz des komplizierten Zeit-Managements durch den Uni-Alltag sichern. Es war mir ein Vergnügen.

Last but not Least, danke ich Anika, meiner Frau, und Anna, meiner Tochter, dass sie mich nicht vor die Tür gesetzt haben. Ich weiß, das Studium war keine einfache Zeit. Doch es ist der richtige Weg. Natürlich danke ich auch meinen Eltern, die ich ebenfalls fahrlässig vernachlässigt habe in den letzten Monaten und Jahren. Es ist gut zu wissen, dass es immer – egal wie sich die Lage darstellt – eine Option gibt.

## 8 Literaturverzeichnis

- Anderson, E. 1953. Introgressive hybridization. *Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society* **28**:280-307.
- Anderson, E. C. 2002. A user's guide to the GLUT for markov monte carlo graphical interface. Version 1.0.
- Anderson, E. C. 2003. User's guide to the program NewHybrids. Version 1.1 beta.
- Anderson, E. C., and E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**:1217-1229.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, New York.
- Balloux, F., and N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**:155-165.
- Banta, A. M. 1939. *Studies on the physiology, genetics and evolution of some Cladocera*. Carnegie Institution of Washington, Washington D. C.
- Banta, A. M., and L. A. Brown. 1929. Control of sex in Cladocera. I. Crowding of mothers as a means of controlling male production. *Physiological Zoology* **2**:80-92.
- Barton, N. H., and G. M. Hewitt. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review Of Ecology And Systematics* **16**:113-148.
- Baum, D. A., and K. L. Shaw. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. Pages 289-303 in P. C. Hoch and A. G. Stephenson, editors. *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO.
- Bell, G. 1982. *The masterpiece of nature: The evolution of genetics and sexuality*. Croom-Helm, London.
- Benzie, J. A. H. 1986. Phenetic and cladistic analyses of the phylogenetic relationships within the genus *Daphnia* worldwide. *Hydrobiologia* **140**:105-124.
- Benzie, J. A. H. 2005. *Cladocera: The genus Daphnia (including Daphniopsis)*. in H. J. F. Dumont, editor. *Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world*. Kenobi Productions, Ghent.
- Bernatchez, L., and C. C. Wilson. 1998. Comparative phylogeography of nearctic and palearctic fishes. *Molecular Ecology* **7**:431-452.
- Billiones, R., M. Brehm, J. Klee, and K. Schwenk. 2004. Genetic identification of *Hyalodaphnia* species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia* **526**:43-53.

- Birchler, J. A., D. L. Auger, and N. C. Riddle. 2003. In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell* **15**:2236-2239.
- Birky, C. W. 1996. Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics* **144**:427-437.
- Brede, N., C. Sandrock, D. Straile, P. Spaak, T. Jankowski, B. Streit, and K. Schwenk. 2007. The genetic legacy of lake eutrophication. *Science*, eingereicht.
- Brede, N., A. Thielsch, C. Sandrock, P. Spaak, B. Keller, B. Streit, and K. Schwenk. 2006. Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* **6**:536-539.
- Brendonck, L., and B. J. Riddoch. 1999. Wind-borne short-range egg dispersal in anostracans (Crustacea: Branchiopoda). *Biological Journal Of The Linnean Society* **67**:87-95.
- Brewer, M. C. 1998. Mating behaviours of *Daphnia pulicaria*, a cyclic parthenogen: comparisons with copepods. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **353**:805-815.
- Brohede, J., A. P. Moller, and H. Ellegren. 2004. Individual variation in microsatellite mutation rate in barn swallows. *Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis* **545**:73-80.
- Brooks, J. L. 1957. The Systematics of North American *Daphnia*. *Memorials of Connecticut Academical Arts and Sciences* **13**:1-180.
- Butlin, R. K. 2000. Virgin rotifers. *Trends In Ecology & Evolution* **15**:389-390.
- Chistiakov, D. A., B. Hellemans, and F. A. M. Volckaert. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* **255**:1-29.
- Claßen, C. 2007. Vergleich der Taxon- und Klonzusammensetzung von rezenten und subfossilen *Daphnia*-Populationen des Bodensees und des Greifensees. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Colbourne, J. K., and P. D. N. Hebert. 1996. The systematics of North American *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda): A molecular phylogenetic approach. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **351**:349-360.
- Colbourne, J. K., B. Robison, K. Bogart, and M. Lynch. 2004. Five hundred and twenty-eight microsatellite markers for ecological genomic investigations using *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* **4**:485-490.
- Conner, J. K., and D. L. Hartl. 2004. A primer of ecological genetics. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

