

**Molekularbiologische Untersuchungen einer  
*Daphnia*-Population im Belauer See:  
Entstehung, Einfluß und Entwicklung der Dauereibank**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Petra Limburg

**Max-Planck-Institut für Limnologie**  
Plön 2000

*Für Magret und Arnold Limburg*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Der Untersuchungsorganismus <i>Daphnia</i>	7
2.2	Probenahmen	8
2.2.1	Das Untersuchungsgewässer	8
2.2.2	Probenahmen von Daphnien aus dem Pelagial	9
2.2.3	Probenahmen von Dauereiern aus dem Sediment	10
2.2.3.1	Probenahme von rezenten Dauereiern	10
2.2.3.2	Probenahme von alten Dauereiern	12
2.2.4	Probenahmen von Dauereiern aus dem Spülsaum	13
2.3	Populationsdynamische Parameter	13
2.3.1	Abundanzen von Dauereiern im Sediment	13
2.3.1.1	Abundanzen von rezenten Dauereiern	13
2.3.1.2	Abundanzen von älteren Dauereiern	15
2.3.2	Schwimmfähigkeit von Ehippien	15
2.3.3	Schlüpfbarkeit von Dauereiern	15
2.4	Genetische Analyse	17
2.4.1	Probenvorbereitung und DNA-Isolierung	17
2.4.2	Charakterisierung der genetischen Struktur von Daphnien	20
2.4.2.1	Amplifikation von DNA-Sequenzen	20
2.4.2.2	Mikrosatelliten-Analyse	23
2.4.2.3	Analyse mitochondrieller rDNA	27
2.4.2.4	Aufreinigung der mitochondriellen PCR-Produkte und Sequenzierung	31
2.4.2.5	Allozym-Analyse	32
2.5	Datenanalyse	34
2.5.1	Genetische Variation	34
2.5.2	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)	35
2.5.3	Test auf Genkopplung (Linkage Equilibrium)	36
2.5.4	Simpson Index	37
2.5.5	Exakter Test zur Populationsdifferenzierung	38
2.5.6	Genetische Distanz und Konstruktion genetischer Bäume	38
2.5.7	Wright's F-Statistik	40
2.5.8	Multivariate Statistik	40
2.5.8.1	Prinzipielle-Komponenten-Analyse (PCA)	41
2.5.8.2	Multidimensionales-Skalieren (MDS)	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Auswahl und Etablierung der genetischen Methoden	42
3.1.1	Methode zur Bestimmung der Haplotypen	42
3.1.1.1	SSCP-Analyse mit fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten	43
3.1.1.2	SSCP-Analyse mit radioaktiven Isotopen	46
3.1.1.3	SSCP-Analyse nach einer Silberfärbung	47
3.1.2	Mikrosatelliten-Analyse zur Bestimmung der klonalen Struktur	48
3.1.2.1	Auswahl von Mikrosatelliten-Primern	48
3.1.2.2	Optimierung der Mikrosatelliten-Analyse	54
3.1.2.3	Einfluß des Probenumfangs auf die Genauigkeit der genetischen Analyse	55
3.1.2.4	Vergleich von Allozym- und Mikrosatelliten-Analyse	56

<b>3.2</b>	<b>Saisonale Entwicklung der genetischen Struktur von <i>Daphnia</i> im Belauer See</b>	<b>60</b>
3.2.1	Unterteilung der saisonalen Entwicklung anhand der abiotischen Parameter im Belauer See	60
3.2.2	Saisonale Entwicklung der genetischen Variation der Daphnien im Belauer See	61
3.2.3	Saisonale Entwicklung der Mikrosatelliten-Allelfrequenzen	65
3.2.4	Saisonale Entwicklung der Populationsstruktur	68
<b>3.3</b>	<b>Die Populationsstruktur von Daphnien während der Phase der sexuellen Reproduktion</b>	<b>72</b>
3.3.1	Populationsstruktur von <i>D. galeata</i> im Mai '99	72
3.3.1.1	Anteil der treibenden Ehippien	72
3.3.1.2	Genetische Variation bei <i>D. galeata</i>	73
3.3.1.3	Einfluß der sexuellen Reproduktion auf die Heterozygotität	74
3.3.1.4	Klonale Zusammensetzung in der <i>D. galeata</i> -Population	75
3.3.1.5	Genetische Differenzierung innerhalb der Population	76
3.3.2	Populationsstruktur von <i>D. hyalina</i> im Herbst '99	77
3.3.2.1	Genetische Variation bei <i>D. hyalina</i>	77
3.3.2.2	Einfluß der sexuellen Reproduktion auf die Heterozygotität	78
3.3.2.3	Klonale Zusammensetzung in der <i>D. hyalina</i> -Population	80
3.3.2.4	Genetische Differenzierung innerhalb der Population	81
3.3.2.5	Entwicklung der Populationsstruktur im Herbst	83
<b>3.4</b>	<b>Dauereier im Sediment und im Spülsaum</b>	<b>87</b>
3.4.1	Abundanzen von Dauereiern im Sediment	87
3.4.2	Gleichmäßigkeit der Verteilung der Dauereier im Sediment	88
3.4.3	Schlüpferfolg von <i>Daphnia</i> -Dauereiern	90
3.4.3.1	Schlüpferfolg von <i>Daphnia</i> -Dauereiern aus dem Sediment ohne Sediment-Überschichtung	90
3.4.3.2	Schlüpferfolg von <i>Daphnia</i> -Dauereiern aus dem Sediment mit Sediment-Überschichtung	91
3.4.3.3	Schlüpferfolg von <i>Daphnia</i> -Dauereiern aus dem Spülsaum	93
3.4.4	Vergleich der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien	94
3.4.4.1	Taxonomische Zusammensetzung der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien	94
3.4.4.2	Genetische Variation der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien	95
3.4.4.3	Klonale Zusammensetzung der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien	96
<b>3.5</b>	<b>Paläolimnologische Ergebnisse</b>	<b>99</b>
3.5.1	Abundanzen von älteren Dauereiern	99
3.5.2	Genetische Variation von älteren Dauereiern im Sediment	100
3.5.3	Vergleich der Allelfrequenzen von älteren und jüngeren Dauereiern	101
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>103</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodendiskussion</b>	<b>103</b>
4.1.1	Bestimmung der maternalen Linien	103
4.1.2	Bestimmung der klonalen Struktur	106
4.1.3	Einfluß des Probenumfangs auf die Genauigkeit der genetischen Analyse	109
4.1.4	Vergleich von Allozym- und Mikrosatelliten-Analyse	110
4.1.5	Hybride im Belauer See	111
4.1.6	Bestimmung der klonalen Struktur bei älteren Dauereiern	113

---

<b>4.2</b>	<b>Populationsstruktur der Daphnien im Belauer See</b>	<b>114</b>
4.2.1	Bedeutung der Dauereier im Sediment	115
4.2.1.1	Bildung der Dauereier in der Daphnien-Population	116
4.2.1.2	Bedeutung der maternalen Linien für die Populationsstruktur von <i>D. cucullata</i>	118
4.2.1.3	Bedeutung von treibenden Dauereiern für die Dauereibank	119
4.2.1.4	Schlüpferfolg und Abundanzen	120
4.2.1.5	Selektion beim Schlüpfen	123
4.2.1.6	Bedeutung der Dauereier im Sediment - Synthese	124
4.2.2	Einfluß der <i>Daphnia</i> -Dauereier auf die genetische Struktur der Population im Pelagial	127
4.2.3	Auswirkung der sexuellen Reproduktion auf das HWE	129
4.2.4	Bedeutung der Dauereier im Sediment als paläolimnologische Datenbank	130
<b>4.3</b>	<b>Schlußbetrachtung</b>	<b>132</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>

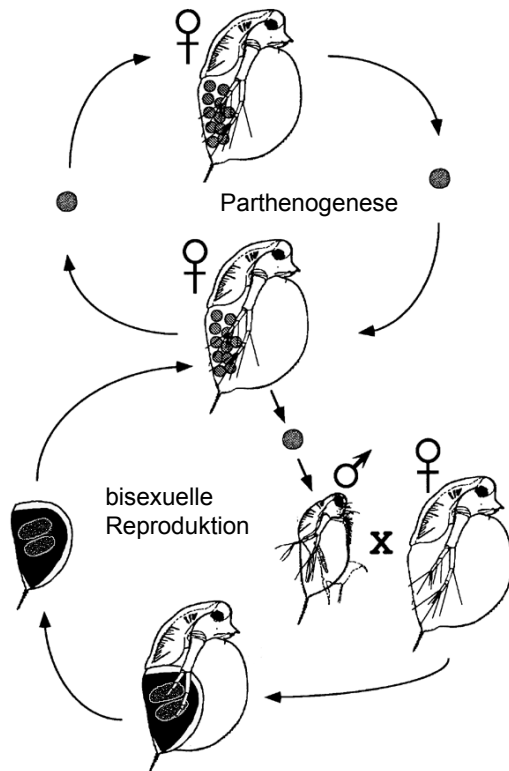
## 1 Einleitung

In fast allen Habitaten sind die Organismen räumlichen und zeitlichen Variationen der Umwelt ausgesetzt. Diese Variationen beinhalten Schwankungen von abiotischen Parametern, wie Licht und Temperatur, und biotischen Parametern, wie die Verfügbarkeit der Nahrung, die Auswirkungen von Konkurrenz und das Auftreten von Räubern oder Parasiten. Daher ist ein Habitat sowohl räumlich als auch zeitlich für einen Organismus oft nur bedingt nutzbar, z.B., wenn die Ressourcen in einem Habitat verbraucht sind oder sich die Bedingungen saisonal oder durch die Invasion anderer Arten ändern. Die Organismen passen sich diesen Gegebenheiten auf vielfältige Weise an. Es besteht die Möglichkeit den unwirtlichen Bedingungen im Habitat aktiv (laufen, schwimmen oder fliegen) oder passiv (z.B. Wind, Wasser, Organismen) zu entfliehen (Verbreitung). Während sich, z.B., Vögel zwischen Inselgruppen, Wühlmäuse zwischen Feldern oder Blattläuse zwischen Pflanzen aktiv fortbewegen, werden Pflanzensamen, Seestern-Larven und andere Invertebrate passiv und unkontrolliert verteilt. Das Verlassen eines Habitats kann auch als Massenbewegung, wie z.B. bei den Heuschreckenschwärmen, der Transatlantik-Überquerung der Aale oder auch den interkontinentalen Flügen der Vogel-Schwärme, erfolgen (Migration). Neben der räumlichen Verteilung gibt es aber auch die Möglichkeit, daß sich die Aktivität eines Organismus auf bestimmte Zeiten verteilt (*Time Dispersal*). Organismen können größere Zeiträume energiesparend in inaktiven Stadien verbringen (Diapause). In einem solchen Stadium sind sie häufig wesentlich toleranter gegenüber ungünstigen Bedingungen, wie Trockenheit, extremen Temperaturschwankungen oder Lichtmangel. Diese resistenten Stadien sind bei Insekten, Invertebraten und Samenpflanzen weit verbreitet (Überblick s. Begon et al., 1986; Rhodes et al., 1996).

Die räumliche und zeitliche Heterogenität in einem Habitat führt zu einer räumlichen und zeitlichen Verteilung der Organismen und Populationen. Diese Verteilungen wirken sich auch auf die genetische Struktur und evolutionäre Entwicklung einer Population aus. Die limnischen Habitate können im Gegensatz zu vielen terrestrischen Lebensräumen klar definiert werden. Die Tümpel und Seen sind am besten mit Inseln im Meer vergleichbar. Dieser Umstand macht diese Lebensräumen zu ausgezeichneten Modell-Habitaten, um die Bedeutung des *Time-Dispersals* für eine Population zu untersuchen.

Cladoceren, insbesondere *Daphnia*, gehören weltweit zu der wichtigsten Gruppe von Zooplanktern in Süßgewässern. Ihre Verbreitung reicht von den arktischen Tümpeln, über Bergseen, bis hin zu tropischen Seen. Obwohl hauptsächlich im Süßwasser vertreten, kommen einige Arten auch in brackigen Gewässern vor (Lampert & Rothhaupt, 1991). So unterschiedlich die Habitate sind, so unterschiedlich können auch die Arten sein. Weltweit sind bisher über 200 Daphnien-Arten bekannt (Colbourne et al., 1997). Sowohl morphologische Anpassungen, wie z.B. Zyklomorphose (Wesenberg-Lund, 1910), als auch verhaltensökologische Anpassungen, wie z.B. räuber-induzierte Vertikalwanderungen (Lampert, 1993), sind bei den verschiedenen Arten beschrieben. Wenn Daphnien in einem Habitat vorkommen, nehmen sie im Nahrungsnetz eine zentrale Bedeutung ein. Daphnien gehören zum Ernährungstyp der Filtrierer und entnehmen dem Wasser mit Hilfe eines Filtrierapparates, gebildet aus Thoracopoden und Carapax, suspendierte Partikel, wie Algen und Bakterien. Die teilweise große Abundanz der Daphnien und die effiziente Filtrieraktivität führen dazu, daß Daphnien einen gravierenden Effekt sowohl auf die Quantität als auch auf die Zusammensetzung des Phytoplanktons ausüben (Edmondson & Litt, 1982). Als Auswirkung kommt es im Verlauf der saisonalen Sukzession in vielen Seen zu einem vorhersagbaren Klarwasserstadium (Lampert et al., 1986) und einer saisonalen Sukzession der Algen im See (Sommer et al., 1986). Als wichtigster Zooplankter bilden Daphnien das Bindeglied zwischen Algen und planktivoren Fischen.

Neben artspezifischen Unterschieden, phänotypischer Plastizität, sowie der zentralen Bedeutung im Nahrungsnetz der Süßgewässer macht der Lebenszyklus (s. Zaffagnini, 1987) *Daphnia* zu einem interessanten Untersuchungsobjekt. Bis auf wenige Ausnahmen (Hebert, 1987), vermehren sich Daphnien zyklisch parthenogenetisch. Daphnien können innerhalb einer Generation zwischen asexuellen (Parthenogenese) und sexuellen Phasen der Reproduktion wechseln (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1 Lebenszyklus von *Daphnia***

Schema modifiziert nach T. Little (University of Edinburgh, Schottland)

Während der Parthenogenese werden nur Weibchen produziert. Die parthenogenetischen Eier (Subitaneier) entstehen durch die Unterdrückung der Meiose (Apomixis) und sind daher genetisch identisch (Klone). Die Anzahl der Subitaneier kann von 1 - 300 variieren und ist abhängig von der Größe und der Futteraufnahme der Daphnie (Hebert, 1978). Die Entwicklung der Subitaneier vollzieht sich in der vom Carapax gebildeten Brutkammer. Die vollständig entwickelten Neonaten verlassen die Brutkammer kurz bevor die Mutter sich häutet. Unter günstigen Bedingungen können die Mütter ca. alle drei Tage eine neue Brut anlegen. Der Vorteil bei der asexuellen Reproduktion ist, daß das Populationswachstum maximiert werden kann, da alle Nachkommen Weibchen sind. Besonders gut angepaßte Klone können sich durch die Parthenogenese schnell durchsetzen.

Unter bestimmten Bedingungen wechseln die zyklisch parthenogenetischen Daphnien von der asexuellen zur sexuellen Reproduktion. Ungünstige Umweltbedingungen in einem Habitat, wie z.B., Nahrungsknappheit, hohe Populationsdichten, chemische oder physikalische Faktoren, können diesen Wechsel initiieren (Banta & Brown, 1929; Hobaek & Larsson, 1990). Aus



Subitaneiern entwickeln sich dann Männchen. Nach der Paarung entstehen 1 - 2 befruchtete Eier (Dauereier), die vom Weibchen in einer vom Carapax gebildeten Hülle (Ephippium) mit der nächsten Häutung abgegeben werden. Die Dauereier stellen ihre Entwicklung nach wenigen Teilungen ein (ca. 250 Zellen, Vollmer, 1912) und benötigen dann einen Stimulus zur Weiterentwicklung. Nur wenige *Daphnia*-Arten sind in der Lage ohne Männchen Dauereier zu produzieren (Hebert, 1981).

Obwohl anzunehmen ist, daß sich sexuell reproduzierende Daphnien besser an Veränderungen im Habitat anpassen können, zeigen jedoch auch obligat parthenogenetische Daphnien-Arten eine hohe genetische Diversität (Hebert, 1987). Der Vorteil der sexuellen Reproduktion ist daher nicht ausschließlich in der Rekombination, sondern auch in den Dauereiern selbst zu sehen. Die Vorteile der Dauerei-Produktion liegen in der Resistenz und im Verbreitungspotential. Die Dauereier können geschützt im Ephippium über Jahre hinweg ungünstige Umweltbedingungen überdauern (Hairston et al., 1999a; Moghraby, 1977; Weider et al., 1997). Die passive Verbreitung von Ephippien findet, z.B. durch den Transport von Fischen oder Vögeln statt. Eine Darmpassage können sie unbeschadet überstehen (Mellors, 1975). Die Ephippien können sich auch mit den Setae (Freyer, 1972) an das Fell oder das Gefieder von wadenden Tieren anheften (Carvalho & Wolf, 1989), durch den Wind verdriftet oder sogar durch den Menschen, z.B. im Ballastwasser von Booten, verbreitet werden. Durch diese Verbreitungsmechanismen können neue Habitate erschlossen werden und dies führt zum kosmopolitischen Auftreten von *Daphnia* (Dodson & Frey, 1991). Die Produktion von Dauereiern stellt eine Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Auftreten von *Daphnia* in räumlich und zeitlich heterogenem Habitat dar.

Daphnien-Populationen in temporären Gewässern, die häufig austrocknen oder durchfrieren, sind ständig vom Aussterben bedroht. Die einzige Möglichkeit die Population in diesen temporären Habitaten zu erhalten, ist durch die Produktion von resistenten Dauerstadien gegeben. Sobald sich die Bedingungen im Habitat verbessern, können die Dauereier schlüpfen und zur Wiederbesiedlung des Habitats führen. Die Produktion von Dauereiern kann daher als eine Überlebens- und Verbreitungsstrategie in nicht permanenten Habitaten gelten. Im Vergleich zu temporären Gewässern stellen Seen permanente Habitate dar. Daphnien-Populationen sind im See mit unterschiedlichen Abundanzen während des gesamten Jahres präsent. Die Dauereier sind in der Regel nicht notwendig, um das Überleben einer Population sicherzustellen. Trotzdem werden auch in Seen Dauereier produziert. Dauereier, die nach der Häutung ins

Sediment absinken, können sich dort über Jahrzehnte oder Jahrtausende ansammeln. Wenn sie nicht schlüpfen, bilden sie eine Dauereibank, die den Samenbanken bei terrestrischen Pflanzen entspricht (Brown & Venable, 1986). Die Ehipprien in den Seen werden allmählich von Sediment überschichtet. In manchen Seen (z.B. Belauer See, Bodensee) ist die chronologische Akkumulation der Ehipprien in den jährlichen Schichtungen des Sediments (Varven) erhalten geblieben. Nur wenn sich die Dauereier dicht genug an der Sedimentoberfläche befinden, kann die Diapause unterbrochen werden (Herzig, 1985). Bestimmte Reize, wie z.B. Wasser, Temperatur, zunehmende Tageslänge oder hohe Sauerstoffkonzentrationen, führen dazu, daß die Dauereier sich entwickeln und die Daphnien schlüpfen können (Schwartz & Hebert, 1987).

Es gibt zwei Hypothesen, die sich mit der Bedeutung der Dauereibank auseinandersetzen. Die erste Hypothese betrachtet die Dauereier im Sediment als Spiegel vergangener Populationen (Frey, 1958; Kerfoot, 1974). Eine Voraussetzung dazu ist, daß das Sediment repräsentativ für die Population ist. Das bedeutet, daß weder die Produktion von Dauereiern im Pelagial noch das Schlüpfen der Daphnien aus den Dauereiern im Sediment selektiv sein darf. Je weniger Dauereier aus dem Sediment schlüpfen, desto vollständiger kann das Sediment die Zusammensetzung der Daphnien-Population reflektieren. Unter der Annahme der ersten Hypothese ist es möglich, die Geschichte und Struktur vergangener Daphnien-Populationen anhand der Dauereier im Sediment abzuleiten.

Die zweite Hypothese besagt, daß die Dauereibank die Evolution in der Population verlangsamen kann. Dabei wird angenommen, daß Dauereier im Sediment, ebenso wie Samenbanken, ein aktives Element darstellt, daß die Zusammensetzung einer Population prägt (Brown & Venable, 1986; Hairston & De Stasio, 1988). Die Dauereier im Sediment bleiben im Gegensatz zur Daphnien-Population vom Einfluß mikroevolutionärer Prozesse unberührt. Dauereier, die nicht alle in demselben Jahr schlüpfen, in dem sie entstanden sind, sondern über mehrere Jahre hinweg, können einen Verlust von Allelen oder genetischer Variation innerhalb dieses Zeitraumes verhindern. Das Schlüpfen über mehrere Jahre hinweg entspricht einer Risikostreuung, wie dies auch bei Samenpflanzen bekannt ist (*Bet Hedging*, Clauss & Venable, 2000). Je mehr und je länger Daphnien aus Dauereiern schlüpfen, desto stärker ist der Einfluß der Dauereier auf die Population im Pelagial.

Die Bedeutung der Dauereibank für ein permanentes Gewässer konnte bisher nicht direkt untersucht werden. Mittels der Allozym-Analyse, die häufig für die genetische Charakterisierung bei Zooplanktern verwendet wird, können zwar Daphnien, die aus Dauereiern schlüpfen, (Hairston et al., 1999a; Weider et al., 1997), jedoch nicht die Dauereier selbst analysiert werden. Mit der Entwicklung hochauflösender genetischer Marker, wie z.B. Mikrosatelliten, ist es seit kurzem möglich nicht nur die genetische Variation bei adulten Daphnien zu untersuchen (Lynch et al., 1999; Pálsson, 2000), sondern auch Dauereier direkt genetisch zu charakterisieren (Gómez & Carvalho, 2000; Reid et al., 2000).