- Coyne, J. A., and H. A. Orr. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. Pages 29-59 in D. Otte and J. A. Endler, editors. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Dallas, J. F. 1992. Estimation of microsatellite mutation-rates In recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* **3**:452-456.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection. J. Murray, London.
- De Gelas, K., and L. De Meester. 2005. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe. *Molecular Ecology* **14**:753-764.
- De Meester, L. 1996. Local genetic differentiation and adaptation in freshwater zooplankton populations: Patterns and processes. *Ecoscience* **3**:385-399.
- De Meester, L., A. Gomez, B. Okamura, and K. Schwenk. 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica-International Journal Of Ecology* **23**:121-135.
- de Queiroz, K., and M. J. Donoghue. 1990. Phylogenetic systematics or Nelson's version of cladistics? *Cladistics* **6**:61-75.
- Dirienzo, A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1994. Mutational Processes Of Simple-Sequence Repeat Loci In Human-Populations. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **91**:3166-3170.
- Dirienzo, A., R. Thomas, A. C. Peterson, A. M. Valdes, C. Garza, M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1993. Mutations At Simple Sequence Repeats In Human-Populations. *American Journal Of Human Genetics* **53**:792-792.
- Dufresne, F., and P. D. N. Hebert. 1995. Polyploidy and clonal diversity in an arctic Cladoceran. *Heredity* **75**:45-53.
- Ender, A., K. Schwenk, T. Stadler, B. Streit, and B. Schierwater. 1996. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Molecular Ecology* **5**:437-441.
- Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* **131**:479-491.
- Falush, D., M. Stephens, and J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**:1567-1587.

- Fernando, C. H. 2002. A guide to tropical freshwater zooplankton. Pages 291 pp. in C. H. Fernando, editor. A guide to tropical freshwater zooplankton. Backhuys Publishers, Leiden.
- Figuerola, J., and A. J. Green. 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology* **47**:483-494.
- Flößner, D. 2000. Die Haplopoda und Cladocera (ohne Bosminidae) Mitteleuropas. Backhuys Publishers, Leiden.
- Fox, J. A. 2004. New microsatellite primers for *Daphnia galeata mendotae*. *Molecular Ecology Notes* **4**:544-546.
- Frank, P. W. 1952. A laboratory study of intraspecies and interspecies competition in *Daphnia pulicaria* (Forbes) and *Simocephalus vetulus* Müller, O.F. *Physiological Zoology* **25**:178-204.
- Frank, P. W. 1957. Coactions in laboratory populations of 2 species of *Daphnia*. *Ecology* **38**:510-519.
- Futuyma, D. J. 2005. *Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Gießler, S. 1997. Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme, phenotype and morphology. *Journal Of Evolutionary Biology* **10**:87-105.
- Giessler, S., E. Mader, and K. Schwenk. 1999. Morphological evolution and genetic differentiation in *Daphnia* species complexes. *Journal Of Evolutionary Biology* **12**:710-723.
- Glagolev, S. M. 1986. Species composition of *Daphnia* in Lake Glubokoe with notes on the taxonomy and geographical distribution of some species. *Hydrobiologia* **141**:55-82.
- Goldstein, D. B., and C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Guo, S. W., and E. A. Thompson. 1992. Performing the exact Test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**:361-372.
- Haldane, J. B. S. 1954. An exact test for randomness of mating. *Journal Of Genetics* **52**:631-635.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*, 3rd edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Havel, J. E., and J. B. Shurin. 2004. Mechanisms, effects, and scales of dispersal in freshwater zooplankton. *Limnology And Oceanography* **49**:1229-1238.



- Hebert, P. D. N. 1978. Population Biology Of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society* **53**:387-426.
- Hebert, P. D. N., and C. C. Wilson. 1994. Provincialism in plankton - endemism and allopatric speciation in Australian *Daphnia*. *Evolution* **48**:1333-1349.
- Hebert, P. D. N., J. D. S. Witt, and S. J. Adamowicz. 2003. Phylogeographical patterning in *Daphnia ambigua*: Regional divergence and intercontinental cohesion. *Limnology And Oceanography* **48**:261-268.
- Heubach, K. 2006. Saisonale Populationsdynamik eines *Daphnia*-Artenkomplexes: Genetik und Life-history-Variation. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Hobaek, A., and P. Larsson. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology* **71**:2255-2268.
- Hobaek, A., M. Skage, and K. Schwenk. 2004. *Daphnia galeata* x *D. longispina* hybrids in western Norway. *Hydrobiologia* **526**:55-62.
- Huff, D. R., R. Peakall, and P. E. Smouse. 1993. RAPD variation within and among natural-populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm]. *Theoretical And Applied Genetics* **86**:927-934.
- Hughes, R. N. 1989. A functional biology of clonal animals. Chapman & Hall, London.
- Hurst, G. D. D., and J. H. Werren. 2001. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics* **2**:597-606.
- Hutchinson, G. E. 1967. A treatise on Limnology. Vol. 2. Wiley, New York.
- ISO3166. 2007. ISO 3166 Maintenance agency. International Organization for Standardization.
- Jankowski, T., and D. Straile. 2004. Allochronic differentiation among *Daphnia* species, hybrids and backcrosses: the importance of sexual reproduction for population dynamics and genetic architecture. *Journal Of Evolutionary Biology* **17**:312-321.
- Judson, O. P., and B. B. Normark. 1996. Ancient asexual scandals. *Trends In Ecology & Evolution* **11**:A41-A46.
- Kashi, Y., and M. Soller. 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. Pages 10–23 in D. B. Goldstein and C. Schlotterer, editors. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Kim, S. C., and L. H. Rieseberg. 1999. Genetic architecture of species differences in annual sunflowers: Implications for adaptive trait introgression. *Genetics* **153**:965-977.

- Kimura, M., and J. F. Crow. 1964. Number of alleles that can be maintained in finite population. *Genetics* **49**:725-&.
- Kimura, M., and T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **75**:2868-2872.
- Kleiven, O. T., P. Larsson, and A. Hobaek. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires 3 stimuli. *Oikos* **65**:197-206.
- Kullback, S., and R. A. Leibler. 1951. On information and sufficiency. *Annals Of Mathematical Statistics* **22**:79-86.
- Lancaster, M. L., N. J. Gemmell, S. Negro, S. Goldsworthy, and P. Sunnucks. 2006. Menage a trois on Macquarie Island: hybridization among three species of fur seal (*Arctocephalus spp.*) following historical population extinction. *Molecular Ecology* **15**:3681-3692.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, and E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**:2453-2465.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae*, 10<sup>th</sup> edition, volume 1, Holmiae, Salvii.
- Lyell, C. 1832. *Principles of Geology*. Vol. 2. John Murray, London.
- Lynch, M., and B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic-structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**:91-99.
- Lynch, M., and K. Spitze. 1994. Evolutionary genetics of *Daphnia*. Pages 109-128 in L. Real, editor. *Ecological genetics*. Princeton University Press, Princeton.
- Maguire, T. L., R. Peakall, and P. Saenger. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical And Applied Genetics* **104**:388-398.
- Makarenkov, V., and P. Legendre. 2004. From a phylogenetic tree to a reticulated network. *Journal Of Computational Biology* **11**:195-212.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends In Ecology & Evolution* **20**:229-237.
- Mantel, N. 1967. Detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**:209-&.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of Species*. Columbia University Press, New York.