Seit den 70er Jahren sind repetitive Sequenzen, zu denen auch Mikrosatelliten zählen, dokumentiert. Hamada et al. (1982) zeigten, daß eine große Anzahl dieser Elemente nahezu ubiquitär verteilt im Eukaryonten-Genom vorkommen und fanden repetitive DNA-Basensequenzen (T G)<sub>n</sub> in Organismengruppen wie Hefe und Vertebraten. Tautz et al. (1986) zeigten, daß verschiedene solcher repetitiven Sequenzmotive im Eukaryonten-Genom vorkommen. Die repetitiven Sequenzen können stark inter- und intraspezifisch variieren (Tautz, 1989). Die große Anzahl von Mikrosatelliten im Genom und die hohe Variabilität, die durch Mutationshäufigkeiten von  $10^{-2}$  bis  $10^{-5}$  pro Generation entsteht (Edwards et al., 1992; Weber & Wong, 1993; Weissenbach et al., 1992), machen Mikrosatelliten zu wertvollen genetischen Markern. Im Vergleich zu den Allozymen zeigen Mikrosatelliten somit Mutationsraten, die 2 - 3 Größenordnungen höher liegen (Jarne & Lagoda, 1996).

In dieser Arbeit wurde eine Kombination von Mikrosatelliten- und mitochondrieller DNA-Analyse durchgeführt, die eine vergleichsweise hohe Auflösung der genetischen Variation in der Daphnien-Population ermöglicht. Damit diese molekularbiologischen Methoden in dieser Arbeit angewendet werden konnten, mußten sie für die *Daphnia*-Taxa, die im Belauer See vorkommen, optimiert werden. Mit den Methoden wurden erstmalig Analysen durchgeführt, um die zwei Hypothesen zur Bedeutung der Dauereibank zu überprüfen:

- I. Das Sediment ist ein Spiegel vergangener Daphnien-Populationen.
- II. Die Dauereibank führt zu einer Verlangsamung der Evolution in der Daphnien-Population.

Weiterhin wurden Möglichkeiten der genetischen Analyse für paläolimnologische Untersuchungen anhand von Dauereiern, die mehr als hundert Jahre alt sind, aufgezeigt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Der Untersuchungsorganismus *Daphnia*

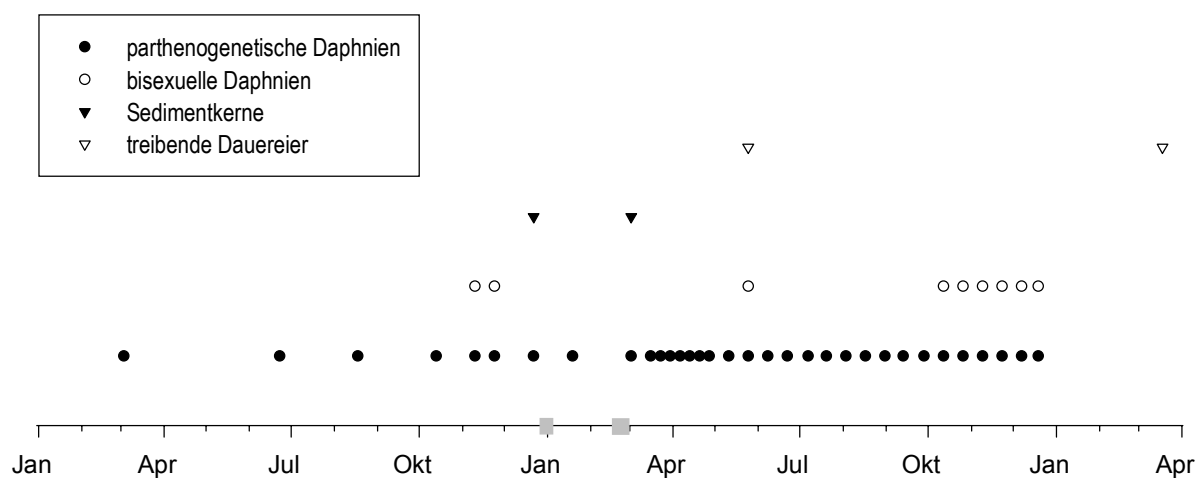
In dieser Arbeit wurden überwiegend die im Belauer See coexistierenden Arten *D. galeata*, *D. hyalina* und *D. cucullata* untersucht. Diese Arten bzw. Taxa gehören zur *D. longispina*-Gruppe und können interspezifische Hybride bilden (z.B. Schwenk, 1993). Zusätzlich wurden in dieser Arbeit einige andere Arten analysiert (Tabelle 3.2).

Daphnien wurden in 50-ml- bis 1,5-l-Glasgefäßen kultiviert. Für die Kultivierung wurde Schöhseewasser (Plön, Schleswig-Holstein) zunächst über eine 250- $\mu$ m-Gaze filtriert und dann bei 0,5 bar durch einen GFK-Vorfilter (Sartorius) und eine Filterkartusche (0,45  $\mu$ m) partikelfrei filtriert. Nach der Filtration wurde für 30 min belüftet. Als Futterquelle wurde eine *Scenedesmus obliquus*-Algensuspension verwendet. Auf die Wasseroberfläche wurde Cetylalkohol (Merck Eurolab) gegeben, um die Oberflächenspannung des Wassers herabzusetzen. Dadurch wurde verhindert, daß besonders die kleineren *Daphnia*-Arten mit ihrer hydrophoben Oberfläche an der Wasseroberfläche hängen bleiben. Resultate aus der Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß Cetylalkohol Daphnien nicht schädigt. Die Daphnien-Kulturen wurden regelmäßig ausgedünnt, indem Daphnien mit einem Glasrohr angesaugt und in neue Gläser mit frischem Seewasser umgesetzt wurden. Die Kulturen wurden bei konstant schwachem Licht und 15 °C gehältert. Eine Ausnahme bildeten die arktischen Klone, *D. tenebrosa* und *D. middendorffiana*, diese wurden bei 10-12 °C und ebenfalls konstantem Licht kultiviert.

Die durch Parthenogenese entstandenen Daphnien stellen genetische Klone dar. Streng genommen ist ein Klon genetisch absolut identisch. Da bei den Analysen jedoch nur ein Teil des Daphnien-Genoms untersucht wurde, sind Unterschiede in anderen Bereichen nicht auszuschließen oder sogar wahrscheinlich. Daher beinhaltet der Begriff „Klon“ in dieser Arbeit eine Gruppe von Klonen, die jedoch für die untersuchten Marker genetisch identisch sind.

## 2.2 Probenahmen

Die Probenahmen von Daphnien aus dem Belauer See wurden im Jahre 1998 sowie 1999 (Abbildung 2.1) zu festgesetzten Terminen durchgeführt. Im Jahre 2000 wurden nur treibende Dauereier vom Uferbereich aufgesammelt. Die Termine wurden vom Pächter des Sees mit der Universität Kiel vereinbart. Die Ökosystemforschung (Universität Kiel) stellte freundlicherweise Umweltdaten, wie z.B. Temperatur und Sauerstoffgehalt für das Jahr 1998 und den Januar'99, bereit. Zudem wurden von der Universität Kiel 30-m-lange Sedimentkerne im Jahre 1990 entnommen.



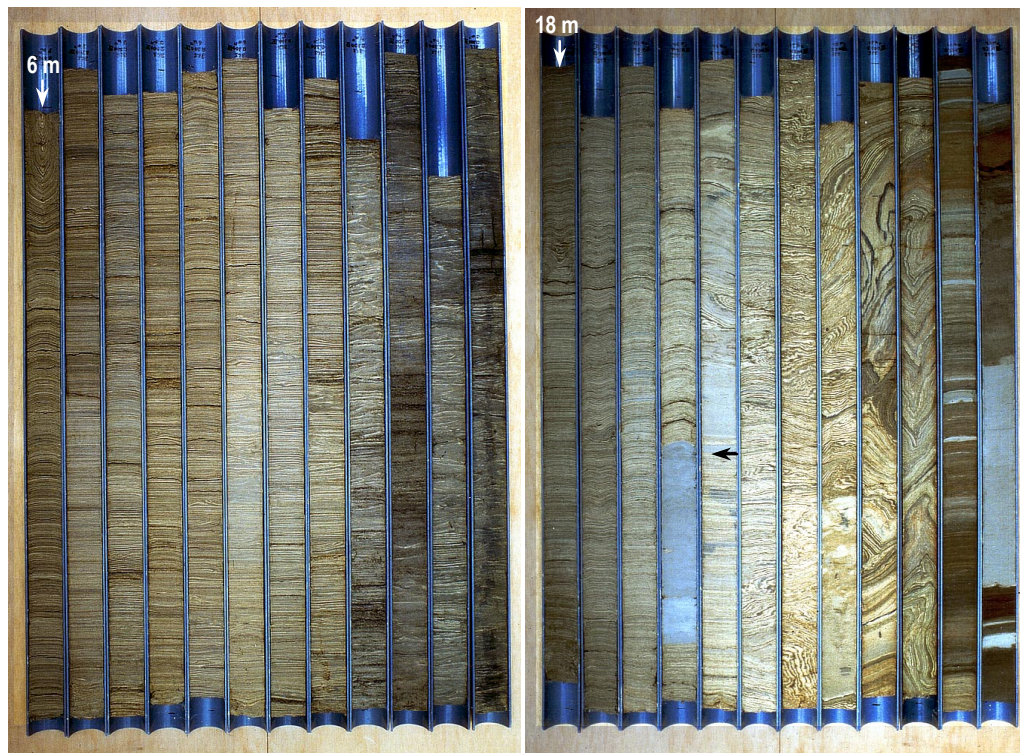
### Abbildung 2.1 Probenahmen

Probenahmetage in den Jahren 1998 bis 2000 für *Daphnia* im Belauer See. Auf der Zeitskala ist das Auftreten einer Eisschicht mit grauen Kästen markiert.

### 2.2.1 Das Untersuchungsgewässer

Als Untersuchungsgewässer wurde der Belauer See gewählt, der etwa 30 km südlich von Kiel als dritter See in der Bornhöveder Seenkette liegt. Er weist eine maximale Länge von 2,23 km und eine maximale Breite von 0,75 km auf. Mit einer Seeoberfläche von ca. 1,13 km<sup>2</sup> ist er der zweitgrößte, jedoch mit einer größten Wassertiefe von 29 m der tiefste der vier Seen in der Bornhöveder Seenkette (Schernewski, 1992). Der Belauer See ist als eutroph einzustufen und gehört dem dimiktisch-holomiktischen Seentypus an. Die Morphologie des Seebeckens und die Tiefe des Sees führen im Sommerhalbjahr zu einer ausgeprägten Temperaturschichtung, die den Wasseraustausch zwischen Epilimnion und der sauerstofffreien

Tiefenwasserzone des Hypolimnions verhindert. Im November oder Dezember kommt es wie im Frühling zu einer Vollzirkulation. Diese limnologischen Verhältnisse sind verursacht eine ausgeprägte Jahresschichtung des Sediments (Abbildung 2.2). Da diese Schichtung ungestört ist, kann der Einfluß von Bioturbation ausgeschlossen werden (Wiethold, 1998).



**Abbildung 2.2 Jahresschichtung des Sediments im Belauer See**

Die Abbildung zeigt einen aufgeschnittenen Kern (6-30 m) von insgesamt drei Kernen. Zu erkennen ist das stratifizierte Sediment. Die hellen Ablagerungen spiegeln die Sedimentation der silikathaltigen Diatomeen wieder. Der schwarze Pfeil gibt die Tiefe an, bis zu welcher der Sedimentkern datiert wurde. Abbildung aus Wiethold (1998).

### 2.2.2 Probenahmen von Daphnien aus dem Pelagial

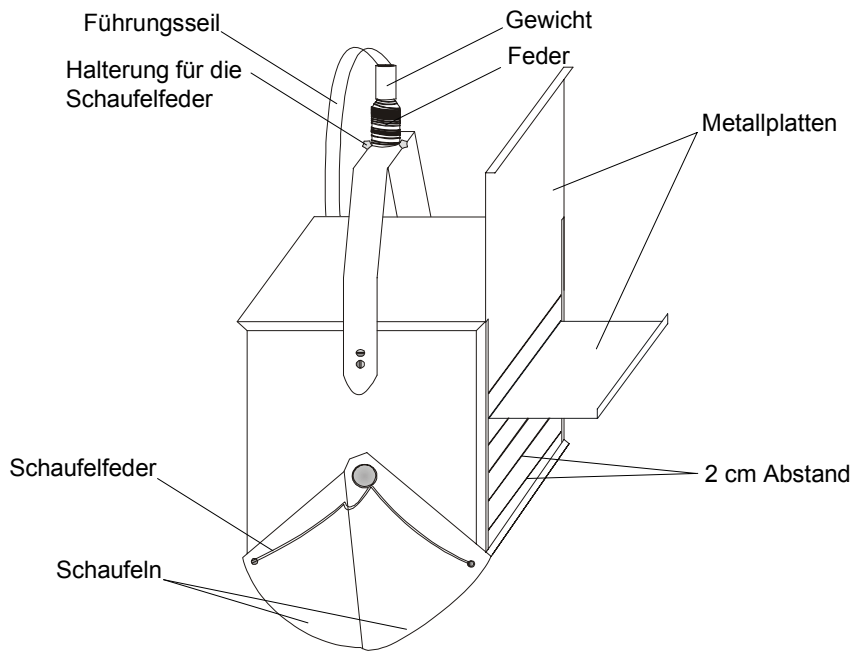
Daphnien wurden an allen Probenahmetagen an der tiefsten Stelle des Sees (29 m), die durch eine Boje kenntlich gemacht war, aufgesammelt. Die Probenahmen der Daphnien in der Wassersäule wurden mit 12-15 Netzzügen mit einem 100 µm Planktonnetz (Hydrobios, Kiel) über die gesamte Wassertiefe durchgeführt. Die Planktonproben wurden für den Transport in mit Belauer-Seewasser gefüllten 2-l-Plastikgefäßen gekühlt und dunkel aufbewahrt. Adulte Daphnien wurden später im Labor aus den Planktonproben isoliert.

## 2.2.3 Probenahmen von Dauereiern aus dem Sediment

### 2.2.3.1 Probenahme von rezenten Dauereiern

Dauereier können ins Sediment absinken, um dort Perioden ungünstiger Lebensbedingungen zu überstehen. Es wurden Sedimentkerne gezogen, um daraus *Daphnia*-Dauereier für Schlüpfversuche (Abschnitt 2.3.3) oder direkt für eine DNA-Extraktion (Abschnitt 2.4.1) zu isolieren. Dazu wurden trotz einer dünnen Eisschicht im Dezember'98 und unmittelbar nach dem Schmelzen der Eisdecke, die den Belauer See für etwa 10 Tage im Februar bedeckte, im März'99 jeweils drei Sedimentkerne gezogen. Die Sedimentkerne vom Dezember'98 und März'99 werden als Replikate angesehen, da die Daphnien mit Dauereiern zuletzt im November'98 auftraten und in der Zwischenzeit keine weiteren Daphnien mit Dauereiern beobachtet wurden. Die Sedimentkerne wurden mit einem Eckmann-Greifer (Abbildung 2.3) an der tiefsten Stelle des Belauer Sees entnommen. Der Eckmann-Greifer hatte eine Fläche von 255 cm<sup>2</sup> und eine Tiefe von etwa 17 cm (ohne Schaufeln). Das Prinzip beruht darauf, daß der Greifer mit geöffneten und gespannten Schaufeln solange herabgelassen wird, bis er sich in das Sediment eingräbt. Dann wird ein Gewicht am Führungsseil herabgelassen, welches den Schließmechanismus der Schaufeln auslöst. Der Sedimentkern kann dann heraufgezogen werden. Sedimentkerne, bei denen der Eckmann-Greifer nicht rechthöckrig in das Sediment eingedrungen war, wurden verworfen. Der Kern kann im Abstand von ca. 2 cm mit Metallplatten untergliedert werden. Während der Sedimentkern gezogen wird sind die dafür vorgesehenen Öffnungen von einer der Metallplatten verdeckt.

Zunächst wurde das Sediment in den Schaufeln des Greifers durch Einföhren der untersten Metallplatte und anschließendem Öffnen der Schaufeln abgetrennt und verworfen. Über die unterste Metallplatte wurde im Abstand von 4 cm eine zweite eingeföhrt. Dann wurde die erste Platte entfernt und das Sediment vorsichtig in einer Plastiktüte aufgefangen und für den Transport in einer Kühlbox aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis der Sedimentkern in vier Abschnitte gegliedert war (Tabelle 2.1). Die Dicke der obersten Sedimentschicht, die über der letzten Metallplatte verblieb, wurde gemessen und betrug bei allen Kernen nicht mehr als 2 cm.



**Abbildung 2.3 Schema des Eckmann Greifers**

Der Sedimentzuwachs eines Jahres an der Probenahmestelle entspricht  $2 \text{ cm} \pm 0,2$  (pers. Mitteilung Dr. D. Garbe-Schönberg, Universität Kiel). Somit und aufgrund der Jahresschichtung des Sediments wurde angenommen, daß die oberste Schicht der Sedimentkerne beider Probenahmetage repräsentativ für die Jahresproduktion von *Daphnia* Dauereiern im Jahre 1998 war. Zur Aufbewahrung wurden die Sedimente in einer Styroporkiste bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Im März'99 wurden zusätzliche Kerne gezogen, von denen nur die oberen 2 cm für Schlüpfversuche verwendet wurden.

**Tabelle 2.1: Einteilung der Belauer Sedimentkerne in Sedimentabschnitte**

Sedimentabschnitt [Nr.]	Dicke [cm]	Tiefe [cm]	mittlere Tiefe [cm]
I	< 2	0-2	1
II	4	2-6	4
III	4	6-10	8
IV	4	10-14	12



### 2.2.3.2 Probenahme von alten Dauereiern

Im Rahmen eines Europäischen Projektes wurden im Jahre 1990 drei 30-m-lange Sedimentkerne (Prof. Dr. H. Usinger, Universität Kiel) von der tiefsten Stelle des Belauer Sees gezogen (Abbildung 2.2). Die Stratifizierung des Sediments erlaubte mit verschiedenen Methoden eine Datierung des Kerns bis zu einer Tiefe von 23 m (siehe Wiethold, 1998). Neben dem Belauer See sind nur wenige Seen mit solchen Sediment-Eigenschaften bekannt (z.B. Bodensee, Wessels et al., 1995). Aus dem anaeroben und kühlen Belauer See Sediment wurden *Daphnia* Dauereier und andere pflanzliche oder tierische Fragmente isoliert. An dem Sedimentkern wurden bereits die verschiedensten Analysen, u.a. Diatomeen- (Håkansson, 1998), Bosminen- (Hofmann, 1998) und Pollenanalysen (Wiethold, 1998), durchgeführt. Die Ergebnisse von Diatomeen und Bosminen geben Aufschluß über die Eutrophierung im Belauer See und die Pollenanalysen zeigen den anthropogenen Einfluß. Aus Abbildung 2.4 ist zu ersehen, daß die ältesten Sedimente, die zur Verfügung standen, auf 7130 v.Chr. datiert werden, also etwa 9130 Jahre alt sind. Für die Lagerung (Universität Kiel) wurde der Sedimentkern in 1-m-lange Abschnitte unterteilt, längsseits halbiert und von Plastikfolie umgeben in einer begehbaren Kühlkammer im Dunkeln, leicht feucht aufbewahrt.

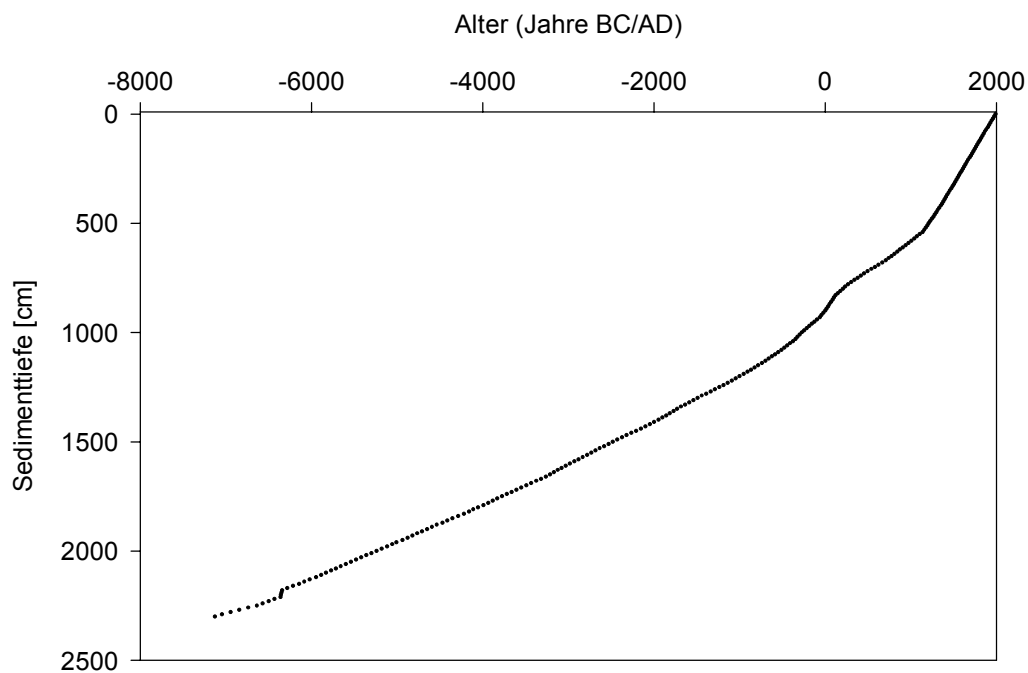


Abbildung 2.4 Datierung des Belauer See Sedimentkernes

## 2.2.4 Probenahmen von Dauereiern aus dem Spülsaum

*Daphnia*-Dauereier, die nicht ins Sediment absinken, sondern auf der Wasseroberfläche treiben, wurden im Spülsaum am östlichen Seeufer (Badestelle) gesammelt. Dauereier können von der Wasseroberfläche, z.B. durch Wasservögel oder auch Schiffe, verbreitet werden. Im Mai'99, zeitgleich mit dem Auftreten von ehippien-tragenden Daphnien, und im März'00, nach dem Überwintern der treibenden Dauereier, wurden jeweils zwei 10-l-Eimer mit Schaum aus dem Spülsaum befüllt. Nachdem sich der Schaum verflüssigt hatte, wurden die Proben im Labor nach Dauereiern durchgesehen. Die Dauereier vom Mai'99 wurden entweder für eine DNA-Extraktion (Abschnitt 2.4.1) vorbereitet oder für Schlüpfversuche (Abschnitt 2.3.3) isoliert. Mit den Dauereiern vom März'00 wurden aus zeitlichen Gründen nur Schlüpfversuche durchgeführt.