- Meier, N. 2006. Die Bedeutung von Nahrungsqualität und -quantität für die Fitness und Hybridisierung bei *Daphnia*. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Moore, W. S. 1977. Evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review Of Biology* **52**:263-277.
- Moret, B. M. E., L. Nakhleh, T. Warnow, C. R. Linder, A. Tholse, A. Padolina, J. Sun, and R. Timme. 2004. Phylogenetic networks: Modeling, reconstructibility, and accuracy. *Ieee-Acm Transactions On Computational Biology And Bioinformatioecs* **1**:13-23.
- Müller, J., and A. Seitz. 1995. Differences in genetic-structure and ecological diversity between parental forms and hybrids in a *Daphnia* species complex. *Hydrobiologia* **307**:25-32.
- Myers, P., R. Espinosa, C. S. Parr, T. Jones, G. S. Hammond, and T. A. Dewey. 2006. The Animal Diversity Web (online). Accessed April 02, 2007 at <http://animaldiversity.org>.
- Nielsen, E. E., L. A. Bach, and P. Kotlicki. 2007. HYBRIDLAB (version 1.0): A program for generating simulated hybrids from population samples. *in*.
- Orloci, L. 1978. Multivariate analysis in vegetation research. The Hague: Dr W. Junk B. V.
- Paetkau, D., and C. Strobeck. 1995. The Molecular-Basis And Evolutionary History Of A Microsatellite Null Allele In Bears. *Molecular Ecology* **4**:519-520.
- Paterson, E. H. E. 1985. The recognition concept of species. Pages 21-29 *in* E. S. Vrba, editor. Species and Speciation. Transvaal Museum Monograph No. 4, Pretoria, South Africa.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2006a. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**:288-295.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2006b. GenAIEx Guide - Appendix 1 - Methods and Statistics in GenAIEx 6.
- Peakall, R., P. E. Smouse, and D. R. Huff. 1995. Evolutionary Implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* **4**:135-147.
- Petrunkévitch, A. 1905. Natural and artificial parthenogenesis. *American Naturalist* **39**:65-76.
- Petrusek, A., F. Bastiansen, and K. Schwenk. 2005. European *Daphnia* Species (EDS) - Taxonomic and genetic keys. [Build 2006-01-12 beta]. CD-ROM, distributed by the authors.

- Petrusek, A., A. Hobaek, J. P. Nilssen, M. Skage, M. Czerny, N. Brede, and K. Schwenk. 2007. A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex. *Limnology and Oceanography*, eingereicht.
- Platt, T., and K. Spitze. 2000. Genetic variation in a subtropical population of *Daphnia*. *Hydrobiologia* **435**:191-196.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Pritchard, J. K., and W. Wen. 2004. Documentation for *structure* software: Version 2.
- Proctor, V. W. 1964. Viability Of Crustacean Eggs Recovered From Ducks. *Ecology* **45**:656-&.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. Genepop (Version-1.2) - population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Of Heredity* **86**:248-249.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
- Sandrock, C. 2005. Rekonstruktion evolutionsgenetischer Prozesse bei *Daphnia* während des letzten Jahrhunderts im Greifensee - Introgressive Hybridisierung in Abhängigkeit von anthropogen verursachten Umweltveränderungen. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Schlötterer, C., R. Ritter, B. Harr, and G. Brem. 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology And Evolution* **15**:1269-1274.
- Schug, M. D., C. M. Hutter, K. A. Wetterstrand, M. S. Gaudette, T. F. C. Mackay, and C. F. Aquadro. 1998. The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology And Evolution* **15**:1751-1760.
- Schug, M. D., T. F. C. Mackay, and C. F. Aquadro. 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* **15**:99-102.
- Schwenk, K. 1993. Interspecific hybridization in *Daphnia* - distinction and origin of hybrid matriline. *Molecular Biology And Evolution* **10**:1289-1302.
- Schwenk, K., M. Bijl, and S. B. J. Menken. 2001. Experimental interspecific hybridization in *Daphnia*. *Hydrobiologia* **442**:67-73.
- Schwenk, K., D. Posada, and P. D. N. Hebert. 2000. Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **267**:1833-1842.