## 2.3 Populationsdynamische Parameter

Als populationsdynamische Parameter wurden Abundanzen der Dauereier im Sediment, die Schwimmfähigkeit der Ehippien und die Schlüpffähigkeit der Dauereier untersucht.

### 2.3.1 Abundanzen von Dauereiern im Sediment

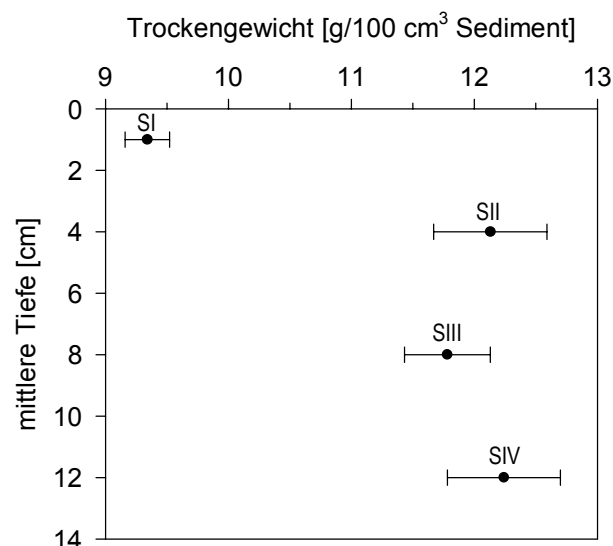
#### 2.3.1.1 Abundanzen von rezenten Dauereiern

Für die Sedimentkerne von Dezember '98 und Mai '99 wurden die Abundanzen der Dauereier in den einzelnen Kernabschnitten ermittelt. Dazu wurden aus jedem Kernabschnitt sechs Proben mit einem definiertem Volumen von 45,6 cm<sup>3</sup> entnommen. Aus dem zentralen Bereich der einzelnen Sedimentabschnitte wurde mittels eines abgeschnittenen Plexiglasrohres Sediment ausgestochen. Es wurde vermieden, Sedimente nahe der Ränder der Kerne auszusteichen, um einen Transfer von Dauereiern aus anderen Schichten auszuschließen. Der mit Sediment befüllte Rohrabchnitt wurde auf einen ebenen Untergrund übertragen und dann mit einem Löffel vollständig befüllt. Überschüssiges Sediment wurde mit dem Löffelstiel abgestreift. Das Sediment wurde dann in verschließbare 100-ml-Glasgefäße überführt und im Kühlschrank (dunkel, 4 °C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Insgesamt wurden die Sedimentkerne jeweils in 24 Proben unterteilt.

Die Sedimentproben wurden portionsweise durch ein 250-µm-Metallsieb solange vorsichtig gesiebt und gespült, bis keine feinkörnigen, dunklen Sedimentrückstände mehr zu erkennen

waren. Der Rückstand auf dem Sieb wurde in eine saubere Petrischale mit filtriertem Seewasser überführt. Bei schwacher Beleuchtung wurden die Ehippien unter dem Binokular aus der Probe isoliert, nach Dauereiern durchgesehen und die Anzahl der Dauereier pro Ehippium notiert. Die Ehippien mit Dauereiern wurden dann entweder für eine DNA-Extraktion (Abschnitt 2.4.1) oder für Schlüpfversuche (Abschnitt 2.3.3) verwendet.

Da das tiefere Sediment stärker komprimiert ist, d.h. weniger Wasseranteil enthält, ist bei einem Vergleich von Proben aus unterschiedlichen Tiefen nicht das Volumen, sondern der Sedimentanteil von Bedeutung. Für jeden Sedimentabschnitt wurde eine Trockengewichtsbestimmung durchgeführt. Auf diese Weise wurde der Wassergehalt in den Proben ermittelt. Dazu wurden erneut jeweils sechs Proben aus den Kernabschnitten des März-Kerns ausgestochen. Das Sediment wurde in ein abgewogenes Gefäß gegeben, ebenfalls gewogen, gut zwei Tage getrocknet und erneut gewogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Trockengewichte wurden für die Sedimentabschnitte I bis IV (Abbildung 2.5) gebildet. Für den Sedimentabschnitt I, der den größten Wasseranteil hatte, wurde ein Korrektur-Faktor ( $F = 1,36$ ) ermittelt. Diese Faktor diente als Multiplikator für die Anzahl der gefundenen Dauereier im ersten Sedimentabschnitt.



**Abbildung 2.5 Sedimentgehalt der Kernabschnitte**

Dargestellt sind die Mittelwerte der Trockengewichte mit Standardabweichungen über die mittleren Tiefen der Sedimentabschnitte (S I - IV). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Trockengewichte wurden aus jeweils sechs Sedimentproben ( $45,6 \text{ cm}^3$ ) ermittelt.

### 2.3.1.2 Abundanzen von älteren Dauereiern

Für die Ermittlung der Abundanzen älterer Dauereier stand nach anderen vorangegangenen Projekten verhältnismäßig wenig Sediment aus den 30-m-Kernen zur Verfügung. Es war nicht möglich mehrere Proben derselben Tiefe zu entnehmen. Zudem war für einige Tiefen kein Sediment mehr vorhanden. Aus der Mitte des Sedimentkernes wurde Sediment von etwa 1,5 cm Breite, 1 bis 6 cm Länge und etwa 1 cm Dicke ausgestochen. Diese Sediment-Blöcke wurden vermessen, einzeln in verschließbare Gläser überführt und bei 4 °C im Dunkeln leicht feucht gehalten. Die alten Sedimente wurden getrennt von rezenten Sedimenten aufbewahrt, um Kontaminationen durch Fremd-DNA auszuschließen. Die weitere Vorgehensweise entspricht der in Abschnitt 2.3.1.1 beschriebenen.

Die Sedimente verschiedenen Alters sind unterschiedlich stark komprimiert. Die oberen Sedimentabschnitte reflektieren in 1 cm Tiefe 1,5 Jahre gegenüber 10 Jahren in den tiefsten Sedimenten (23 m). Das Alter der isolierten Ehippien und Dauereier betrug 100 bis 4400 Jahre.

### 2.3.2 Schwimmfähigkeit von Ehippien

Es wurde untersucht, ob Ehippien bevorzugt an die Wasseroberfläche treiben oder ins Sediment absinken. Dazu wurden ehippien-tragende *D. galeata* Weibchen aus der Wasserprobe vom Mai'99 isoliert (Abschnitt 2.2.2). *D. hyalina* und *D. cucullata* produzierten zu diesem Zeitpunkt keine Ehippien. Es wurden nur Daphnien ausgewählt, deren Ehippium mindestens ein Ei enthalten hatte. Die Daphnien wurden vorsichtig in 50-ml-Gefäße mit filtriertem, belüftetem Schöhseewasser überführt und einige Tage kultiviert. Mit der Häutung wurde das Ehippium abgestoßen. Dann wurde beobachtet, ob es absank oder auf der Wasseroberfläche trieb. Die DNA dieser Dauereier und Daphnien wurde anschließend extrahiert (Abschnitt 2.4.1).

### 2.3.3 Schlüpfähigkeit von Dauereiern

Der Einfluß der Dauereier auf die Population wird in besonderem Maße vom Schlüpfverfolg bestimmt. Daher wurden mit den gesammelten Dauereiern Schlüpfversuche durchgeführt. Auf

diese Weise sollte versucht werden den Schlüpfertag abzuschätzen und untersucht werden, ob bestimmte Genotypen bevorzugt schlüpfen. Für die Schlüpfversuche wurden Ehippien mit unbeschädigten Dauereiern verwendet. Die Ehippien wurden dazu entweder aus den Sedimentabschnitten I bis IV der Dezember- und März-Kerne (Abschnitt 2.2.4) isoliert oder es wurden Ehippien gesammelt, die im Mai'99 und März'00 auf der Wasseroberfläche trieben (Abschnitt 2.2.4). Die Ehippien mit den Dauereiern wurden in Zellkultur-Testplatten (TPP, Schweiz) in filtriertes Schöhseewasser gegeben, welches zuvor belüftet wurde. Die Zellkultur-Testplatten wurden in einer begehbaren Kühlkammer bei 10-12 °C und konstantem Licht inkubiert. Das Wasser wurde regelmäßig alle 2 bis 5 Tage ausgetauscht. Diese Bedingungen sind bekannt dafür, die Diapause bei *Daphnia* unterbrechen zu können (Weider & Hebert, 1987). Über einen Zeitraum von zwei Monaten wurden die Dauereier mehrmals täglich kontrolliert.

Es wurden weitere Schlüpfversuche durchgeführt, bei denen die Ehippien mit Sediment bedeckt waren. Dazu wurden ausschließlich die jüngsten Dauereier verwendet, die aus dem Sedimentabschnitt I vom März'99 isoliert worden waren, da diese den größten Schlüpfertag versprachen. Dabei wurde ein Teil der Dauereier als positive Kontrolle ohne Sediment, wie oben beschrieben, schlüpfen gelassen. Für den Schlüpfversuch mit Sediment wurde zunächst das Sediment gesiebt (250 µm), um potentielle Fraßfeinde wie Chaoborus und Copepoden von dem Versuch auszuschließen. Das wäßrige Sediment (jeweils 100 ml) wurde in vier 500-ml-Bechergläser gefüllt. Die Ränder der Gläser wurden mit Pappe abgedunkelt. Die Ehippien versanken im Sediment, sobald sie zugegeben wurden. Anschließend wurden vorsichtig, tropfenweise am Rand des Becherglases entlang, 400 ml filtriertes, belüftetes Schöhseewasser zugeführt. Das Sediment wurde dabei nicht wesentlich aufgewühlt. Der Versuch wurde ebenfalls bei 10-12 °C und konstantem Licht durchgeführt und in einem Zeitraum von zwei Monaten täglich kontrolliert. Bei der Kontrolle nach geschlüpfen Daphnien wurde darauf geachtet das Sediment nicht aufzuwühlen. Verdunstetes Wasser wurde nachgefüllt. Nach dem Ablauf von zwei Monaten wurde der Versuch unterbrochen. Verbleibende Ehippien mit den Dauereiern wurden aus dem Sediment isoliert und als Kontrolle erneut ohne Sediment in Seewasser zum Schlüpfen exponiert. Sämtliche geschlüpfte Daphnien wurden genetisch charakterisiert.

## 2.4 Genetische Analyse

### 2.4.1 Probenvorbereitung und DNA-Isolierung

#### *Probenvorbereitung*

Die Zooplanktonproben aus dem Pelagial des Belauer Sees (Abschnitt 2.2.2) wurden direkt nach der Probenahme für die DNA-Isolierung vorbereitet. Die Probenahme im Belauer See und die Zusammenstellung der Zooplanktonproben für die DNA-Isolierung wurden innerhalb eines Tages durchgeführt, um eine repräsentative Probe entnehmen zu können, denn nach weniger als einem Tag beginnt das Zooplankton abzusterben. Aus allen drei Plastikgefäßen wurde das Zooplankton vorsichtig über ein 100 µm Sieb gegossen und mit Schöhseewasser in eine kleine Wanne gespült. Von dort wurde es gut durchmischt und in Petrischalen überführt. Der Boden der Schale war nicht vollständig bedeckt, so daß sich ein Wasserrand bildete, an den das Zooplankton trieb. Von dort konnten die Daphnien gut mit einer Pinzette aufgenommen und in ein 0,5-ml-Eppendorfgefäß gegeben werden. An jedem Probenahmetag wurden mindestens 120 Daphnien isoliert. Es wurden zahlreiche Petrischalen durchsucht.

An einigen Probenahmetagen wurden zusätzliche Daphnien für eine DNA-Extraktion vorbereitet. Im Juli wurden Subitaneier aus Daphnien herausgetrennt, an denen die Verlässlichkeit der genetischen Marker getestet werden sollte. Im Mai'99 sowie im Herbst'98 und '99 waren Weibchen mit Dauereiern und Männchen in der Population vorhanden. Ein Ziel der Arbeit ist, die genetische Differenzierung der Population in dieser Zeit zu untersuchen. Daher wurden an diesen Probenahmetagen wenigstens 100 Männchen oder falls weniger vorhanden waren, so viele isoliert, wie in der gesamten Probe gefunden wurden. Von mindestens 35 Daphnien wurde das Ehippium abgetrennt, geöffnet und die ein bis zwei Dauereier vorsichtig mittels eines Skalpells und einer spitzen Pipette isoliert. Die beiden Dauereier wurden voneinander getrennt. Bei der Bestimmung der genetischen Variation wurde jeweils nur ein Dauerei aus jedem Ehippium berücksichtigt. Die Daphnien und die Subitaneier wurden unmittelbar nach der Entnahme mit möglichst wenig Wasser in ein beschriftetes, 0,5-ml-Eppendorfgefäß in ein Chelex<sup>®</sup> 100 (Bio-Rad) DNA-Extraktionsgemisch überführt. Die Dauereier wurden vor dem Eintauchen in das Gemisch mit der Pipette zerdrückt. Die Pipette wurde anschließend mit einer Salzsäure-Lösung gereinigt, um eine Kontamination auszuschließen.

Für die DNA-Extraktionen wurden 150 Dauereier aus dem Sedimentabschnitt I vom Dezember'98 und März'99 isoliert, jeweils 25 Dauereier aus jeder der sechs Proben (Abschnitt

2.3.1.1). Aus den darunterliegenden Sedimentabschnitten wurden jeweils 15 Dauereier pro Probe isoliert, 90 Dauereier je Sedimentabschnitt. Insgesamt wurden für mehr als 1350 Dauereier DNA-Extraktionen durchgeführt. Aus zeitlichen Gründen war es nicht möglich weitere Sedimentkerne zu bearbeiten. Aus den im Spülsaum treibenden Ephippien vom Mai'99 wurden 116 Dauereier isoliert und für die DNA-Extraktion in 0,5-ml-Eppendorfgefäße mit einem Chelex<sup>®</sup>100 Extraktionsgemisch überführt.

Die Widerstandsfähigkeit der Ephippien ermöglicht auch die partielle Erhaltung von genetischer Information in alten Dauereiern. Die alten Dauereier wurden auf die gleiche Weise für eine DNA-Extraktion vorbereitet wie die rezenten Dauereier. Die DNA aller 2400 isolierten Dauereier wurde extrahiert und dabei wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen. So wurden eine Dunkelkammer und sämtliche Hilfsmittel ausschließlich für die paläolimnologischen Untersuchungen genutzt.

#### *DNA Isolierung*

Als Ausgangsmaterial für molekulare Analysen kurzer Sequenzen, wie z.B. Mikrosatelliten-DNA, sind bereits geringe Mengen DNA ausreichend. Bei klassischen Extraktionen werden Zellen mit Detergenzien lysiert, anschließend denaturiert und von den Detergenzien durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung gereinigt. Diese Vorgehensweise der DNA-Extraktion hat allerdings quantitative Verluste zur Folge. Sie ist daher ungeeignet für Dauereier, die ohnehin mit etwa 250 Zellen (Vollmer, 1912) eine geringe Zellzahl besitzen. Die DNA aus Daphnien und Dauereiern wurde überwiegend mit Chelex<sup>®</sup> 100 isoliert. Dazu wurde die Methode von Walsh et al. (1991) modifiziert. Die DNA von rezenten und alten Dauereiern wurde teilweise mit dem Forensik Kit I (Invitak) isoliert, die jedoch auch sehr teuer ist.

#### *Chelex-Methode*

Eine schnelle und effiziente Methode der DNA-Extraktion ist Chelex<sup>®</sup> 100. Chelex ist ein Chelatbildner mit hoher Affinität zu polyvalenten Metall-Ionen. In Anwesenheit von Chelex wird der Abbau der DNA durch chelatbildende Metallionen verhindert und Polymerase-Inhibitoren zudem inaktiviert (Walsh et al., 1991). Ein Vorteil dieser Methode ist, daß keine DNA-Verluste erfolgen, da die DNA nicht weiter aufgereinigt werden muß. Für die Extraktion wurde ein 5%iges Chelexgemisch (w/v HPLC-Wasser) hergestellt und autoklaviert. Das Chelex wurde durch einen Magnetrührer in der wässrigen Phase verteilt und währenddessen

mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in Eppendorfgefäße überführt. Dabei wurden adulte Daphnien in 50 µl, aus Dauereiern geschlüpfte, juvenile Daphnien in 35 µl und Subitan- oder Dauereier in jeweils 25 µl des Extraktionsgemisches aufgenommen. Nach 3 h Inkubation bei 55 °C wurde der Extrakt kurz geschüttelt, zentrifugiert und für weitere 13 min bei 100 °C belassen. Danach wurde die Probe erneut geschüttelt, zentrifugiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Behandlung befindet sich die DNA im wässrigen Überstand und ist im gefrorenen Zustand über Monate stabil.

#### *Forensik Kit I*

Das Prinzip der Extraktion mit dem Forensik Kit I beruht auf der Lyse der Eihülle bzw. des Carapax der Daphnien mit einem Puffersystem und nachfolgender Bindung der DNA an eine Siliziumoxid-Matrix. Die trägerfixierte DNA wird gewaschen und abschließend unter Verwendung eines Niedrigsalzpuffers wieder vom Trägermaterial eluiert. Das Protokoll des Herstellers wurde folgendermaßen für die Anwendung auf Daphnien optimiert:

1. Die Dauereier wurden in 250 µl Lysis Puffer gegeben.
2. Es wurden 3,5 µl Carrier Suspension (Siliciumoxid) zugegeben und kurz geschüttelt.
3. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 1 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.
4. 250 µl Wasch-Puffer wurden zugegeben, die Suspension geschüttelt, bis zum Erreichen einer Geschwindigkeit von 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.
5. Schritt 4 wurde zweimal wiederholt, dann wurde kurz zentrifugiert und der restliche Waschpuffer entfernt.
6. Zur Entfernung des Ethanol im Waschpuffer wurde die Probe für 20 min bei 60 °C im Thermocycler inkubiert.
7. Das Carrier-Pellet wurde in 30 µl des Elutionspuffers, der zuvor auf 70 °C erhitzt wurde, durch Schütteln bei maximaler Frequenz vollständig resuspendiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 5 min im Thermocycler bei 60 °C zur Elution der DNA inkubiert.
8. Das Reaktionsgefäß wurde für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand anschließend in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.



Eine Extraktion mit dem Forensik Kit I ist vergleichsweise aufwendig und daher für einen großen Probendurchsatz ungünstiger. Die DNA hat jedoch einen höheren Reinheitsgrad als nach der Chelex-Extraktion. Zudem ist die Methode geeignet DNA aus sehr geringen Mengen Ausgangsmaterial, wie z.B. Dauereier, zu isolieren.

Nach der Isolierung der DNA wurde der Extraktionserfolg durch die PCR (Abschnitt 2.4.2.2) kontrolliert. Die DNA-Menge war nach der Extraktion vor allem bei den Dauereiern zu gering, um sie zu quantifizieren.

## **2.4.2 Charakterisierung der genetischen Struktur von Daphnien**

### **2.4.2.1 Amplifikation von DNA-Sequenzen**

DNA-Sequenzen werden gezielt mittels einer PCR (polymerase chain reaction) unter Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) und spezifischer Oligonukleotid-Primer amplifiziert (Mullis & Faloona, 1987). Ausgangspunkt für die angewandten Methoden waren Primer, die von J. K. Colbourne (University of Guelph, Canada) sowohl für Mikrosatelliten-Sequenzen (Abschnitt 2.4.2.2) von *D. pulex* (Dpu; Subgenus *Daphnia*) und *D. magna* (Dma; Subgenus *Ctenodaphnia*) als auch für mitochondrielle 12S rDNA (Abschnitt 2.4.2.3) entwickelt worden waren.