- Schwenk, K., A. Sand, M. Boersma, M. Brehm, E. Mader, D. Offerhaus, and P. Spaak. 1998. Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the Cladocera. *Aquatic Ecology* **32**:37-51.
- Schwenk, K., and P. Spaak. 1995. Evolutionary and ecological consequences of interspecific hybridization in cladocerans. *Experientia* **51**:465-481.
- Schwenk, K., and P. Spaak. 1997. Ecology and genetics of interspecific hybridization in *Daphnia*. Pages 119-229 in B. Streit, T. Städler, and C. M. Lively, editors. *Evolutionary Ecology of Freshwater Animals*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Selkoe, K. A., and R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**:615-629.
- Sites, J. W., and J. C. Marshall. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends In Ecology & Evolution* **18**:462-470.
- Skage, M., A. Hobaek, S. Ruthová, B. Keller, A. Petrušek, J. Sed'a, and P. Spaak. 2007. Intragenomic sequence variation necessitates a new genetic method to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. *Hydrobiologia*, im Druck.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**:457-462.
- Slobodkin, L. B. 1954. Population dynamics in *Daphnia obtusa* Kurz. *Ecological Monographs* **24**:69-88.
- Small, L. F. 1962. Use of radioisotopes in laboratory energy assimilation investigations with *Daphnia*. *Nature* **196**:787-&.
- Smouse, P. E., and J. C. Long. 1992. Matrix correlation-analysis in anthropology and genetics. *Yearbook Of Physical Anthropology* **35**:187-213.
- Smouse, P. E., J. C. Long, and R. R. Sokal. 1986. Multiple-regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* **35**:627-632.
- Soliva, M., and A. Widmer. 2003. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* **57**:2252-2261.
- Spaak, P. 1996. Temporal changes in the genetic structure of the *Daphnia* species complex in Tjeukemeer, with evidence for backcrossing. *Heredity* **76**:539-548.
- Spaak, P., and J. R. Hoekstra. 1995. Life-History variation and the coexistence of a *Daphnia* hybrid with its parental species. *Ecology* **76**:553-564.
- Stark, J. D., and J. E. Banks. 2003. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annual Review Of Entomology* **48**:505-519.

- Symonds, V. V., and A. M. Lloyd. 2004. A simple and inexpensive method for producing fluorescently labelled size standard. *Molecular Ecology Notes* **4**:768-771.
- Taylor, D. J., and P. D. N. Hebert. 1992. *Daphnia galeata mendotae* as a cryptic species complex with interspecific hybrids. *Limnology And Oceanography* **37**:658-665.
- Taylor, D. J., H. L. Sprenger, and S. Ishida. 2005. Geographic and phylogenetic evidence for dispersed nuclear introgression in a daphniid with sexual propagules. *Molecular Ecology* **14**:525-537.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. Pages 3-27 in D. Otte and A. Ender, editors. *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Thielsch, A. 2005. Molekulare Systematik und Populationsgenetik des europäischen *Daphnia rosea/hyalina*-Komplexes. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.
- Thielsch, A., R. H. Kraus, and K. Schwenk. 2007. Decade Project: Mutation rates of microsatellite loci in clonal lineages of *Daphnia sp.* in Vorbereitung.
- Vähä, J. P., and C. R. Primmer. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* **15**:63-72.
- Valdes, A. M., M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci - the stepwise mutation model revisited. *Genetics* **133**:737-749.
- Vazquez, J. F., T. Perez, J. Albornoz, and A. Dominguez. 2000. Estimation of microsatellite mutation rates in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research* **76**:323-326.
- Vrijenhoek, R. C. 1989. Clonal organisms and the benefits of sex. Pages 151-172 in G. R. Carvalho, editor. *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press, Amsterdam.
- Wahlund, S. 1928. Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* **11**:65-106.
- Weir, B. S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Welch, D. B. M., and M. S. Meselson. 2001. Rates of nucleotide substitution in sexual and anciently asexual rotifers. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **98**:6720-6724.
- Wesenburg-Lund, C. 1908. *Plankton investigations of the danish lakes*. Gyldenalske Boghandel, Copenhagen.

- Wesenburg-Lund, C. 1926. Contributions to the biology and morphology of the genus *Daphnia* with some remarks on heredity. (K.) Danske Videnskabernes selskab Biol. Skrifter **11**:89-251.
- Wiley, E. O. 1978. Evolutionary species concept reconsidered. Systematic Zoology **27**:17-26.
- Williams, G. C. 1975. Sex and Evolution. Princeton University Press, Princeton.
- Winsor, G. L., and D. J. Innes. 2002. Sexual reproduction in *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera): observations on male mating behaviour and avoidance of inbreeding. Freshwater Biology **47**:441-450.
- Wolf, D. E., N. Takebayashi, and L. H. Rieseberg. 2001. Predicting the risk of extinction through hybridization. Conservation Biology **15**:1039-1053.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. Genetics **28**:114-138.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals Of Eugenics **15**:323-354.
- Wright, T. F., P. M. Johns, J. R. Walters, A. P. Lerner, J. G. Swallow, and G. S. Wilkinson. 2004. Microsatellite variation among divergent populations of stalk-eyed flies, genus *Cyrtodiopsis*. Genetical Research **84**:27-40.
- Zaffagnini, F. 1987. Reproduction in *Daphnia*. Memorie Dell 'Istituto Italiano di Idrobiologia **45**:245-284.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*	auf dem 0,05%-Niveau signifikant
**	auf dem 0,01%-Niveau signifikant
***	auf dem 0,001%-Niveau signifikant
???	nicht zugeordnet
[°C]	[Grad Celsius]
[μl]	[Mikroliter]
[μM]	[Mikromolar]
[μS]	[Mikrosiemens]
[kV]	[Kilovolt]
[M]	[Molar]
[mg]	[Milligramm]
[min]	[Minuten]
[ml]	[Milliliter]
[mM]	[Millimolar]
[sec]	[Sekunden]
[V]	[Volt]
<	kleiner als
=	ist gleich
>	größer als
≤	kleiner oder gleich
♀	weiblich
♂	männlich
Abb.	Abbildung
AL	Aliakmona
AMOVA	analysis of molecular variance
AT-MS	Mondsee, Österreich
B	St. Bernard
BA	Badajoz
BB	Etang de Bellebouche
BO	Bodensee
bp	Basenpaare
BR	Brno
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Bx [Taxon]	Rückkreuzungshybrid in Richtung der Elternart [Taxon]
bzw.	beziehungsweise
c x g	Hybrid zwischen <i>D. cucullata</i> und <i>D. galeata</i>
c x l	Hybrid zwischen <i>D. cucullata</i> und <i>D. longispina</i>
CB	Castelo do Bode
CH-B	St. Bernard, Schweiz
CO	Cogollo
Corp.	<i>corporation</i> (Körperschaft)
cuc	<i>Daphnia cucullata</i>
CZ-BR	Brno, Tschechische Republik
CZ-RM	Rimov, Tschechische Republik
CZ-VR	Vranov Reservoir, Tschechische Republik
<i>D.</i>	<i>Daphnia</i>
D <sub>c</sub>	klonale Diversität (K/I)
DE-BO	Bodensee, Deutschland