Die PCR-Reaktionsansätze wurden in 96er Mikrotiterplatten (Biozym) angesetzt, wobei entsprechende Gummimatten (microtiter cover plates, Perkin Elmer) als Verdunstungsschutz benutzt wurden. Die Überprüfung und Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegele in horizontalen Gelkammern. Die PCR-Produkte (ca. 4 µl) und ein mit Farbstoffpuffer gemischter Größen-Marker wurden in die Geltaschen übertragen und das Gel dann vorsichtig mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Laufzeit betrug 1,5 h bei 80 V. Das Gel wurde anschließend mindestens 30 min in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (230 nm) sichtbar gemacht und durch eine Sofortbild-Kamera (Polaroid, Filmtyp 607) dokumentiert. Folgende Puffer und Reagenzien wurden dazu benötigt:

**Größen-Marker:**

100 Base-Pair Ladder (Pharmacia Biotech) in den Fragmentgrößen 100 Bp bis 2600 Bp.

**Farbstoffpuffer 10x:**

Saccharose 50 % (w/v); 4 M Harnstoff; 0,05 mM EDTA; Bromphenolblau 0,1 % (w/v).

**TBE-Elektrophoresepuffer für Agarosegele:**

100 mM Tris-Base (pH 8,3); 83 mM Borsäure; 1mM EDTA.

**Agarosegele:**

2 % (w/v) Agarose (Biozym).

**Ethidiumbromid-Lösung:**

1 µg/ml.

*Mikrosatelliten-PCR*

Zu Beginn dieser Arbeit mußten geeignete Mikrosatelliten-Primer für *D. galeata*, *D. hyalina* und *D. cucullata* gefunden und die Bedingungen zur optimalen Amplifikation ausgetestet werden. Dazu wurden 23 Dpu- und weitere 11 Dma-Primerpaare getestet. Darüber hinaus wurde die Übertragbarkeit der Mikrosatelliten-Primer auf andere *Daphnia*-Arten überprüft, um ein System universell einsetzbarer und somit vergleichbarer genetischer Marker zu erhalten. Die PCR-Bedingungen für die Mikrosatelliten-Primer wurden für die Subgenera *Daphnia* (*D. pulex*, *D. pulicaria*, *D. middendorffiana*, *D. tenebrosa*, *D. obtusa*, *D. ambigua*), *Hyalodaphnia* (*D. longispina*, *D. laevis*, *D. rosea*) und *Ctenodaphnia* (*D. magna*, *D. lumholtzi*) optimiert.

Von den 34 Mikrosatelliten-Loci wurden für vier Loci (Dpu 6, Dpu 30, Dpu 45, Dpu 122), die alle auf der Grundlage von *D. pulex* DNA entwickelt worden waren, ebenfalls PCR-Produkte für die im Belauer See coexistierenden Daphnien-Arten hergestellt. Um Mikrosatelliten-Analysen auf einem automatischen Sequenzierer (ABI 377; Perkin Elmer) durchzuführen, wurde jeweils einer der Mikrosatelliten-Primer am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Big Dye, Perkin Elmer) markiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe *fam* (blau), *hex* (grün) und *ned* (gelb) wurden zur Markierung der Primer verwendet, *rox* (rot) hingegen wurde lediglich für die Visualisierung der Fragmente eines Längenstandards (Genescan<sup>TM</sup>-350; Rox; Perkin Elmer) eingesetzt. Die Farbstoffe können die Amplifikation von Mikrosatelliten-Sequenzen beeinträchtigen oder gar blockieren. Primer und Farbstoffe waren daher nicht beliebig kombinierbar.

Die Reaktionsansätze waren für die Amplifikationen aller Loci ähnlich und wurden in Volumina von 10 µl folgendermaßen standardisiert:

1,0 µl	10x Reaktionspuffer: 100 mM Tris (pH 8,3); 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; 500 mM KCl.
10,0 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
50,0 pmol	je Primer
2,5 %	DMSO bzw.
5,0 %	DTT
0,5 U	Taq-Polymerase (Promega)
1,5 µl	DNA

auf 10 µl mit sterilem HPLC-Wasser auffüllen.

Die PCR wurde gestartet, indem die DNA zunächst 2 min bei 95 °C denaturiert wurde. Dann erfolgte ein weiterer Denaturierungsschritt von 30 sec und anschließend wurde die Anlagerung der Primer an die DNA für 1 min je nach Primer bei 42-56 °C ermöglicht. Die Anlagerungstemperatur wird wesentlich von der Nukleotidsequenz der Primer bestimmt. Nach der DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase für 1 min bei 72 °C war ein Cyclus abgeschlossen. Dieser Cyclus wurde 30 x , für alte Dauereier 36 x wiederholt. Abschließend wurde eine finale Extension von 20 min bei 72 °C durchgeführt.

#### *Mitochondrielle 12S rDNA PCR*

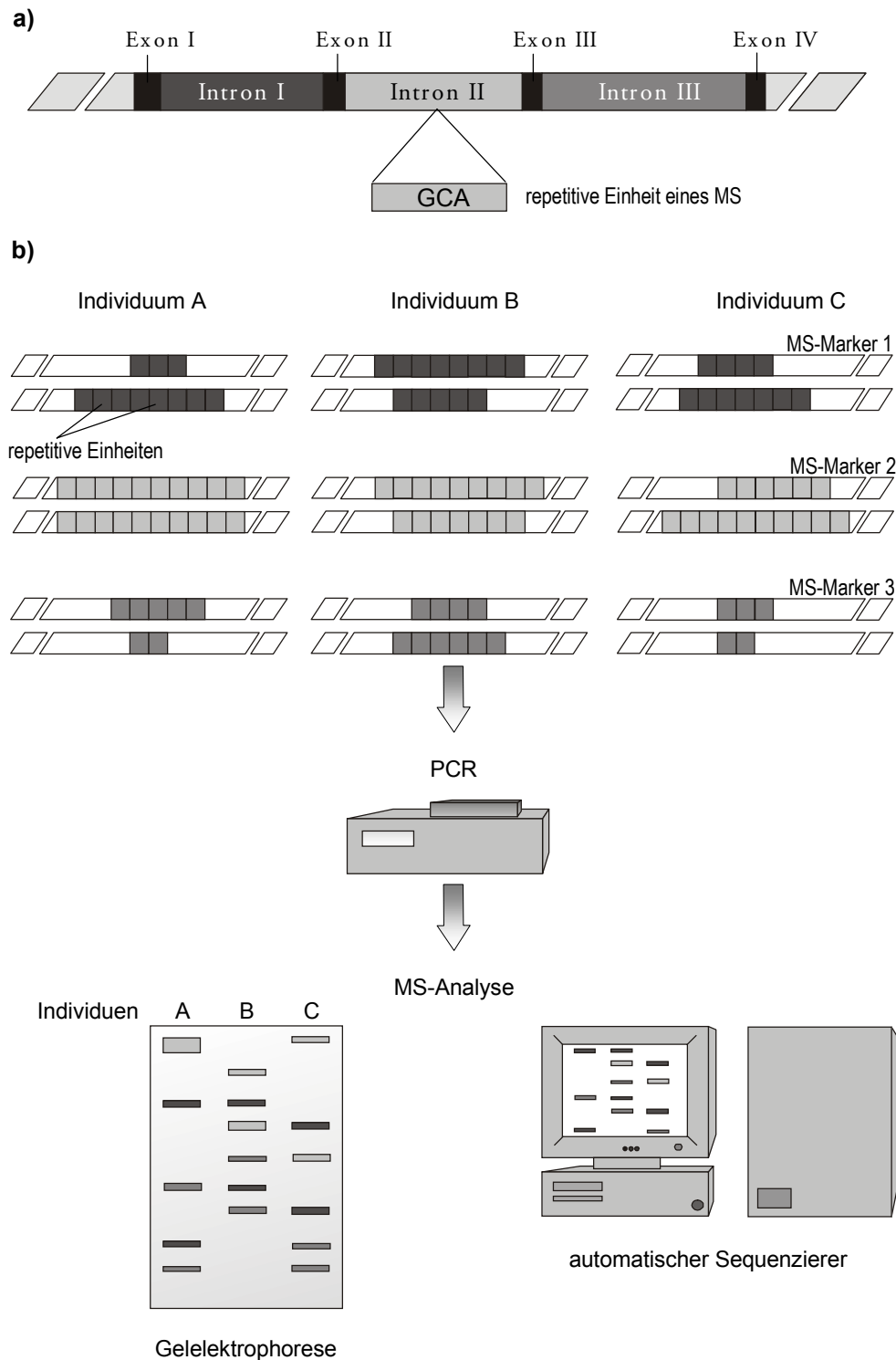
Es wurden erprobte mitochondrielle 12S rDNA Primer in eine PCR eingesetzt und ein Sequenzabschnitt von 280 Bp amplifiziert. Im Gegensatz zu den Mikrosatelliten wurde sowohl das 5'-Ende des Sense- als auch des Antisense-Primers mit den Fluoreszenzfarbstoffen *fam* bzw. *hex* (Big dye, Perkin Elmer) markiert, wobei *hex* im Vergleich zu *fam* eine um 50 % reduzierte Empfindlichkeit aufweist. Die Konzentration der PCR-Reagenzien entsprachen bei der Mikrosatelliten-Analyse. Nach einer Anfangsdenaturierung von 2 min bei 95 °C, wurde der folgende Cyclus, 45 sec bei 95 °C, 1 min bei 53 °C und 1 min bei 72 °C 30 mal wiederholt und die PCR nach einer Extension von 15 min bei 72 °C auf 4 °C gekühlt und beendet.

Die Thermocycler verschiedener Hersteller können sich in Temperaturregelungen und -wechsel (*ramping time*) unterscheiden. Daher kann es bei der Durchführung einer PCR auf verschiedenen Geräten zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Die PCR-Bedingungen für die Mikrosatelliten- und mitochondrielle rDNA wurden daher für das PCR-Gerät optimiert auf dem dann alle PCRs durchgeführt wurden. Folgende Thermocycler mit heizbaren Deckeln wurden dazu verwendet:

MJ Research (PTC 100)	Dpu 6, Dpu 45, 12S rDNA ramping time ca. 2 °C/sec
Biometra (Uno II)	Dpu 30, Dpu 122 ramping time ca. 4 °C/sec

#### 2.4.2.2 Mikrosatelliten-Analyse

In dieser Arbeit dienen Mikrosatelliten als Marker für die genetische Variation in einer Daphnien-Populationen im Belauer See. In Abbildung 2.6 ist die Mikrosatelliten-Analyse schematisch dargestellt. Der Mikrosatelliten-Analyse geht eine PCR voraus, in der Primer an konservierte Sequenzen binden, von denen die Mikrosatelliten umgeben sind. Ein Vorteil dieser Analyse ist, daß Primer, die für ein Taxon entwickelt wurden auch für andere Taxa angewendet werden können. Die Zielsequenzen werden mittels PCR vervielfältigt und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die markierten PCR-Produkte werden dann in Abhängigkeit ihrer Länge durch eine Gelelektrophorese mittels eines automatischen Sequenzierers aufgetrennt und analysiert.



**Abbildung 2.6 Schema der Mikrosatelliten-Analyse**

a) DNA-Strang mit drei Introns, in denen Mikrosatelliten (MS)-Sequenzen enthalten sind.  
 b) Mikrosatelliten-Analyse. Dargestellt sind die homologen Chromosomen für drei MS-Marker, auf denen sich für jedes Individuum eine charakteristische Anzahl von repetitiven Einheiten befindet. Die MS-Sequenzen werden mit einer PCR amplifiziert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die markierten MS-PCR-Produkte werden dann durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels eines automatischen Sequenzierers analysiert. In jeder Spur des Gels befinden sich die drei, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten MS-Marker. Es entsteht ein für die Individuen A, B und C kennzeichnendes Bandenmuster (*Fingerprint*).

Der Mikrosatelliten-Gellauf wurde vorbereitet, indem die individuellen PCR-Produkte (Dpu 6, Dpu 30, Dpu 45, Dpu 122) zusammengegeben und mit einem Cocktail im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Der Cocktail enthielt einen Längenstandard. Auf diese Weise war eine exakte Größenbestimmung der Mikrosatellitenallele für jedes Individuum möglich.

Mikrosatelliten-Cocktail:

65 %	Formamid
8 %	interner Längenstandard (Genescan™-350; Rox; Perkin Elmer)
27 %	Loading Buffer (mit Glycerin, Dextran Blau, EDTA; Perkin Elmer)

Die Proben wurden im Anschluß 2 min bei 90 °C denaturiert und waren auf Eis gekühlt für mehrere Stunden stabil.

Das Polyacrylamidgel wurde hergestellt, indem zwei Glasplatten (36 cm) nach gründlicher Reinigung aufeinandergelegt und fixiert wurden. Die Glasplatten wurden durch Plastikspacer (0,2 mm) voneinander getrennt und die Gellösung mit einer Spritze durch einen Einmal-Filterhalter (0,2 µm; Schleicher & Schuell) zwischen die Glasplatten gespritzt. Nach 30 min war das Gel vollständig polymerisiert. Folgende Lösungen und Reagenzien waren notwendig:

Polyacrylamidgel (4,5 %):

9,0 g	Harnstoff
2,5 ml	TBE-Puffer
2,5 ml	Gellösung (Long Ranger, FMC)
13,0 ml	HPLC-Wasser

Polymerisations-Auslöser:

125 µl	10 % APS (Ammoniumpersulfat)
18 µl	TEMED (N-Tetramethylethylendiamin)

Elektrophoresepuffer:

1 x	TBE
-----	-----

Nach der Polymerisation wurde das Gel in den Sequenzierer eingebaut und der Elektrophoresepuffer zugegeben. Der Gellauf fand bei 50 °C und 3000 V statt.

Die PCR-Produkte der Mikrosatelliten-Loci wurden mittels des Polyacrylamidgels größenabhängig aufgetrennt und mit einem automatischen Sequenzierer analysiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die PCR-Produkte und der Längenstandard markiert waren, wurden mit einem Laser angeregt und die vier photometrisch erfaßbaren Einzelsignale registriert. Die

Daten wurden direkt während der gelelektrophoretischen Trennung auf einem Apple Macintosh Power PC erfaßt und mit Hilfe der GeneScan-Analyse-Software (Perkin Elmer) analysiert. Für die Auflösung der Mikrosatelliten-Allele ist die Trennschärfe einer Agarosegelelektrophorese nicht ausreichend. Gele aus Agarose erlauben eine Trennung von Fragmenten mit einer Länge von 70 Bp bis 50 kb. Dagegen erfordern die in dieser Arbeit analysierten Mikrosatelliten-Loci aufgrund der geringen Längenunterschiede bei den Allelen eine größere Trennschärfe (Tabelle 2.2), die mit einem Polyacrylamidgel erreicht wird.

Die *Online* Mikrosatelliten-Analyse auf einem automatischen Sequenzierer hat neben der Nachweismöglichkeit sehr geringer Mengen fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte auch den Vorteil der Zeitersparnis. Da sich die PCR-Produkte der vier Loci entweder in Länge oder im Absorptionsspektrum ihrer Farbstoffe unterscheiden (Tabelle 2.2) kann bereits mit einem Ansatz die Auswertung für alle Loci eines Individuums erfolgen. Dabei konnte der Primer Dpu 30 sogar mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert und die Auftrennung der PCR-Produkte beider Fluoreszenzfarben verglichen werden.

**Tabelle 2.2 Eigenschaften der Mikrosatelliten-Loci**

Mikrosatelliten		PCR-Produkte	
Locus	Sequenzmotiv	Länge [Bp]	Fluoreszenzmarkierung
Dpu 6	(GT) <sub>4</sub> N <sub>5</sub> (GT) <sub>7</sub>	121-141	<i>fam</i>
Dpu 30	(TG) <sub>6</sub> (GA) <sub>7</sub>	143-157	<i>ned/hex</i>
Dpu 45	(AC) <sub>10</sub>	125-137	<i>hex</i>
Dpu 122	(TTC) <sub>9</sub> N <sub>13</sub> (GTT) <sub>3</sub> GT(GTT) <sub>2</sub>	95-104	<i>fam</i>

### 2.4.2.3 Analyse mitochondrieller rDNA

Die maternalen Haplotypen einer Art wurden durch die Amplifikation und Analyse von mitochondrialer 12S rDNA bestimmt. Mitochondrielle rDNA eignet sich für diese Analyse, da sie in großer Zahl identischer Kopien vorliegt, nicht rekombinant ist (Brown, 1985; Wolstenholme, 1992) und zudem eine geringere Variabilität als Mikrosatelliten aufweist (Sunnuks, 2000). Die Analyse wurde mit Hilfe eines Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (*Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP*) durchgeführt. Bei der SSCP-Analyse werden beide Einzelstränge eines DNA-Fragmentes in Abhängigkeit von ihrer dreidimensionalen Konformation, die durch die Nukleotidsequenz bedingt ist, unter nicht denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Mikrosatelliten- und SSCP-Analysen standen ab Mai'99 automatische Sequenzierer zur Verfügung. Vor dieser Zeit wurde mit anderen Techniken gearbeitet, die im Folgenden für die SSCP-Analyse auch dargestellt werden und einen Methodenvergleich ermöglichen.

#### *SSCP-Analyse mit fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten*

Die SSCP-Analyse wurde ebenso wie die Mikrosatelliten-Analyse auf einem automatischen Sequenzierer (ABI 310) durchgeführt. Im Unterschied zum ABI 377 handelt es sich bei dem ABI 310 um ein Kapillarelektrophorese System. Bei dieser Methode werden die Proben durch eine mit Polymer gefüllte Kapillare aufgetrennt. Auch in diesem System werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch einen Laser angeregt und die Signale bei der elektrophoretischen Trennung erfaßt, auf einem Apple Mcintosh Power PC aufgezeichnet und mit der GeneScan-Analyse-Software (Perkin Elmer) ausgewertet.

Für die Kapillarelektrophorese wurden die PCR-Produkte (0,5-1,0 µl) zunächst in speziellen 500-µl-Reaktionsgefäßen (Perkin Elmer) mit einem SSCP-Cocktail luftblasenfrei gemischt. Zu jeder Probe wurde mit dem Cocktail ein interner Längenstandard zugefügt. Im Anschluß wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Proben wurden einzeln 30 min bei 30 °C mit 12 kV in einer mit Polymer gefüllten Kapillare über eine Strecke von 47 cm aufgetrennt. Die Migrationsfolge der DNA-Fragmente der PCR-Produkte sowie des internen Längenstandards war nicht unbedingt Längenkonform. Die denaturierte, einzelsträngige DNA des Längenstandards nimmt ebenso wie die Proben eine dreidimensionale Konformation an, die auf die genaue Basenfolge zurückzuführen ist. Ein Unterschied von einer Base kann bereits zu unterscheidbaren Konformationen führen. Der Längenstandard



ermöglicht daher den Vergleich von Migrationsraten und nicht von Größen. Folgende Chemikalien und Lösungen wurden verwendet:

SSCP-Cocktail :

- 7,2 µl Formamid
- 0,4 µl NaOH
- 0,4 µl interner Längenstandard (Genescan™-350, Rox; Perkin Elmer)

Polymer für die Kapillare:

- 14,3 g GeneScan Polymer (7 % w/w, Perkin Elmer)
- 2,0 g Glycerol
- 2,0 g 10 x TBE
- auf 20 g mit HPLC-Wasser auffüllen.

Das Polymer wurde vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 µm).

*SSCP-Analyse mit radioaktiv markierten PCR-Produkten*

Auch für die radioaktive Analyse war die PCR der Ausgangspunkt. Für die radioaktiven Analysen stand ein Thermocycler zur Verfügung, auf dem alle PCRs durchgeführt wurden. Aus Sicherheitsgründen wurden alle Ansätze hinter Plexiglas angesetzt. Die SSCP-Analyse wurde anfangs mit  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt. Später wurden die 12S rDNA PCR-Produkte mit  $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP markiert. Die Markierung mit  $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP hatte den Vorteil einer geringeren Strahlung und schärferer Banden. Vor der PCR wurden Sense- und Antisense-Stränge der Primer radioaktiv markiert. Der PCR-Ansatz entsprach dem in Abschnitt 2.4.2.1 aufgeführten PCR-Protokoll mit dem einzigen Unterschied, daß radioaktiv markierte Primer verwendet wurden. Die gekühlten PCR-Produkte wurden mit Stop-Puffer (1:1) vermischt und bei 95 °C 15 min denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Danach wurden die Proben gekühlt und auf ein natives Polyacrylamidgel (45 cm, Bio-Rad) aufgetragen. Die Proben wurden 12 h bei 7 Watt aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Nach dem Lauf wurden die Glasplatten vorsichtig hinter einem Plexiglas-Schutzschild so geöffnet, daß das Gel auf einer Platte anhaftete und dann in eine Fixierlösung überführt werden konnte. Das Gel wurde nach der Fixierung auf Whatman-Papier (Schleicher & Schuell) geblottet und für 2 h bei 80 °C im Vakuumtrockner (Bio-Rad) gelassen. Das getrocknete Gel wurde in einer Röntgenkassette auf einen empfindlichen Röntgenfilm (RX, Fuji) gelegt. Die radioaktiv markierten PCR-Produkte wurden über die Schwärzung der hochempfindlichen Filmemulsion, die von der ionisierenden Strahlung verursacht wurde, nachgewiesen. Die Inkubationszeit betrug je nach Stärke der Banden zwischen 2 und 5 Tagen. Der Röntgenfilm wurde 5 min

entwickelt, 2 min fixiert und anschließend getrocknet. Die folgenden Reaktionsansätze und Lösungen waren dazu erforderlich:

Radioaktive Markierung je Primer (für 60 Reaktionen):

3,00 µl	10 x Puffer (one phorall, Pharmacia)
7,50 µl	Primer (10 µM)
4,50 µl	$\gamma$ <sup>32</sup> P-ATP bzw. $\gamma$ <sup>33</sup> P-ATP
2,25 µl	T4 Phosphonukleotid-Kinase (9,3 U/µl; Pharmacia)
12,75 µl	HPLC-Wasser.

Der Cocktail wurde 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß wurde das Enzym 10 min bei 95 °C deaktiviert.

Stop-Puffer:

50,00 ml	Formamid (deionisiert)
18,60 g	EDTA
0,13 g	Bromphenolblau
0,13 g	Xylen Cyanol

Acrylamidgel-Stammlösung (40 %):

145 g	Acrylamid (19:1)
5 g	Methylenbisacrylamid
375 ml	HPLC-Wasser

natives Polyacrylamidgel (7 %):

5 ml	10 x TBE-Puffer
5 ml	Glycerol
17 ml	Acrylamidlösung (40 %)
75 ml	HPLC-Wasser

Polymerisations-Auslöser:

55 µl	TEMED (N-Tetramethylethylendiamin)
733 µl	10 % APS (Ammoniumpersulfat)

Die Gellösung wurde vor dem Gießen durch einen Kaffeefilter filtriert.

Gel-Fixierlösung:

100 ml	Methanol
100 ml	Eisessig
800 ml	dest. Wasser

Filmlösungen

Entwickler (1:5)
Fixierer (1:5)

*SSCP-Analyse mit unmarkierten PCR-Produkten*

Daher wurde eine SSCP-Analyse mit unmarkierten PCR-Produkten etabliert, die durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht wurden. Dazu wurden PCR-Produkte wie in Abschnitt 2.4.2.1 beschrieben hergestellt. Auf einem nativen Polyacrylamidgel mit einer reduzierten Lauflänge von 16 cm und einer Dicke von 0,2 mm (Protean<sup>®</sup> II xi Cell, Bio-Rad) wurden die PCR-Produkte 2 h bei 10 °C und mit 12 W aufgetrennt und durch eine Silberlösung (Bio-Rad) angefärbt. Bei der Silberfärbung werden Silberionen in einer Gelmatrix durch Komplexbildung an die DNA gebunden. Die nicht komplexierten Silberionen werden durch Waschen entfernt. Es sind viele Techniken bekannt, die sich im wesentlichen nur in der Zusammensetzung der Silbersalz- und Entwicklerlösungen unterscheiden. Dieser Nachweis ist 2-5 mal empfindlicher als die Anfärbung mit Ethidiumbromid (Abschnitt 2.4.2.1). Eine Schwierigkeit besteht allerdings in der Handhabung des sehr dünnen Gels. Die Silberfärbung wurde folgendermaßen ausgeführt:

1. Das Gel wurde 30 min mit der Fixierlösung I (400 ml) und anschließend 15 min in der Fixierlösung II (400 ml) inkubiert. Die Fixierlösung II wurde erneuert und das Gel darin für weitere 15 min fixiert.
2. Die Fixierlösung wurde verworfen und das Gel 5 min in einer Oxidationslösung (200 ml) inkubiert und anschließend solange mit nano-pure Wasser (6-10 x) gespült, bis die gelbe Farbe der Oxidationslösung vom Gel verschwunden war.
3. Die Silberlösung (200 ml) wurde für 20 min zugegeben und verworfen. Das Gel wurde kurz mit nano-pure Wasser (400 ml) vorsichtig abgespült.
4. Die Entwicklungslösung (200 ml) wurde hinzugefügt und solange einwirken gelassen (ca. 30-60 sec) bis sich braune Banden abzeichneten. Dieser Vorgang wurde zweimal für jeweils 5 min wiederholt.
5. Die Silberfärbung wurde durch Zugabe der Stopplösung (400 ml) für 5 min abgebrochen.

Die Silberfärbung wurde mit dem Gel auf einer Glasplatte unter ständigem Schütteln durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Gel geblottet, im Vakuumtrockner für 1 h bei 80 °C getrocknet und für die Auswertung fotografiert.

Die folgenden Lösungen wurden verwendet:

Fixierlösung I:

400 ml	Methanol
10 ml	Essigsäure
500 ml	dest. Wasser

Fixierlösung II:

100 ml	Ethanol
50 ml	Essigsäure
850 ml	dest. Wasser

Oxidierlösung:

20 ml	Oxidierer
180 ml	dest. Wasser

Silberlösung:

20 ml	Silber Reagenz
180 ml	Wasser

Entwicklungslösung:

19,2 g	Entwickler
bis 600 ml mit dest. Wasser auffüllen	

Stopplösung:

50 ml	Essigsäure
950 ml	dest. Wasser

#### 2.4.2.4 Aufreinigung der mitochondrialen PCR-Produkte und Sequenzierung

Es wurden mitochondrielle 12S rDNA PCR-Produkte sequenziert (SeqLab, Göttingen), die gleiche und verschiedene Migrationsraten während der Kapillarelektrophorese (Abschnitt 2.4.2.3) zeigten. Auf diese Weise sollten die Ergebnisse der SSCP-Analyse verifiziert werden. Diese PCR-Produkte wurden zuvor mit QIAquick Spin<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Bei diesem Verfahren werden die PCR-Produkte an eine Siliciumgel-Membran in einer Säule adsorbiert. Primer und Verunreinigungen wie z.B. Salze, Enzyme und nicht inkooperierte

Nukleotide werden mit einem Puffer von der Membran gewaschen. Die hochreine DNA wurde mit HPLC-Wasser von der Membran eluiert. Es wurde folgendes Protokoll ausgeführt:

1. Zu 50 µl PCR-Produkten wurden 250 µl eines PB-Puffers gegeben.
2. Eine QIAquick-Spin-Säule mit Membran wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß plaziert, die Probe auf die Membran pipettiert und für 1 min zentrifugiert.
3. Die Lösung im Reaktionsgefäß wurde verworfen.
4. Zum Waschen wurden 0,75 ml PE-Puffer auf die Säule gegeben und diese für 1 min zentrifugiert.
5. Die Lösung im Reaktionsgefäß wurde verworfen. Es wurde bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die Säule in ein sauberes 1,5 ml Gefäß überführt.
6. Die DNA wurde eluiert indem 50 µl HPLC-Wasser zugegeben wurden, 1 min inkubiert und die QIAquick Säule dann für ebenfalls 1 min zentrifugiert wurde.

#### **2.4.2.5 Allozym-Analyse**

Die genetische Variation einer Population kann neben einer Mikrosatelliten- auch mit einer Allozym-Analyse bestimmt werden. Bei der Allozym-Analyse werden primäre Genprodukte (Enzyme) als Indikatoren genetischer Unterschiede verwendet.

Eine unterschiedliche Nukleotidsequenz führt zu geänderten Aminosäuresequenzen und in der Konsequenz zu verschiedenen Sekundärstrukturen von Enzymen. Die Funktionsweise bleibt dabei unbeeinträchtigt. Daher werden Enzyme, die von einem Genort codiert werden, bei unterschiedlicher Struktur jedoch gleiche Funktionsweise besitzen, als Allozyme bezeichnet (Richardson et al., 1986). Durch den Austausch von Aminosäuren mit sauren ( $-\text{COO}^-$ ), basischen ( $-\text{NH}_4^+$ ) oder neutralen Seitenketten kann sich die Gesamtladung eines Enzyms ändern. Dies führt zu einem unterschiedlichen Wanderverhalten im elektrischen Feld und daher zur räumlichen Trennung der Allozyme in Cellulose-Acetat Gelen. Eine Auswertung des Laufverhaltens von Allozymen setzt die Anfärbung der Proteine im Gel voraus. Dabei wird die enzym-spezifische katalytische Aktivität für den Färbeprozess ausgenutzt. Spezifische Reaktionen in Kombination mit bestimmten Reagenzien führen zur Färbung eines Endproduktes und ermöglichen eine Auswertung der Banden.

Während durch die Primärstruktur eines Allozyms die Position der Banden im Gel festgelegt wird, wird die Zusammensetzung der Bandenmuster im wesentlichen von der Quartärstruktur bestimmt. Monomere Enzyme, d.h. Enzyme aus einer Untereinheit, zeigen für den homozygoten, diploiden Organismus eine Bande ( $A_1$  oder  $A_2$ ), da beide Genkopien identisch sind und nur ein Allozym produziert werden kann. Für den heterozygoten, diploiden Organismus hingegen werden zwei Banden beobachtet ( $A_1$  und  $A_2$ ), da zwei verschiedene Allozyme produziert werden. Einige Enzyme treten als Dimere auf, bestehen also aus zwei Untereinheiten. Für diese Allozyme ergeben sich bei einem heterozygoten, diploiden Organismus vier Kombinationsmöglichkeiten ( $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$ ,  $A_2A_1$ ,  $A_2A_2$ ), die zu drei verschiedenen Banden im Gel führen. Da die Kombinationen  $A_1A_2$  und  $A_2A_1$  dieselben Positionen im Gel einnehmen, hat diese Bande die doppelte Intensität. Bei Allozymen aus mehreren Untereinheiten werden für einen heterozygoten, diploiden Organismus dementsprechend für einen Trimer vier und für einen Tetramer fünf Banden exprimiert.

Im Vergleich zur direkten genetischen Analyse unterschätzt die Allozym-Analyse die genetische Varianz aus zwei Gründen. Es besteht die Möglichkeit, daß Unterschiede in der Nukleotidsequenz zwar zu einem Aminosäureaustausch nicht jedoch zu einer Ladungsänderung des Enzyms führen. Andererseits ist der genetische Code degeneriert, d.h. verschiedene Basentriplets codieren für die gleiche Aminosäure. Eine Mutation, die eine Base innerhalb des degenerierten Codes trifft, führt dennoch zur Expression der gleichen Aminosäure. Diese genetischen Unterschiede können somit nicht durch die Allozyme mit einer Elektrophorese unterschieden werden.

#### *Die Allozym-Analyse bei Daphnia*

Die Allozym-Analyse wurde für Daphnien aus der Wassersäule des Belauer Sees (März'98) durchgeführt, um die genetischen Variationen mit den Resultaten der Mikrosatelliten-Analyse vergleichen zu können. Für einige Daphnien wurden beide Analysen durchgeführt. Dazu wurde diesen Daphnien der Kopf mit einem Skalpell abgetrennt, der dann für die Mikrosatelliten-Analyse verwendet wurde. Der Torso wurde für die Allozym-Analyse eingesetzt. Ebenso wie für die Mikrosatelliten-Analyse wurden vier Loci für die Allozym-Analyse untersucht. Beim Aufbau der Analyse und für Ansätze mit der Aldehyd-Oxidase (AO, Enzym Commission Nummer EC 1.2.3.1), Phosphoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2) und Phosphat-6-Glucose Isomerase (PGI, EC 5.3.1.9) wurde nach dem Handbuch „Methodologies for Allo-

zyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis“ (Hebert & Beaton, 1989) vorgegangen. Die Analyse für Glutamatoxaloacetat Transaminase (GOT, EC 2.6.1.1) wurde nach Angaben von Weider et al. (1996) durchgeführt. Frühere Arbeiten (Wolf & Mort, 1986) haben gezeigt, daß GOT bei *D. galeata* und *D. hyalina* fixiert ist, d.h. das *f*-Allel (*fast allele*) ist bei *D. galeata* und das *s*-Allel (*slow allele*) ist bei *D. hyalina* fixiert. Daher wird GOT für die im Belauer See vorkommenden *Daphnia*-Arten zur diagnostischen Unterscheidung verwendet.

Die Analyse wurde auf Cellulose-Acetat Platten (Helena Titan III) mit 12 Positionen durchgeführt. Die Daphnien wurden mittels eines Applikators (Super Z-12; Firma Helena Lab) zu jeweils zwei Reihen von je zehn Tieren aufgetragen. In jeder Reihe wurde als Marker zusätzlich das Homogenat eines *D. galeata*- und das eines *D. hyalina*-Referenzklons aufgetragen. Nach der Auftrennung im elektrischen Feld wurden die Enzyme angefärbt und für kurze Zeit bei 37 °C inkubiert, um die Färbereaktion zu beschleunigen. Die Bandenkombinationen wurden unmittelbar nach der Inkubation der Gele notiert, da bereits nach kurzer Zeit die Farbintensität der Banden abnimmt und die Auswertung der Gele unzuverlässig wird.

## 2.5 Datenanalyse

Durch die Analyse der molekularen Daten konnten zeitliche Populationsstruktur und genetische Variabilität der Daphnien im Belauer See, im Pelagial und im Sediment, dargestellt werden. Die Berechnung von populationsgenetischen Parametern wurde mit Hilfe von verschiedenen Computerprogrammen ausgeführt.

### 2.5.1 Genetische Variation

Einfache Parameter für die Variation und Diversität in einer Population sind die Heterozygotität (Gleichung 2.1) und die Gendiversität (Gleichung 2.2). Die Werte für diese Parameter bewegen sich auf einer Scala von 0, alle Individuen sind gleich, bis 1, alle Individuen sind unterschiedlich. Diese Parameter wurden mit dem Programm *Tools for Population Genetic Analyses* (TFPGA) (Miller, 1997) auf Grundlage folgender Formeln errechnet:

Die durchschnittliche Heterozygotität ( $\tilde{H}$ ) von  $m$  Loci ( $l$ ):

$$\tilde{H} = \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m H_l . \quad (2.1)$$

Die Heterozygotität ( $H$ ) ist definiert als Anteil der heterozygoten Individuen über  $m$  Loci.

Die Gendiversität ( $D$ ) von  $m$  Loci ( $l$ ):

$$D = 1 - \frac{1}{m} \sum_l \sum_u P_{lu}^2 . \quad (2.2)$$

Die Gendiversität wird durch die Quadratsumme der Allelhäufigkeiten gebildet. Dabei ist  $P_{lu}^2$  die Häufigkeit des  $u$ ten Allels des  $l$ ten Locus (Nei, 1978).

Signifikante Unterschiede der Heterozygotitäten zwischen Populationen wurden anhand eines RxC Tests (Row by Column) ermittelt. Zunächst wurden die Populationen (R) und Heterozygotitäten (C) für alle 15 möglichen Kombinationen der vier Mikrosatelliten-Loci eingegeben. Mit dem Programm *Monte* aus dem *The Restriction Enzyme Analysis Package* (McElroy et al., 1991) wurde eine Monte-Carlo Simulation nach Roff & Bentzen (1989) durchgeführt. Aufgrund der wiederholten Datenrandomisierung wurden zufällige  $\text{Chi}^2$ -Werte für die simulierten Datenmatrizen ermittelt. Es wurden jeweils 1000 Replikate für jede Simulation durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit einen  $\text{Chi}^2$ -Wert zu erhalten, der dem für die Originalmatrix entsprach, wurde abgeschätzt.

### 2.5.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE)

Das Hardy-Weinberg Prinzip ist ein idealisiertes Modell, das Genotyp-Verteilungen in einer Population unter bestimmten Voraussetzungen, wie z.B. sexueller Reproduktion, zufälliger Paarung und Abwesenheit von Mutations- und Migrationsereignissen, vorhersagt. Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht HWE können als Hinweis gewertet werden, daß, z.B., selektives Paarungsverhalten oder Selektion auftreten. Mit dem Programm TFPGA (Miller, 1997) wurde mittels eines Exakten Tests (Haldane, 1954) untersucht, ob Populationen signifikante Abweichungen vom HWE zeigen. Mit einem sogenannten Replikat-Test (*Batch*) wurden die Standardfehler der geschätzten Wahrscheinlichkeiten ( $p$ -Werte) berechnet. Nach Guo & Thompson (1992) gibt es im wesentlichen zwei Möglichkeiten einer Annäherung an die tatsächlichen, exakten Wahrscheinlichkeiten: die Markov-Ketten- oder die konventionelle Monte-Carlo-Methode. In dieser Arbeit wurde die Annäherung mittels der konventionellen



Monte-Carlo-Methode versucht. Bei dieser Methode werden multiple neue Datensätze zufällig konstruiert, die die gleichen Allelhäufigkeiten haben wie der Originaldatensatz. Die Wahrscheinlichkeit jedes zufällig konstruierten Datensatzes wurde mit der Wahrscheinlichkeit des Originaldatensatzes verglichen. Der Anteil der zufällig bestimmten Datensätze, deren Wahrscheinlichkeiten kleiner oder gleich der des Originaldatensatzes war, wurde ermittelt und auf diese Weise die Signifikanz des Originaldatensatzes erhalten. Es wurden in der Regel jeweils 10 Replikattests pro Analyse und 1000 Permutationen pro Test durchgeführt. Die Analysen wurden bei hohen Standardfehlern ( $> 0,01$ ) wiederholt und dabei die Zahl der Permutationen und Replikattests erhöht. Die klassischen „Goodness of fit“ Tests ( $\chi^2$ , G-test) können zu unverlässlichen Ergebnissen führen (Miller, 1997), sobald einer oder mehrere Genotypen selten vorkommen.

### 2.5.3 Test auf Genkopplung (Linkage Equilibrium)

Es besteht die Möglichkeit, daß Allele verschiedener Loci sich assoziieren und nicht zufällig sondern gekoppelt, als Kombination (*linked*) weitervererbt werden. Dies setzt entweder die physikalische Nachbarschaft der beiden Loci voraus, was eine Rekombination zwischen diesen Allelen erschwert oder sogar ausschließen kann, oder eine Kombination von Genotypen, die, z.B., selektivem Druck ausgesetzt ist. Das Gleichgewicht (*linkage equilibrium*) bzw. Ungleichgewicht (*linkage disequilibrium*) einer Genkopplung wurde mit dem Programm Arlequin (Schneider et al., 2000) analysiert. Als Null-Hypothese wird angenommen, daß die Genotypen eines Locus unabhängig von den Genotypen eines anderen Locus sind. Die Berechnung basiert auf dem *Expectation-Maximization (EM)* Algorithmus (Dempster et al., 1977) in Kombination mit einem Permutationstest (Slatkin & Excoffier, 1996).

### 2.5.4 Simpson Index

Der Diversitäts Index ( $D$ ) von Simpson (1949) beschreibt die Wahrscheinlichkeit mit der bei einer Probenahme ein zweites Individuum dieselbe Spezies darstellt wie ein erstes Individuum. In dieser Arbeit wurde Simpsons Index auf unterschiedliche Klone eines Taxons anstelle verschiedener Spezies angewendet. Der Index wird folgendermaßen berechnet:

$$C = \sum_i^{S_{obs}} p_i^2, \quad (2.3)$$

wobei  $S_{obs}$  (=  $S_{beobachtet}$ ) die Gesamtanzahl der Spezies bzw. Klone darstellt und streng genommen

$$p_i^2 = \frac{N_i(N_i - 1)}{N_T(N_T - 1)} \text{ ist, gewöhnlich jedoch angenähert wird als: } p_i^2 = \left( \frac{N_i}{N_T} \right)^2.$$

$N_i$  ist die Anzahl der Individuen der  $i$ ten Art bzw. des  $i$ ten Klones und  $N_T$  ist der Gesamtzahl der Individuen in der Probe. Der Index ist dann:

$$D = \frac{1}{C}. \quad (2.4)$$

Simpsons Diversitäts Index hängt sowohl von der Artenanzahl als auch von der Äquitabilität (*Equitability*) der Individuen ab. Für eine gegebene Artenanzahl wird  $D$  mit zunehmend gleichmäßiger Verteilung größer, bei gleichbleibender Verteilung steigt  $D$  mit der Artenanzahl. May (1975) zeigte, daß der Index für Werte, für die  $S_{obs} > 10$  gilt, stark durch die zugrundeliegende Verteilung beeinflusst ist.

Die Gleichmäßigkeit der Verteilung ( $E$ ) wird als Anteil eines maximal möglichen Wertes  $D$  angenommen, der erreicht wird, wenn alle Individuen vollständig gleichmäßig zwischen den Arten verteilt sind. Daraus folgt:  $D_{max} = S_{obs}$ . Die Gleichmäßigkeit der Verteilung wird folgendermaßen berechnet:

$$E = \frac{1}{C} \cdot \frac{1}{S_{obs}}. \quad (2.5)$$

$E$  nimmt Werte zwischen 0 und 1 an.

### 2.5.5 Exakter Test zur Populationsdifferenzierung

Die signifikante Differenzierung von Populationen wird gewöhnlich mit drei statistischen Verfahren untersucht. Ist lediglich ein Locus vorhanden, kann nur eine  $\chi^2$ -Statistik berechnet werden (Workman & Niswander, 1970). Bei mehreren Loci können  $\chi^2$ - und andere Statistiken mit Permutationsverfahren (Hudson et al., 1992; Roff & Bentzen, 1989) oder ein 95 % Konfidenzintervall einer  $F_{ST}$  Abschätzung etabliert werden (Weir & Cockerham, 1984).

Raymond & Rousset (1995) führten ein weiteres Verfahren ein, den Exakten Test für Populationsdifferenzierung. Diese Analyse basiert auf Fischer's RxC Test (Fisher, 1954) und bestimmt, ob signifikante Unterschiede in Allelhäufigkeiten zwischen Populationen bestehen. Der Test analysiert eine Tabelle von R Populationen und C Allelen oder Markern für einen Locus. Dieser Test wurde mit dem Programm TFPGA (Miller, 1997) durchgeführt. Das Programm verwendet die Markov-Ketten-Methode in Kombination mit einer Monte-Carlo-Simulation, um eine Annäherung an die exakten Wahrscheinlichkeiten der Differenzen in den Allelhäufigkeiten zu erhalten. Anstatt alle möglichen Tabellen aufzuführen werden durch die Markov-Kette sämtliche möglichen Fälle untersucht. Dazu wird ein sogenannter *Random Walk* durch alle Zustände der Markov-Kette durchgeführt. Auf diese Weise wird die Wahrscheinlichkeit abgeschätzt, eine Tabelle zu erhalten, die eine geringere oder gleiche Ähnlichkeit mit der Konfiguration der Proben hat. Die Verteilung der Wahrscheinlichkeiten wird unter der Null-Hypothese ( $H_0$ : keine Differenzierung zwischen Populationen) berechnet, ohne daß die Verteilung wesentlich von selten auftretenden Allelen beeinflusst wird.