DE-IS	Ismaning, Deutschland
DE-SS	Stechlinsee, Deutschland
DE-UHW	Usingen, Hattstein Weiher, Deutschland
DH	Delfste Houd
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxy-Nukleotidtriphosphate
dr	Doktor
DR	Drabuzis
ES	Esch-sur-Sûre
FI-PY	Pyhajarvi, Finnland
FR-BB	Etang de Bellebouche, Frankreich
g x l	Hybrid aus <i>D. galeata</i> und <i>D. longispina</i>
gal	<i>Daphnia galeata</i>
GB	Göteborg
gg.	gegen
GL	Glubokoe
GOK	Goksjo
GR-AL	Aliakmona, Griechenland
GRO	Groningen
H <sub>def.</sub>	Heterozygotendefizit
H <sub>E</sub>	erwartete Heterozygotie ( <i>expected heterozygosity</i> )
H <sub>O</sub>	beobachtete Heterozygotie ( <i>observed heterozygosity</i> )
HU-KB	Kis-Balaton, Ungarn
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
I	Anzahl der Individuen einer Population
IAM	<i>infinite allele model</i> (unendliches Allelmodell)
IS	Ismaning
IS-MY	Myvatn, Island
IT-PDA	Piana Degli Albanesi, Italien (Sizilien)
IT-PI	Piano, Italien
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
k	Anzahl der simulierten Gruppen im Programm <i>Structure</i>
KB	Kis-Balaton
LABCLONE	Laborklon
longi	<i>Daphnia longispina</i>
LT-DR	Drabuzis, Litauen
LU-ES	Esch-sur-Sûre, Luxemburg
M	Mikolajkie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MLG	Multilocus-Genotyp
MLGs	Multilocus-Genotypen
MS	Mondsee
MY	Myvatn
N	Anzahl
N <sub>c</sub>	Anzahl der Klone (=Anzahl der MLGs)
NFV	Nordfjordvatn
N <sub>i</sub>	Anzahl der Individuen
NJ	Nizne Jamnicke
NL-DH	Delfste Houd, Niederlande
NL-GRO	Groningen, Niederlande

NO-GOK	Goksjo, Norwegen
NO-NFV	Nordfjordvatn, Norwegen
NO-SV	Storveatn, Norwegen
$N_p$	Anzahl der Populationen
PCA	<i>principal component analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PD	Privatdozent
PDA	Piana Degli Albanesi
PI	Piano
PL-M	Mikolajkie, Polen
Prof.	Professor
PT-CB	Castelo do Bode, Portugal
PT-V	Vela, Portugal
PY	Pyhajarvi
rek.	rekombinant
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RM	Rimov
RU-GL	Glubokoe, Russland
s.l.	<i>strictu latu</i> , im weiteren Sinne
s.s.	<i>strictu sensu</i> , im engeren Sinne
SAT	Satanie
sd	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SE-GB	Göteborg, Schweden
SK-NJ	Nizne Jamnicke, Slowakei
SK-SAT	Satanie, Slowakei
SMM	<i>stepwise mutation model</i> (schrittweises Mutationsmodell)
SP-BA	Badajoz, Spanien
SP-CO	Cogollo, Spanien
SP-ZH	Zahillo, Spanien
SS	Stechlinsee
SV	Storveatn
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UHW	Usingen, Hattstein Weiher
V	Vela
VR	Vranov Reservoir
z.B.	zum Beispiel
ZH	Zahillo

## 10 Anlagen

Auf der beigefügten DVD befinden sich (soweit verfügbar)

- die Rohdaten meiner Mikrosatellitenanalysen und diejenigen anderer Personen, die ich in meiner Arbeit nutzen durfte
- diverse Dateien, die die Ergebnisse der Analysen enthalten
- digitale Photographien von fünf Daphnien aus den Lokalitäten
- digitale Photographien der ITS-RFLP-Gele
- die vorliegende Arbeit in digitaler Form (.pdf-Format)

## 11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit,  
dass ich die Diplomarbeit selbstständig verfasst  
und keine anderen als  
die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Niddatal, den 23. April 2007

Robert H. Kraus