Durch die Monte-Carlo-Simulation wird die Verlässlichkeit der Ergebnisse ermittelt. Der Exakte Test wurde mit 20 *Batches* und 2000 Permutationen je *Batch* durchgeführt, um den  $p$ -Wert zu schätzen. Bei hohen Standardfehlern ( $> 0,01$ ) wurde die Analyse mit einer erhöhten Permutationszahl wiederholt.

### 2.5.6 Genetische Distanz und Konstruktion genetischer Bäume

Häufig werden Distanzmatrixen erstellt, um phylogenetische Stammbäume zu konstruieren. In dieser Arbeit wurden genetische Distanzen zwischen verschiedenen Probenahmetagen ermittelt. Dazu wurde die sogenannte durchschnittliche-Distanz-Methode (unweighted pair-group method with arithmetic mean; UPGMA) nach Sneath & Sokal (1973) angewendet. Die

genetischen Distanzen wurden basierend auf den Algorithmen nach Nei (1972) berechnet. Dieses genetische Abstandsmaß stellt häufig die Basis für populationsgenetische Arbeiten dar. Es wurde auch in dieser Arbeit verwendet, um vergleichbare Werte zu erhalten. Dem genetischen Abstandsmaß nach Nei (1972) liegen folgende Algorithmen zugrunde:

Die Standard-genetische Distanz ( $D_N$ ):

$$D_N = -\ln\left(\frac{\sum x_i y_i}{\sum x_i \sum y_i}\right). \quad (2.6)$$

An einem bestimmten Locus der Populationen X bzw. Y sind  $x_i$  und  $y_i$  die Frequenzen eines  $i$ ten Allels.

Die UPGMA-Analyse ist eine besondere Form der Cluster-Analyse. Die Voraussetzung, daß sich alle Sequenzen mit der gleichen Evolutionsrate entwickeln, muß erfüllt sein. Ein Baum (oder Phenogramm) der UPGMA-Analyse wird anhand einer Distanzmatrix erstellt, die aus paarweisen Distanzen sogenannter operationaler taxonomischer Einheiten (OTUs), wie z.B. Taxa oder Populationen, gebildet wird. Die Distanzmatrix wird dann nach dem kleinsten Distanzelement untersucht. Die beiden OTUs, die betroffen sind, werden durch einen Knoten an einer bestimmten Position auf der Distanzachse verbunden. Die Summe der Astlängen, die zwei OTUs verbindet, entspricht dem Distanzlevel in der Matrix. Anschließend werden die Distanzelemente verbunden, die den zweit-geringsten Distanzlevel aufweisen usw. Die verbundenen OTUs verlieren ihre individuelle Bedeutung und werden während der weiteren Analyse als ein Cluster betrachtet. Als Folge kann z.B. eine OTU C nicht mehr direkt mit einer OTU A, die Bestandteil des Clusters AB ist, verbunden werden. Das Cluster-Niveau wird bestimmt durch das arithmetische, ungewichtete Mittel der Distanzen zwischen den OTUs AC und BC. Der Prozeß ist dann beendet, wenn die letzten beiden Cluster so verbunden sind, daß alle ursprünglichen OTUs enthalten sind.

Die UPGMA-Analyse wurde mit dem Programm TFPGA (Miller, 1997) durchgeführt. Das Programm bietet die Möglichkeit, eine wiederholte Probenahme mit Zurücklegen (*Bootstrapping*) durchzuführen, um die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu steigern (Felsenstein, 1985).

### 2.5.7 Wright's F-Statistik

Der *fixation*-Index  $F$  (Wright, 1921) ist ein gebräuchlicher Index für die Populationsdifferenzierung. In dieser Arbeit wird der Index  $F_{ST}$  verwendet, um die Differenzierung der Daphnien-Population im Belauer See zu untersuchen. Der Index wird folgendermaßen berechnet:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}. \quad (2.7)$$

In Gleichung 2.7 ist der  $F_{ST}$ -Index definiert durch den Anteil der Heterozygotität der Subpopulationen ( $H_T - H_S$ ) an der totalen Heterozygotität ( $H_T$ ). Die  $F_{ST}$ -Werte wurden nach Wright (1978) interpretiert, so daß der Bereich von:

- 0 bis 0,05 eine geringe,
- 0,05 bis 0,15 eine moderate,
- 0,15 bis 0,25 eine große und
- über 0,25 eine sehr große genetische Differenzierung bedeutet.

Die Analysen wurden mit dem TFPGA-Programm durchgeführt. Die Varianzen wurden durch *Jackknifing* und Konfidenzintervalle (90%, 95%, 99%) durch *Bootstrap* (1000 Wiederholungen) geschätzt.

### 2.5.8 Multivariate Statistik

Bei der multivariaten Statistik werden im Gegensatz zu univariaten Methoden mehrere Variablen ( $\geq 2$ ) gleichzeitig in die Analyse miteinbezogen, denen zu Beginn die gleiche Bedeutung beigemessen wird. In dieser Arbeit wurden zwei Verfahren angewendet, die Prinzipielle-Komponenten-Analyse und die Multidimensionale-Skalierung.

### 2.5.8.1 Prinzipielle-Komponenten-Analyse (PCA)

Die Multivariate Statistik wurde in dieser Arbeit angewendet, um die Populationsstruktur darzustellen. Die Prinzipielle-Komponenten-Analyse (Principal Components Analysis; PCA) wurde erstmalig von Pearson (1901) beschrieben und später von Hotelling (1933) erweitert. Die PCA (Gleichung 2.8) reduziert die Anzahl der Variablen  $X_1, X_2, \dots, X_p$  und kombiniert diese, um unkorrelierte Indizes  $Z_1, Z_2, \dots, Z_p$  zu finden. Die Indizes werden auch als prinzipielle Komponenten bezeichnet:

$$\begin{aligned} Z_1 &= a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1p}X_p \\ Z_2 &= a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2p}X_p. \end{aligned} \tag{2.8}$$

Die Koeffizienten  $a_{ij}$  werden so gewählt, daß sie möglichst viel von der Variation der  $X$  Variablen repräsentieren. Die Voraussetzung ist, daß die Quadratsumme 1 ergibt. Die unkorrelierten Indizes bestimmen verschiedene Dimensionen in den Daten. Dabei gilt:  $\text{var}(Z_1) \geq \text{var}(Z_2) \geq \dots \geq \text{var}(Z_p)$ , wobei  $\text{var}(Z_i)$  die Varianz von  $Z_i$  in den Daten darlegt. Ziel der PCA ist es die Variation in den Daten adäquat durch möglichst wenige  $Z$  Variablen zu beschreiben (weiterführend s. Manly, 1993).

In dieser Arbeit wurde diese Analyse mit dem Programm PCA-Gen (Goudet, 1999) durchgeführt, bei dem die untransformierten, genetischen Daten direkt eingegeben werden. Das Programm errechnet die Zahl der signifikanten Achsen, die globale Differenzierung der Populationen ( $F_{ST}$ -Werte) nach Wright (1943) sowie die Wahrscheinlichkeit  $p$  für den  $F_{ST}$ -Wert nach 10000 Randomisierungen.

### 2.5.8.2 Multidimensionales-Skalieren (MDS)

Multidimensionales-Skalieren (Multidimensional Scaling, MDS) basiert auf einer Matrix von Distanzen. In dieser Arbeit werden Nei's (1972) genetische Distanzen verwendet. Anhand der Distanzen wird eine Graphik konstruiert, welche die Relation der Daten zueinander darstellt. Diese Graphik kann mehr-dimensional sein, wobei eine Darstellung nach der dritten Dimension nicht mehr möglich ist. Die Analyse wurde mit dem Programm Statistika durchgeführt. Dieses Programm nutzt einen Minimierungs-Algorithmus, der die unterschiedlichen Konfigurationen evaluiert, um den *goodness of fit* zu maximieren.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Auswahl und Etablierung der genetischen Methoden**

Für diese Arbeit war es erforderlich, sowohl das Taxon als auch die Klone zu bestimmen. Dazu mußten geringe Mengen DNA ausreichen. Die Auswahl der geeigneten Methoden bzw. Primer und die Optimierung der Methode war ein wichtiger und zeitaufwendiger Bestandteil dieser Arbeit.

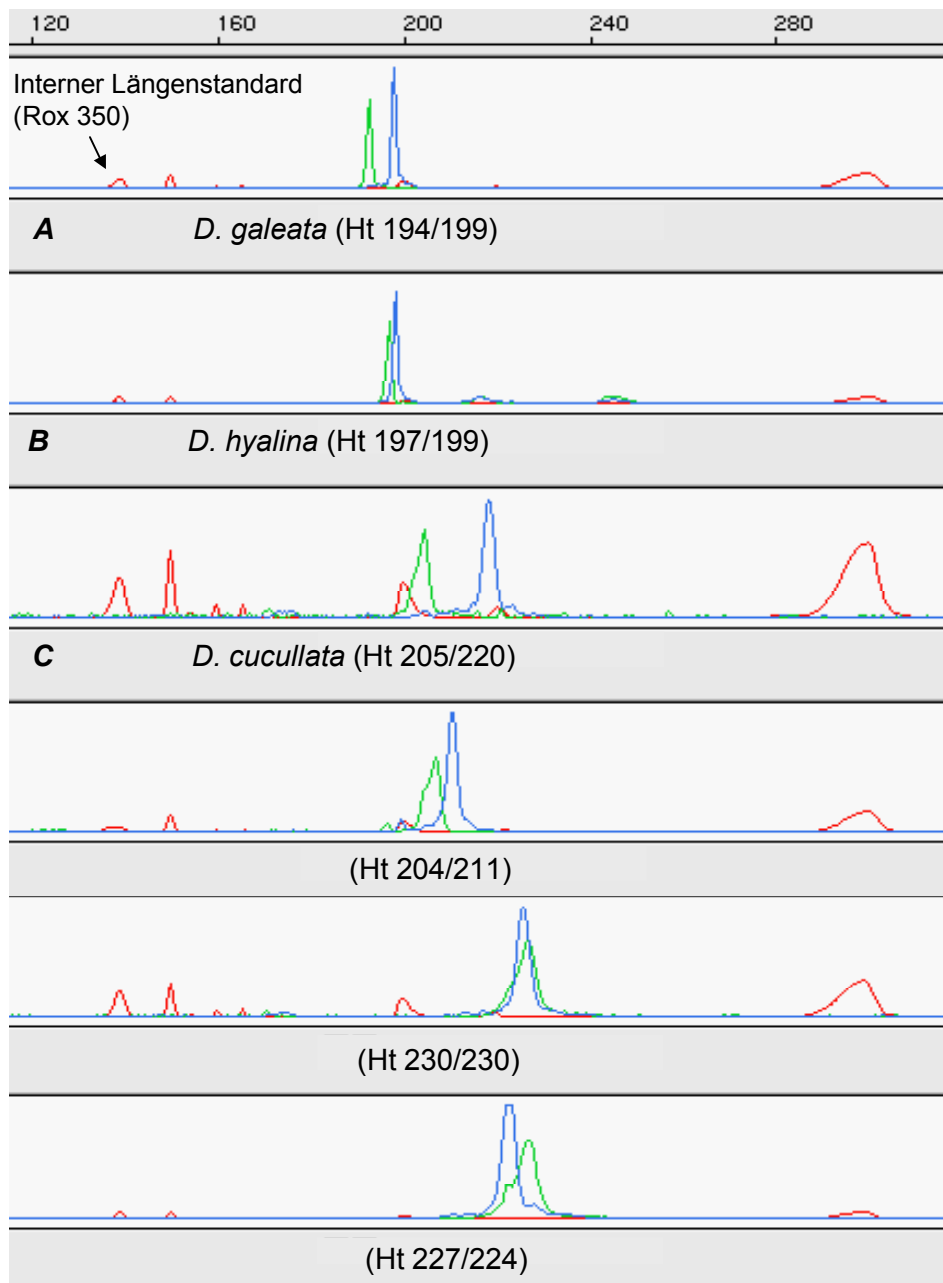
##### **3.1.1 Methode zur Bestimmung der Haplotypen**

Die Haplotypen der mitochondrialen 12S rDNA wurden anhand des SSCP analysiert. Die amplifizierten Sequenzen wurden mit drei verschiedenen Methoden aufgetrennt und visualisiert: 1. mit fluoreszenz-markierten PCR-Produkten, die durch eine Kapillarelektrophorese auf einem automatischen Sequenzierer aufgetrennt wurden, 2. mit radioaktiv-markierten PCR-Produkten, die durch eine Autoradiographie sichtbar gemacht wurden, und 3. mit unmarkierten PCR-Produkten, die mit einer Silberlösung angefärbt wurden. Die Ergebnisse der drei Methoden sind nicht untereinander vergleichbar. Im Verlauf der Arbeit wurde die Methode mit den fluoreszenz-markierten PCR-Produkten etabliert, da diese die beste Auflösung von allen Methoden zeigte. Dennoch soll auch kurz auf die anderen beiden Methoden eingegangen werden.

### 3.1.1.1 SSCP-Analyse mit fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten

Die SSCP-Analyse wurde durchgeführt, um für die drei im Belauer See coexistierenden Taxa die maternalen Linien zu bestimmen. Die effizienteste Methode war die SSCP-Analyse mit fluoreszenz-markierten PCR-Produkten mittels einer Kapillarelektrophorese (Abschnitt 2.4.2.3). Die PCR-Produkte verschiedener maternaler Haplotypen wurden durch charakteristische Migrationsraten erkannt und waren diagnostisch für alle drei Arten. Für *D. galeata* und *D. hyalina* wurde jeweils eine maternale Linie gefunden (Abbildung 3.1). *D. cucullata* hingegen zeigt Varianz in den mitochondrialen 12S rDNA-Sequenzen. In Abbildung 3.1 sind zunächst vier Haplotypen für *D. cucullata* dargestellt. Die 12S rDNA-Fragmente wurden *forward* und *reverse* sequenziert (siehe Anhang), um die Verlässlichkeit der Ergebnisse nach der SSCP-Analyse zu überprüfen. Der Sequenzvergleich zeigt, daß die analysierten DNA-Fragmente der Haplotypen 230/230 und 227/224 identisch waren und sich der Haplotyp 205/220 lediglich durch eine Punktmutation (Position 18) von diesen unterschied. Die Sequenz des Haplotypen 204/211 weist zahlreiche Mutationen zu den übrigen *D. cucullata* 12S rDNA-Sequenzen auf. Diese Ergebnisse wurden durch die Sequenzen mehrerer Individuen bestätigt. Auch die Sequenzen der maternalen Haplotypen von *D. galeata* und *D. hyalina* wurden jeweils anhand mehrerer Individuen überprüft. Dabei fiel bei einem *D. hyalina* Individuum eine Punktmutation (Position 170) im Vergleich zu den anderen *D. hyalina* 12S rDNA-Sequenzen auf, die nicht durch die SSCP-Analyse aufgedeckt wurde. Das ähnliche Migrationsverhalten der 12S rDNA PCR-Produkte von *D. galeata* (Ht 194/199) und *D. hyalina* (Ht 197/199) während der Kapillarelektrophorese dagegen beruht auf unterschiedlichen Sequenzen.





**Abbildung 3.1** SSCP-Analyse mit einer Kapillarelektrophorese

Elektropherogramme von mitochondrialen 12S rDNA PCR-Produkten nach einer SSCP-Analyse für *D. galeata* (A), *D. hyalina* (B) und *D. cucullata* (C). Relativ zu einem internen Längenstandard (Rox 350) wurden die Migrationsraten der Haplotypen (Ht) nach einer Kapillarelektrophorese ermittelt. Den Sequenzen des internen Längenstandards wurden Größen zugeordnet, die als Vergleichswerte für die Benennung der Haplotypen dienen. Der jeweils kleinere, grüne Peak stellt das mit *hex*, der größere, blaue das mit *fam* markierte PCR-Produkt dar.

Mit dem gleichen Verfahren wurden die maternalen Linien weiterer *Daphnia*-Arten und -Klone, die in Kultur gehalten wurden, bestimmt. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die Haplotypen über die getestete Population hinaus diagnostisch sind. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Die 12S rDNA-Sequenzen von kultivierten *D. galeata*- und *D. hyalina*-Klonen aus anderen Seen zeigen übereinstimmende Migrationsraten mit denen der Daphnien aus dem Belauer See. Für den *D. cucullata*-Klon wurde ein bereits beschriebener maternaler Haplotyp ermittelt. Die maternalen Haplotypen anderer Daphnien-Arten dagegen zeigen davon eine abweichende und charakteristische Ausprägung.

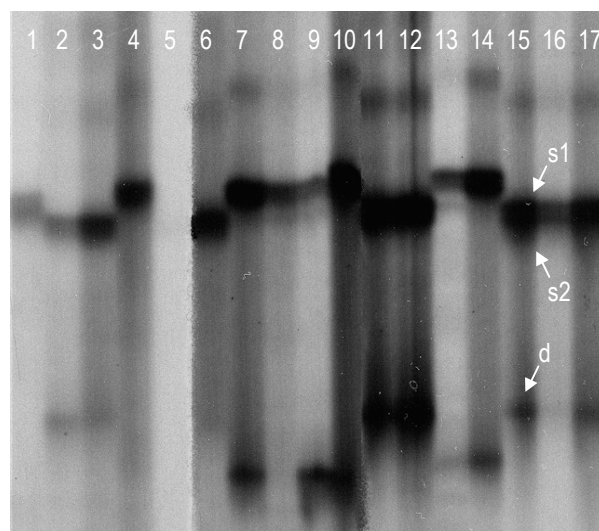
**Tabelle 3.1 Bestimmung maternaler Linien einiger *Daphnia*-Arten**

Bezeichnung der maternalen Haplotypen nach einer SSCP-Analyse für verschiedene Klone von *D. galeata* und *D. hyalina* sowie für jeweils einen Klon weiterer *Daphnia*-Arten. Die Nummer der *D. galeata*- und *D. hyalina*-Klone ist in Klammern gegeben. Die Haplotypen wurden anhand der mit *fam* bzw. *hex* markierten PCR-Produkte relativ zu den Fragmenten eines internen Längenstandards (Rox 350) benannt.

<i>Daphnia</i> -Art	Haplotyp ( <i>hex/fam</i> )
<i>D. galeata</i> (2)	194/199
<i>D. galeata</i> (13)	194/199
<i>D. hyalina</i> (2)	197/199
<i>D. hyalina</i> (7)	197/199
<i>D. hyalina</i> (10)	197/199
<i>D. cucullata</i>	230/230
<i>D. curvirostris</i>	206/206
<i>D. laevis</i>	219/239
<i>D. rosea</i>	198/199
<i>D. pulex</i>	227/239
<i>D. obtusa</i>	224/227
<i>D. ambigua</i>	204/215
<i>D. middendorffiana</i>	224/224
<i>D. magna</i>	219/224
<i>D. lumholtzi</i>	201/214

### 3.1.1.2 SSCP-Analyse mit radioaktiven Isotopen

Die SSCP-Analyse wurde ebenfalls mit radioaktiv-markierten PCR-Produkten durchgeführt (Abschnitt 2.4.2.3). In Abbildung 3.2 sind die Schwärzungen für einzel- und doppelsträngige DNA-Banden zu erkennen. Die beiden Einzelstränge liegen dicht beieinander. Die Bandenmuster für *D. cucullata*, *D. galeata* und *D. hyalina* unterscheiden sich nach 12-stündiger Laufzeit marginal. Zusätzlich variiert das Laufverhalten der DNA-Fragmente in den einzelnen Spuren und erschwert die eindeutige Zuordnung der Bandenmuster zu den maternalen Haplotypen. Aufgrund der umständlichen Handhabung und der geringen Auflösung wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

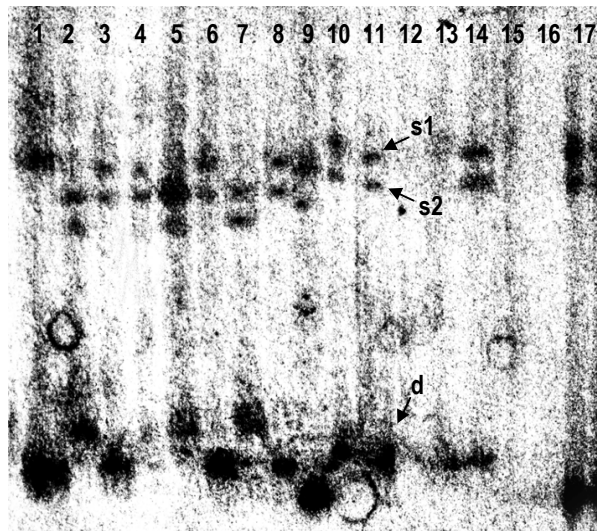


**Abbildung 3.2 SSCP-Analyse mit radioaktiv markierten PCR-Produkten**

Der Ausschnitt aus einem Röntgenfilm nach 12-stündigem Gellauf zeigt die Auftrennung von 12S rDNA-PCR-Produkten, die mit  $\gamma$   $^{32}\text{P}$ -ATP markiert sind, in dicht beieinander liegende einzelsträngige- (s1, s2) und Duplex-DNA (d). SSCP-Analysen wurden durchgeführt für kultivierte *D. hyalina* (Spur 1), *D. galeata*, Klon 13 (Spur 2), *D. galeata*, Klon 2 (Spur 3), *D. cucullata* (Spur 4), negative Kontrolle (Spur 5) und für die Daphnien aus dem Belauer See (März '98) *D. galeata* (Spur 6, 11-12, 15-17) und *D. cucullata* (Spuren 7-10, 13-14).

### 3.1.1.3 SSCP-Analyse nach einer Silberfärbung

Eine weitere Möglichkeit die maternalen Linien zu bestimmen ist eine SSCP-Analyse bei der unmarkierte PCR-Produkte verwendet werden. Diese können nach der Gelelektrophorese mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht werden (Abschnitt 2.4.2.3). In Abbildung 3.3 ist das Ergebnis einer solchen Analyse dargestellt. Die beiden Einzelstränge und der Duplex-DNA Strang, der am weitesten im Gel migriert, sind durch Silberionen angefärbt. Das Bandenmuster ist ähnlich für verschiedene Daphnien-Arten (Spur 2-8). Die amplifizierte DNA der Dauereier ist verhältnismäßig schwach angefärbt. Diese PCR-Produkte wurden durch zwei aufeinanderfolgende PCRs hergestellt, wobei das PCR-Produkt der ersten PCR die Ausgangs-DNA für die zweite PCR bildete (Reamplifikation). Diese Methode wurde aufgrund der geringen Sensibilität nicht weiter verfolgt.



**Abbildung 3.3 SSCP-Analyse mit unmarkierten PCR-Produkten**

Die Abbildung zeigt nach einer 2-stündigen Gelelektrophorese die Auftrennung von unmarkierten 12S rDNA-PCR-Produkten in einzelsträngige- (s1, s2) und Duplex-DNA (d). Mit einer Silberfärbung wurden die PCR-Produkte sichtbar gemacht von *D. pulex* (Spur 1); *D. galeata* (Spur 2, 5, 7), *D. hyalina* (Spur 3, 4, 6, 8), *D. ambigua* (Spur 9), *D. cucullata* (Spur 10), *D. rosea* (Spur 11), *D. pulex* Dauereiern (Spur 12-15), negative Kontrolle (Spur 16) und von *D. lumholtzi* (Spur 17).

### 3.1.2 Mikrosatelliten-Analyse zur Bestimmung der klonalen Struktur

Für die Analyse der klonalen Struktur in einer Population eignen sich Marker, die einen ausgeprägten Polymorphismus zeigen. Daher wurde ein *Multi-Locus-Genotyping* mit Mikrosatelliten als Marker für die genetische Variation etabliert.

#### 3.1.2.1 Auswahl von Mikrosatelliten-Primern

Die Auswahl von Mikrosatelliten-Primern setzt voraus, daß die Primer erstens homologe Sequenzen zu der DNA der untersuchten Taxa haben, daß die Mikrosatelliten zweitens polymorph und letztlich, daß die Loci im Hinblick auf genetische Analysen unabhängig voneinander vererbt werden.

Zunächst wurde versucht, geeignete Mikrosatelliten-Marker für die drei im Belauer See vorkommenden Taxa *D. cucullata*, *D. galeata* und *D. hyalina* zu finden. Die Mikrosatelliten-Loci, die innerhalb dieser Gruppe polymorph waren, wurden dann als genetische Marker ausgewählt. Einige Dpu- und Dma-Mikrosatelliten-Primer, die ursprünglich für *D. pulex* (Subgenus *Daphnia*) und *D. magna* (Subgenus *Ctenodaphnia*) entwickelt worden waren, standen zur Verfügung. Zudem wurden die Marker auch mit anderen Daphnien-Arten verwendet, um die Möglichkeit zu überprüfen, die Marker als universale *Daphnia*-Marker einsetzen zu können. Zunächst wurde versucht PCR-Produkte herzustellen und der Amplifikationserfolg mit Agarosegelen kontrolliert. Anschließend wurde mittels der automatischen Mikrosatelliten-Analyse (Abschnitt 2.4.2.2) überprüft, ob die Genorte polymorph waren. In Tabelle 3.2 sind PCR-Ergebnisse mit den Dpu-Mikrosatelliten-Primern für einige Daphnien-Arten dargestellt. Auf die Darstellung der PCR-Ergebnisse mit den 11 Dma-Primern wurde verzichtet, da bis auf *D. magna* und *D. lumholtzi* größtenteils keine PCR-Produkte nachgewiesen werden konnten.

In Tabelle 3.2 ist zu erkennen, daß die meisten positiven PCR-Ergebnisse mit den Dpu-Mikrosatelliten-Primern für den Subgenus *Daphnia* erhalten wurden. Mit einer Ausnahme zeigt *D. pulex* durchweg positive Ergebnisse, ebenso wie *D. middendorffiana* und *D. obtusa*. Für die Daphnien der *longispina* Gruppe, *D. cucullata*, *D. galeata* und *D. hyalina*, wurden positive Ergebnisse für sechs Mikrosatelliten-Primer erhalten. Insgesamt konnten für diesen Subgenus weniger PCR-Produkte amplifiziert werden. Für *D. magna* konnten lediglich für

fünf, für *D. lumholtzi* nur für einen Mikrosatelliten-Locus PCR-Produkte nachgewiesen werden.

**Tabelle 3.2 PCR-Ergebnisse mit Dpu-Mikrosatelliten-Primern**

Dargestellt sind die PCR-Ergebnisse mit Dpu-Mikrosatelliten-Primern für Daphnien-Arten der Subgenera *Daphnia*, *Hyalodaphnia* und *Ctenodaphnia*. Das Zeichen (✓) symbolisiert eine erfolgreiche PCR. Die PCR-Produkte wurden mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen nachgewiesen. Die Ausgangs-DNA folgender Daphnien-Arten wurde für die PCR verwendet: *D. pulex* (*px*), *D. pulicaria* (*pl*), *D. middendoriana* (*md*), *D. tenebrosa* (*tb*), *D. obtusa* (*ob*), *D. ambigua* (*am*), *D. longispina* (*lo*), *D. laevis* (*la*), *D. curvirostris* (*cv*), *D. rosea* (*ro*), *D. galeata* (*ga*), *D. cucullata* (*cc*), *D. hyalina* (*hy*), *D. magna* (*ma*) und *D. lumholtzi* (*lh*). Die Ergebnisse für die im Belauer See vorkommenden Daphnien-Arten wurden mit \* gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind dunkel unterlegt.

Primer- Bezeichnung	<i>Daphnia</i>						<i>Hyalodaphnia</i>							<i>Cteno- daphnia</i>	
	<i>px</i>	<i>pl</i>	<i>md</i>	<i>tb</i>	<i>ob</i>	<i>am</i>	<i>lo</i>	<i>la</i>	<i>cv</i>	<i>ro</i>	<i>ga</i> *	<i>cc</i> *	<i>hy</i> *	<i>ma</i>	<i>lh</i>
Dpu 6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Dpu 7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓			
Dpu 18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Dpu 24															
Dpu 25	✓	✓	✓	✓	✓		✓								
Dpu 29	✓	✓	✓	✓	✓		✓						✓		
Dpu 30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Dpu 34	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓						
Dpu 40	✓	✓	✓	✓	✓		✓								
Dpu 45	✓	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	✓	✓	✓	
Dpu 46	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
Dpu 64 R	✓		✓		✓										
Dpu 64 F	✓		✓		✓		✓	✓	✓				✓	✓	
Dpu 65	✓	✓	✓	✓	✓		✓								
Dpu 70	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Dpu 122	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Dpu 161	✓	✓	✓		✓	✓	✓								
Dpu 162	✓		✓		✓		✓								
Dpu 191	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
Dpu 192	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Dpu 312	✓		✓		✓										
Dpu 471	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓								
Dpu 472	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓						

Die Proben wurden in fünf *Daphnia*-Typen unterteilt. Die zyklisch parthenogenetische Daphnien-Population im Belauer See setzt sich aus Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), mit Subitaneiern ( $W_S$ ) oder Dauereiern ( $W_D$ ) und Männchen ( $M$ ) zusammen. Als Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ) sind die Daphnien gekennzeichnet, die zum Zeitpunkt der Probenahme keinem

Fortpflanzungs-Modus zugeordnet werden und somit entweder Subitaneier oder Dauereier produzieren konnten. Weiterhin wurden die Dauereier (D) im Sediment und auf der Wasseroberfläche mit berücksichtigt.

Die Loci Dpu 6, 30, 45 und 122 wurden amplifiziert und waren polymorph (Tabelle 3.3). Die Loci Dpu 70 und 192 wurden zwar innerhalb der *D. longispina* Gruppe amplifiziert, waren aber monomorph und daher nicht für die Analyse geeignet. Der Locus Dpu 6 zeigt mit insgesamt 11 Allelen den größten Polymorphismus, gefolgt von Dpu 30 mit 9, Dpu 45 mit 8 und Dpu 122 mit 4 Allelen. Die Anzahl der Allele schwankt sowohl bei den *Daphnia*-Taxa als auch zwischen den *Daphnia*-Typen. Bei *D. hyalina* treten insgesamt 31 der 32 gefundenen Allele für die 4 Loci auf, bei *D. galeata* 29 und bei *D. cucullata* 25. Die größte Anzahl an unterschiedlichen Allelen wurde bei den Dauereiern (D) und den Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ) festgestellt.

**Tabelle 3.3 Allel-Polymorphismus der Mikrosatelliten-Loci**

Polymorphismus der Mikrosatelliten-Allele dargestellt als Anzahl der Allele pro Locus für die drei *Daphnia*-Taxa und die jeweiligen *Daphnia*-Typen: Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), mit Subitaneiern ( $W_S$ ), mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen ( $M$ ) und Dauereier (D). Die Dauereier sind 0 bis etwa 7 Jahre alt und stammen von der Wasseroberfläche, aus der Wassersäule und aus dem Sediment. Die Anzahl ( $n$ ) der analysierten Daphnien ist angegeben. (Für die genauen Allelbezeichnungen jedes Taxons s. Anhang).

<i>Daphnia</i>			Anzahl der Mikrosatelliten-Allele				alle Loci
Taxon	Typ	$n$	Dpu 6	Dpu 30	Dpu 45	Dpu 122	
<i>D. galeata</i>	$W_0$	655	9	5	7	2	23
	$W_S$	433	7	6	4	2	19
	$W_D$	62	4	4	4	2	14
	$M$	27	3	2	5	1	11
	D	820	9	7	7	3	26
	alle	2321	11	8	7	3	29
<i>D. hyalina</i>	$W_0$	657	9	6	8	4	27
	$W_S$	369	9	6	5	3	23
	$W_D$	205	6	4	4	1	15
	$M$	430	6	5	5	1	17
	D	632	9	7	7	3	26
	alle	2489	11	8	8	4	31
<i>D. cucullata</i>	$W_0$	533	8	7	5	2	22
	$W_S$	312	8	6	6	2	22
	$W_D$	4	2	3	3	2	10
	$M$	12	2	2	3	3	10
	D	213	9	5	6	2	22
	alle	1110	9	7	6	3	25
alle Taxa	alle	5920	11	9	8	4	32

Die Allele unterschiedlicher Loci können unabhängig (*linkage equilibrium*) oder abhängig voneinander vererbt werden (*linkage disequilibrium*). Im letzteren Fall sind die Allele verschiedener Loci nicht unabhängig verteilt. Ebenso wie beim HWE können die nicht-zufällige Paarung, Selektionsdruck auf bestimmte Genotyp-Kombinationen oder auch die unmittelbare Nachbarschaft zweier Gene, die eine Rekombination verhindert oder erschwert, einen Einfluß auf die Vererbung haben. Für populationsgenetische Analysen, wie z.B., die Analyse zur genetischen Differenzierung von Populationen (Abschnitt 3.3.2.4), ist eine unabhängige Verteilung bzw. die nicht-gekoppelte Vererbung der Allele Voraussetzung.

Anhand der Daphnien, die im Sommer (Mai '99) und im Herbst (Oktober bis Dezember '99) aufgesammelt wurden, wurden Abweichungen von der unabhängigen Vererbung exemplarisch für alle *Daphnia*-Taxa und -Typen im Belauer See untersucht (Tabelle 3.4). Im Herbst waren alle *D. hyalina*- und *D. cucullata*-Typen vertreten. Allerdings wurden während der gesamten Probenahmezeit in den Jahren '98/'99 lediglich 4 *D. cucullata* mit Dauereiern ( $W_D$ ) und 12 Männchen ( $M$ ) gefunden. Weiterhin wurden im Herbst zwar einige *D. galeata*-Männchen ( $M$ ) jedoch keine ehippien-tragenden *D. galeata*-Weibchen ( $W_D$ ) gefunden. Stellvertretend wurden daher die Daphnien vom Mai '99 analysiert. Die Ergebnisse zeigen zunächst größtenteils für die untersuchten *Daphnia*-Taxa und -Typen signifikante Abweichungen von einer unabhängigen Vererbung. Besonders ausgeprägt zeigt sich dieses Ungleichgewicht für *D. cucullata*.



**Tabelle 3.4 Analyse zur Genkopplung unter Einbezug aller Individuen**

Ergebnisse zur unabhängigen Vererbung der Allele verschiedener Mikrosatelliten (MS)-Loci für die *Daphnia*-Typen: Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), mit Subitaneiern ( $W_S$ ), mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen ( $M$ ) und Dauereier (D). Gegeben sind die exakten Wahrscheinlichkeiten ( $p$ ) mit Standardabweichungen. Die Ergebnisse basieren auf einem Permutationstest mit 100.000 Permutationen. Die Abweichung von der unabhängigen Vererbung ( $p < 0,05$ ) ist mit dem Symbol \* hervorgehoben;  $n$  bezeichnet die Anzahl der Daphnien.

Taxon	MS-Loci	Abweichung von der unabhängigen Vererbung				
		$W_0$	$W_S$	$W_D$	$M$	D
<i>D. galeata</i> ( $n = 297$ )	6/30	0,001 ± 0*	< 0,001*	< 0,001*	0,276 ± 0,004	0,791 ± 0,001
	6/45	< 0,001*	0,419 ± 0,001	0,008 ± 0,001*	0,781 ± 0,002	< 0,001*
	6/122	1	1	0,138 ± 0,003	1	1
	30/45	0,381 ± 0,002	< 0,001*	0,030 ± 0,001*	0,519 ± 0,004	< 0,001*
	30/122	1	1	0,019 ± 0*	1	1
	45/122	1	1	0,008 ± 0,001*	1	1
<i>D. hyalina</i> ( $n = 1133$ )	6/30	< 0,001*	< 0,001*	0,155 ± 0,001	0,589 ± 0,001	< 0,001*
	6/45	0,034 ± 0,001*	0,052 ± 0,001	0,010 ± 0*	0,910 ± 0,001	< 0,001*
	6/122	0,650 ± 0,002	0,413 ± 0,003	< 0,001*	0,155 ± 0,001	< 0,001*
	30/45	0,001 ± 0*	< 0,001	0,470 ± 0,002	0,034 ± 0,001*	< 0,001*
	30/122	0,013 ± 0*	0,085 ± 0,001	0,012 ± 0*	0,022 ± 0*	0,102 ± 0,001
	45/122	0,084 ± 0,002	0,499 ± 0,003	0,762 ± 0,005	0,061 ± 0,001	0,126 ± 0,001
<i>D. cucullata</i> ( $n = 225$ )	6/30	< 0,001*	< 0,001*	1	1	< 0,001*
	6/45	< 0,001*	< 0,001*	1	< 0,001*	< 0,001*
	6/122	< 0,001*	< 0,001*	1	< 0,001*	< 0,001*
	30/45	< 0,001*	< 0,001*	0,009 ± 0,001*	1	< 0,001*
	30/122	0,008 ± 0,001*	< 0,001*	1	1	< 0,001*
	45/122	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*

*Daphnia* reproduziert sich während des größten Teil des Jahres parthenogenetisch, also klonal. Dies führte bei *D. cucullata* dazu, daß bis zu 94 % der Daphnien im Herbst denselben Klon darstellten. Dieser klonale Einfluß wurde in einer weiteren Analyse zur Genkopplung (Tabelle 3.5) ausgeschaltet, indem jeweils nur ein Vertreter jedes Klons in der Analyse berücksichtigt wurde.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Mikrosatelliten-Loci-Kombination der *D. galeata*-Klone für alle *Daphnia*-Typen unabhängig vererbt werden. Bei den *D. hyalina*-Klonen mit Dauereiern ( $W_D$ ) weicht die Mikrosatelliten-Loci-Kombination Dpu 6/122 und bei den Dauereiern (D) die Kombination Dpu 6/45 vom Vererbungs-Gleichgewicht ab. Eine Analyse, bei der die Daphnien in der sexuellen Phase ( $W_D$ ;  $M$ ; D) zusammen betrachtet wurden, ergibt keine signifikanten Abweichungen von einer unabhängigen Vererbung. Ähnliches gilt nach einer Bon-

ferroni-Korrektur (s. Tabelle 3.5). Die *D. cucullata*-Klone zeigen bei den *Daphnia*-Typen und Mikrosatelliten-Loci-Kombinationen eine unabhängige Vererbung der Allele verschiedener Loci. Eine Ausnahme bilden zwar Abweichungen der Kombinationen Dpu 6/30 sowie Dpu 6/122 bei den Männchen (*M*), jedoch wurden nur wenige *D. cucullata*-Männchen ( $n = 12$ ) analysiert. Aufgrund der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß sämtliche Allele der vier Mikrosatelliten-Loci nicht gekoppelt sind, sondern unabhängig voneinander vererbt werden. Dies bildet eine Grundvoraussetzung für weitere Analysen.

**Tabelle 3.5 Analyse zur Genkopplung unter gleichberechtigter Berücksichtigung aller Klone**

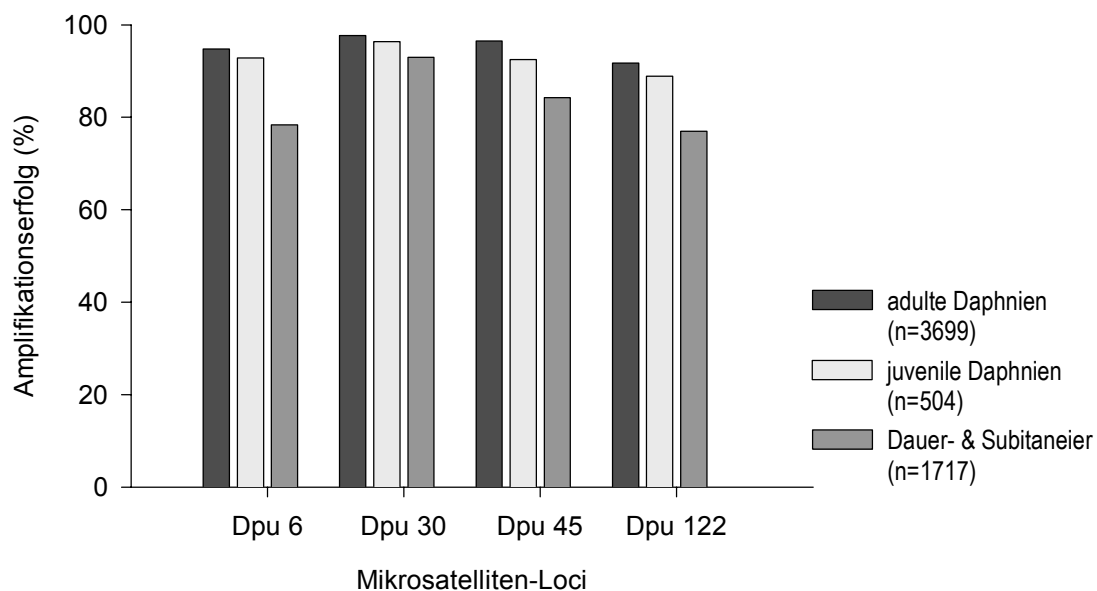
Ergebnisse zur unabhängigen Vererbung der Allele verschiedener Mikrosatelliten (MS)-Loci für die *Daphnia*-Typen: Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), mit Subitaneiern ( $W_S$ ), mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen (*M*) und Dauereier (*D*). Für die Analyse wurde ein Vertreter jedes Klons eingesetzt. Gegeben sind die exakten Wahrscheinlichkeiten ( $p$ ) mit Standardabweichungen. Signifikante Abweichungen von der unabhängigen Vererbung ( $p < 0,05$ ) sind mit dem Symbol \* hervorgehoben. Signifikante Abweichungen nach einer Bonferroni-Korrektur der *Daphnia*-Typen sind fett markiert.

Taxon	MS-Loci	Abweichung von der unabhängigen Vererbung				
		$W_0$	$W_S$	$W_D$	<i>M</i>	<i>D</i>
<i>D. galeata</i>	6/30	0,343 ± 0,002	0,461 ± 0,002	0,408 ± 0,008	0,407 ± 0,004	0,817 ± 0,003
	6/45	0,092 ± 0,002	0,107 ± 0,001	0,565 ± 0,007	0,980 ± 0,001	0,097 ± 0,001
	6/122	1	1	0,409 ± 0,008	1	1
	30/45	0,498 ± 0,006	0,489 ± 0,005	0,574 ± 0,002	0,503 ± 0,006	0,091 ± 0,003
	30/122	1	1	0,057 ± 0,002	1	1
	45/122	1	1	0,093 ± 0,003	1	1
	<i>D. hyalina</i>	6/30	0,097 ± 0,001	0,126 ± 0,001	0,833 ± 0,002	0,635 ± 0,001
6/45		0,175 ± 0,002	0,533 ± 0,003	0,638 ± 0,002	0,903 ± 0,001	0,024 ± 0,001*
6/122		0,966 ± 0,001	0,892 ± 0,002	0,044 ± 0,003*	0,280 ± 0,001	0,058 ± 0,002
30/45		0,472 ± 0,001	0,483 ± 0,003	0,726 ± 0,002	0,815 ± 0,001	0,107 ± 0,003
30/122		0,308 ± 0,003	0,277 ± 0,003	0,085 ± 0,003	0,726 ± 0,002	0,050 ± 0,002
45/122		0,095 ± 0,003	0,888 ± 0,002	0,794 ± 0,003	0,167 ± 0,001	0,106 ± 0,004
<i>D. cucullata</i>		6/30	0,734 ± 0,004	0,410 ± 0,005	1	<b>0,006 ± 0,001*</b>
	6/45	1	1	1	0,231 ± 0,007	1
	6/122	0,884 ± 0,003	0,293 ± 0,007	1	<b>0,006 ± 0,001*</b>	1
	30/45	1	1	0,146 ± 0,009	0,369 ± 0,006	1
	30/122	0,585 ± 0,006	0,859 ± 0,004	1	0,287 ± 0,007	1
	45/122	1	1	1	0,495 ± 0,008	1

### 3.1.2.2 Optimierung der Mikrosatelliten-Analyse

In dieser Arbeit wurden sowohl adulte als auch juvenile Daphnien und Eier analysiert. Die Methode wurde für diese drei Gruppen getrennt optimiert. Aufgrund der verschiedenen DNA-Mengen, die aus den drei Gruppen zur Verfügung standen, wurden die Mikrosatelliten-PCRs mit unterschiedlichem Erfolg durchgeführt.

Der Amplifikationserfolg der vier Mikrosatelliten-Loci Dpu 6, Dpu 30, Dpu 45 und Dpu 122 gestaltete sich unterschiedlich (Abbildung 3.4). Der Mikrosatelliten-Locus Dpu 30 wurde in zwei getrennten PCR-Läufen amplifiziert, einmal mit einem *hex*- und einmal mit einem *ned*-markierten Primer. Durch diese Replikate konnte die Auswertung überprüft werden, da die Übereinstimmung beider Farben als Kriterium genutzt wurde. Dies hatte außerdem zur Folge, daß bei den unterschiedlichen Probengruppen mehr als 92 % der Ausgangs-DNA amplifiziert wurde. Der Locus Dpu 122 mit der geringsten Variabilität wurde auch mit dem geringsten Erfolg (77-92 %) amplifiziert. Der Locus Dpu 45 wurde durchgehend unproblematisch amplifiziert (84-96 %). Der Amplifikationserfolg bei den Dauereiern war grundsätzlich geringer als bei den adulten und juvenilen Daphnien. Insgesamt wurden mehr als 5900 Daphnien analysiert.



**Abbildung 3.4 Amplifikationserfolg bei verschiedenen *Daphnia*-Klassen**

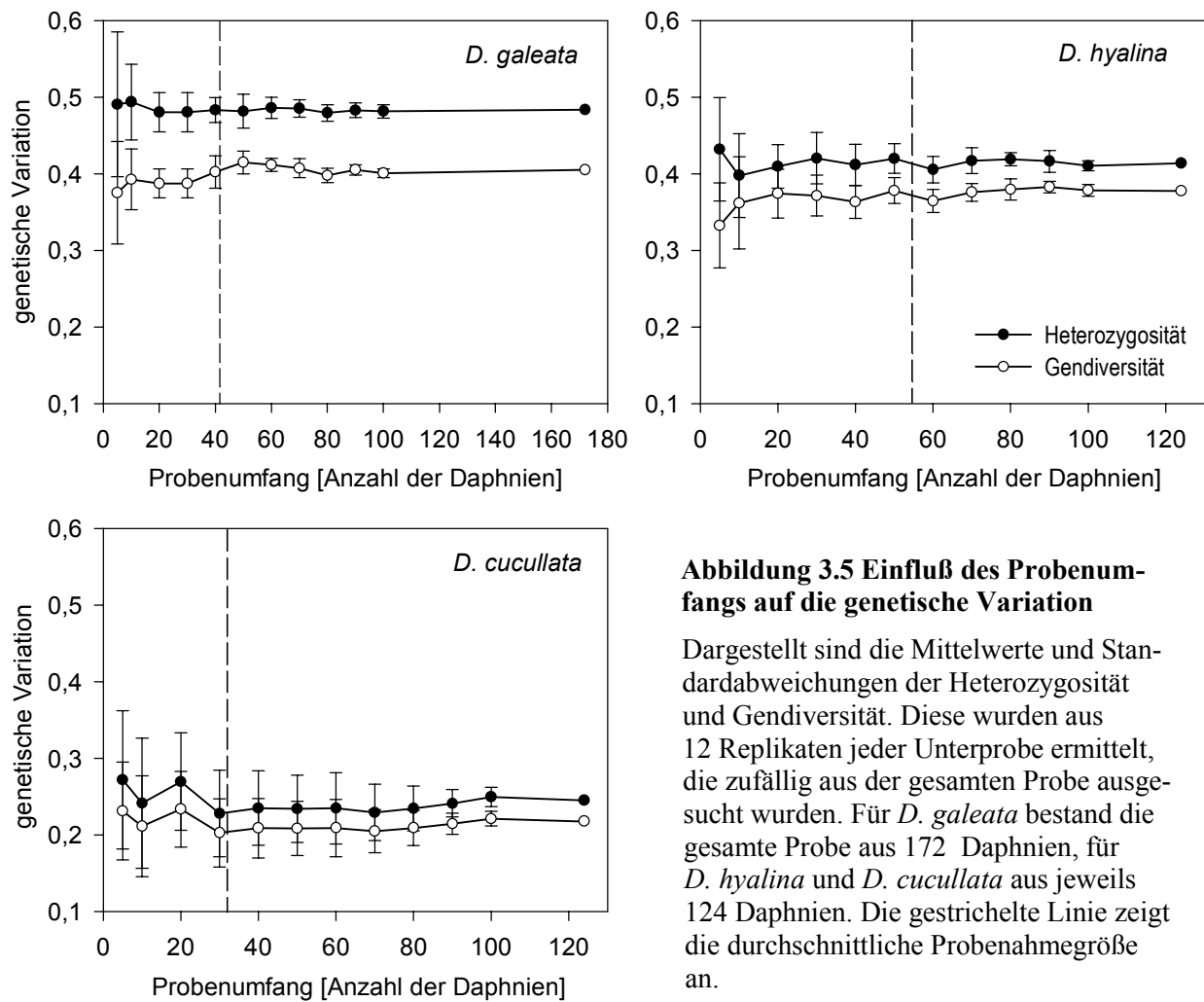
Amplifikationserfolg von vier Mikrosatelliten-Loci für Daphnien, die nach den Analyse-Bedingungen in drei Gruppen eingeteilt wurden: adulte, juvenile und Eier. Unter den adulten Daphnien sind die Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ) oder Dauereiern ( $W_D$ ) und die Männchen ( $M$ ) zusammengefaßt. Als juvenile Daphnien sind alle Daphnien gekennzeichnet, die aus Dauereiern geschlüpft sind. Die Eier setzen sich überwiegend aus Dauereiern (97%) zusammen. Die Anzahl ( $n$ ) der jeweils untersuchten Daphnien ist angegeben.

Ein Ziel dieser Arbeit war die genetische Analyse von Dauereiern, in denen eine geringe Zellzahl und DNA-Menge vorhanden ist. Die Verlässlichkeit der Mikrosatelliten-Analyse wurde an einem gut kontrollierbaren System getestet, den parthenogenetischen Daphnien mit Subitaneiern. In den Subitaneiern wird ebenso wie bei Dauereiern nur eine geringe DNA-Menge erwartet. Aufgrund der parthenogenetischen Entstehung der Subitaneier werden identische Genotypen für Mütter und Töchter angenommen. Insgesamt wurden 18 Mütter mit ihren 2-4 Subitaneiern getrennt analysiert. Dabei zeigte sich, daß bei allen Proben identische Genotypen für Mütter und Töchter festgestellt wurden. Somit bestätigte sich sowohl die Annahme der Parthenogenese als auch die Validität der Methode, selbst bei geringen DNA-Mengen.

### 3.1.2.3 Einfluß des Probenumfangs auf die Genauigkeit der genetischen Analyse

Der Einfluß des Probenumfangs auf die genetische Variation wurde untersucht, um die Aussagefähigkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Dazu wurde aus den Daten von drei Probenahmetagen eine Grundgesamtheit erzeugt aus der jeweils 12 randomisierte Unterproben von 5 bis 100 Daphnien gebildet wurden. Für diese Unterproben wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Heterozygotität und Gendiversität festgestellt (Abbildung 3.5). Die größten Abweichungen vom Mittelwert und die höchsten Standardabweichungen sind bei den kleinsten Unterproben zu beobachten. Die Standardabweichungen nehmen mit zunehmendem Probenumfang ab.

Für *D. galeata* wurden durchschnittlich 41 Individuen pro Probenahme analysiert. Bei diesem Probenumfang sind relativ geringe Standardabweichungen für die Heterozygotität ( $\pm 0,016$ ) und Gendiversität ( $\pm 0,021$ ) zu erwarten. Auch für *D. hyalina* sind bei einer durchschnittlichen Probenahmegröße von 55 Individuen geringe Standardabweichungen für die Heterozygotität ( $\pm 0,018$ ) und Gendiversität ( $\pm 0,016$ ) zu beobachten. Für *D. cucullata*-Proben, die mit durchschnittlich 31 Individuen einen geringeren Probenumfang haben, sind dagegen größere Standardabweichungen für die Heterozygotität ( $\pm 0,057$ ) und Gendiversität ( $\pm 0,044$ ) zu erkennen.



**Abbildung 3.5 Einfluß des Probenumfangs auf die genetische Variation**

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Heterozygotie und Gendiversität. Diese wurden aus 12 Replikaten jeder Unterprobe ermittelt, die zufällig aus der gesamten Probe ausgesucht wurden. Für *D. galeata* bestand die gesamte Probe aus 172 Daphnien, für *D. hyalina* und *D. cucullata* aus jeweils 124 Daphnien. Die gestrichelte Linie zeigt die durchschnittliche Probenahmegröße an.

### 3.1.2.4 Vergleich von Allozym- und Mikrosatelliten-Analyse

Die genetische Variation von Daphnien im Frühling (März '98) im Belauer See wurde sowohl durch eine Allozym- als auch durch eine Mikrosatelliten-Analyse untersucht. Einerseits wurden Daphnien aus einer Probe entweder direkt in die Allozym-Analyse eingesetzt oder für die Mikrosatelliten-Analyse vorbereitet. Andererseits wurden bei einigen Daphnien beide Analysen gleichzeitig durchgeführt, so daß für einzelne Daphnien Daten beider Analysen vorlagen. Exemplarisch sind die Ergebnisse für *D. galeata* dargestellt. In Tabelle 3.6 sind die Allelfrequenzen ( $f$ ) nach der Allozym- und Mikrosatelliten-Analyse abgebildet. Die Allozym-Loci werden durch insgesamt 10, die Mikrosatelliten-Loci, trotz geringerer Probengröße, durch 16 Allele repräsentiert. Der Locus GOT ist für *D. galeata* fixiert und diagnostisch für die Art (s. Abschnitt 2.4.2.5). Der Locus PGM zeigt mit 4 Allelen den größten Polymorphismus bei den Allozym-Markern. Dennoch dominiert ein Allel ( $f > 0,6$ ). Die Dominanz eines Allels ist auch

für die anderen Allozym-Loci charakteristisch. Bei der Mikrosatelliten-Analyse ist Dpu 6 der Locus mit der größten Anzahl an Allelen. Bei *D. galeata* können 5 Allele registriert werden. Für den Locus Dpu 122 dominiert eines der beiden Allele ( $f=0,78$ ) und beim Locus Dpu 45 tritt ebenfalls ein Allel vermehrt ( $f=0,5$ ) auf. Dennoch sind die Mikrosatelliten-Allelfrequenzen gleichmäßiger als die Allozym-Allelfrequenzen verteilt.

**Tabelle 3.6 Vergleich von Allelfrequenzen für *D. galeata***

Allelfrequenzen nach Allozym- und Mikrosatelliten-Analysen für *D. galeata*, die im März '98 aus dem Belauer See aufgesammelt wurden ( $n$  = Anzahl der Daphnien). Dargestellt sind die relativen Mobilitäts-Klassen der Allozyme (slow slow; slow; medium; fast) und die Länge der Mikrosatelliten-PCR-Produkte.

Allel-Nr.	Allozym	rel. Mobilitäts-Klasse	Allozym-Allelfrequenz $n=38$	Mikrosatellit	PCR-Produkt [Bp]	Mikrosatelliten-Allelfrequenz $n=21$
1	PGM	ss	0,020	Dpu 6	121	0,275
2		s	0,094		125	0,175
3		m	0,641		127	0,125
4		f	0,250		135	0,250
5		—	—		137	0,175
1	AO	s	0,143	Dpu 30	141	0,167
2		m	0,071		147	0,214
3		f	0,786		149	0,143
4		—	—		153	0,119
5		—	—		155	0,357
1	GOT	f	1,000	Dpu 45	125	0,214
2		—	—		129	0,214
3		—	—		135	0,071
4		—	—		137	0,500
1	PGI	s	0,211	Dpu 122	98	0,214
2		m	0,790		101	0,786

In der gleichen Population wurde durch die Mikrosatelliten-Analyse eine größere Anzahl von Allelen als durch die Allozym-Analyse ermittelt. Die Auswirkung der unterschiedlichen Analysen auf die ermittelte genetische Variation der Population wird im folgenden untersucht. Als Parameter für genetische Variation wurden die Heterozygotität ( $H$ ) und Gendiversität ( $D$ ) betrachtet. Zudem wurde untersucht, wie sich die Population nach beiden Analyseverfahren zum Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) verhält.

In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse für die genetische Variation zusammenfassend für alle und getrennt für einzelne Loci dargestellt. Für *D. galeata* werden nach der Mikrosatelliten-Analyse hohe Werte für die Heterozygotität und Gendiversität ( $H = 0,70$ ;  $D = 0,70$ ) über alle Loci erzielt, die nach der Allozym-Analyse deutlich geringer ausfallen ( $H = 0,31$ ;  $D = 0,30$ ). Diese vergleichsweise niedrigen Werte sind teilweise auf den Locus GOT zurückzuführen, der fixiert ist. Ohne die Berücksichtigung des Locus GOT ergeben sich höhere Werte ( $H = 0,41$ ;  $D = 0,40$ ) als zuvor. Anschließend wurde mit dem Programm Monte (Roff & Bentzen, 1989) anhand einer Monte-Carlo-Simulation in Kombination mit einem  $\chi^2$ -Test (Abschnitt 2.5.1) überprüft, ob die ermittelten Heterozygotitäten nach der Allozym-Analyse signifikant geringer als nach der Mikrosatelliten-Analyse waren. Die Unterschiede zwischen den Heterozygotitäten sind signifikant ( $p < 0,001$ ). Für *D. galeata* stellen die Mikrosatelliten-Loci Dpu 6 und Dpu 30 die genetischen Marker mit den meisten Allelen (Tabelle 3.6) und der größten Variation ( $H = 0,95$ ;  $D = 0,7$ ) dar. Analog dazu ist der Locus PGM bei den Allozymen mit den meisten Allelen und der größten genetischen Variation vertreten ( $H = 0,57$ ;  $D = 0,52$ ).

Die Überprüfung auf Abweichung vom HWE zeigt nach der Mikrosatelliten- und Allozym-Analyse übereinstimmende Ergebnisse. Jeweils zwei Loci, Dpu 6 und Dpu 30 bei den Mikrosatelliten sowie PGM und AO bei den Allozymen, befinden sich nicht im HWE. Die verbleibenden Loci der Mikrosatelliten befinden sich im HWE, ebenso wie der Locus PGI bei den Allozymen. Der Locus GOT ist durch ein Allel fixiert und daher für diese Berechnungen nicht relevant.

Einigen Daphnien wurde mit einem Skalpell der Kopf abgetrennt, der für die Mikrosatelliten-Analyse verwendet wurde. Gleichzeitig wurde der Körper für die Allozym-Analyse genutzt. Für die Daphnien, an denen beide Marker-Systeme gleichzeitig angewendet wurden, wurden vergleichbare Ergebnisse für die Gendiversität und Heterozygotität festgestellt wie diese nach der Anwendung der beiden Marker-Systeme auf unterschiedliche Daphnien erzielt wurden (Tabelle 3.7). Dies belegt, daß die Ergebnisse durch die Analysen und nicht durch die unterschiedlichen Proben gegeben sind. Für eine getrennte Darstellung waren jedoch zu wenige Daphnien vorhanden.

### Tabelle 3.7 Genetische Variation von *D. galeata* in einer Frühlingspopulation

Heterozygotität, Gendiversität und Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWE) mit Standardfehlern. Diese Parameter wurden mit Allozym- (A) bzw. Mikrosatelliten-Markern (M) für *D. galeata* vom März '98 ermittelt. Die Anzahl der Daphnien betrug 38 für die Allozym-Analyse und 21 für die Mikrosatelliten-Analyse. Das Zeichen \* hebt die signifikante Abweichung vom HWE hervor.

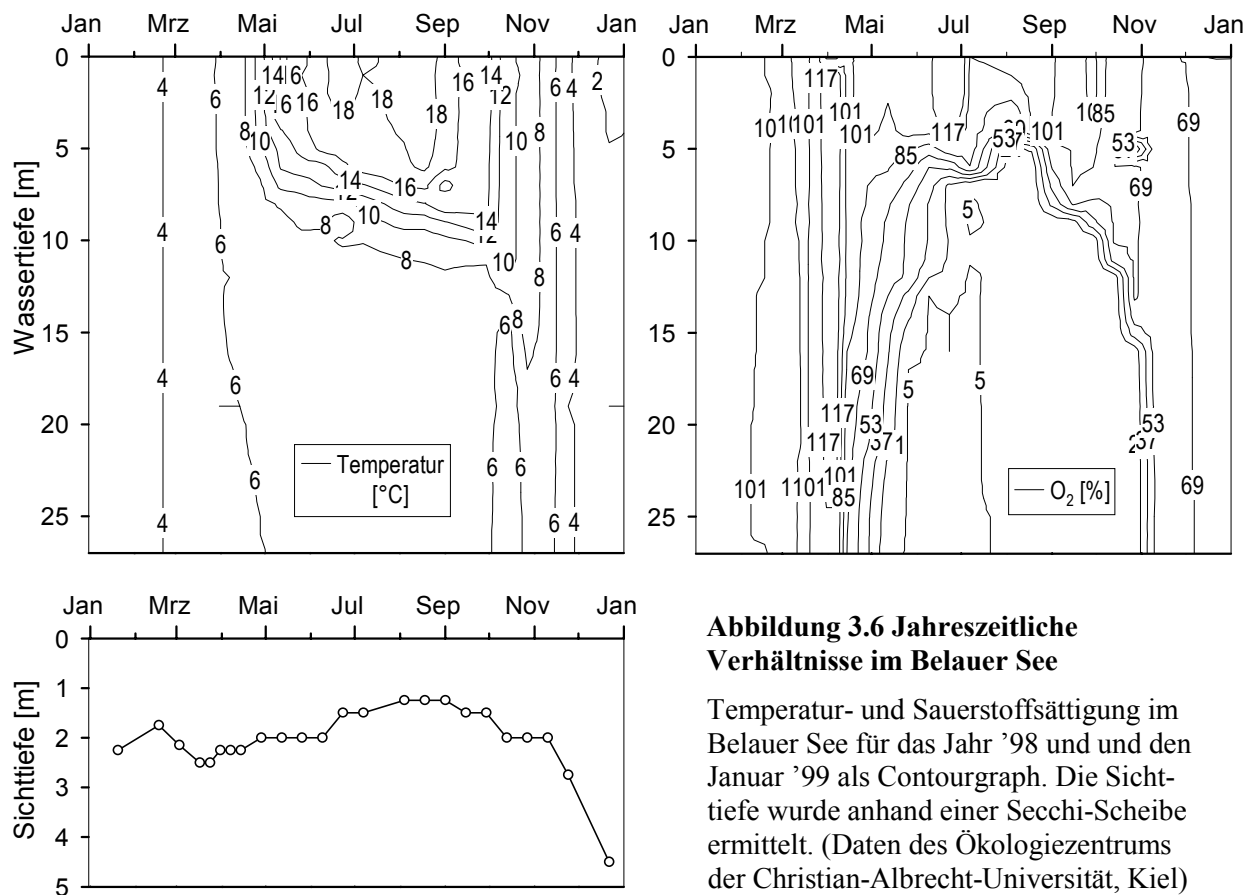
A/M	Heterozygotität		Gendiversität		Abweichung von HWE	
	A	M	A	M	A	M
PGM/Dpu 6	0,57	0,95	0,52	0,79	0,020 ± 0,004 *	0,032 ± 0,003 *
AO/Dpu 30	0,29	0,95	0,36	0,76	0,001 ± 0,001 *	0,039 ± 0,009 *
PGI/Dpu 45	0,37	0,62	0,33	0,65	1	1
GOT/Dpu 122	—	0,43	—	0,34	—	0,186 ± 0,013
über alle Loci	0,31	0,73	0,30	0,63		



### 3.2 Saisonale Entwicklung der genetischen Struktur von *Daphnia* im Belauer See

#### 3.2.1 Unterteilung der saisonalen Entwicklung anhand der abiotischen Parameter im Belauer See

Die saisonale Entwicklung im Belauer See wurde anhand der drei abiotischen Parameter Temperatur-, Sauerstoffsättigung und Sichttiefe des Jahres 1998 (Abbildung 3.6), in drei verschiedene saisonale Abschnitte unterteilt, Herbst, Frühling und Sommer.



**Abbildung 3.6 Jahreszeitliche Verhältnisse im Belauer See**

Temperatur- und Sauerstoffsättigung im Belauer See für das Jahr '98 und den Januar '99 als Contourgraph. Die Sichttiefe wurde anhand einer Secchi-Scheibe ermittelt. (Daten des Ökologiezentrums der Christian-Albrecht-Universität, Kiel)

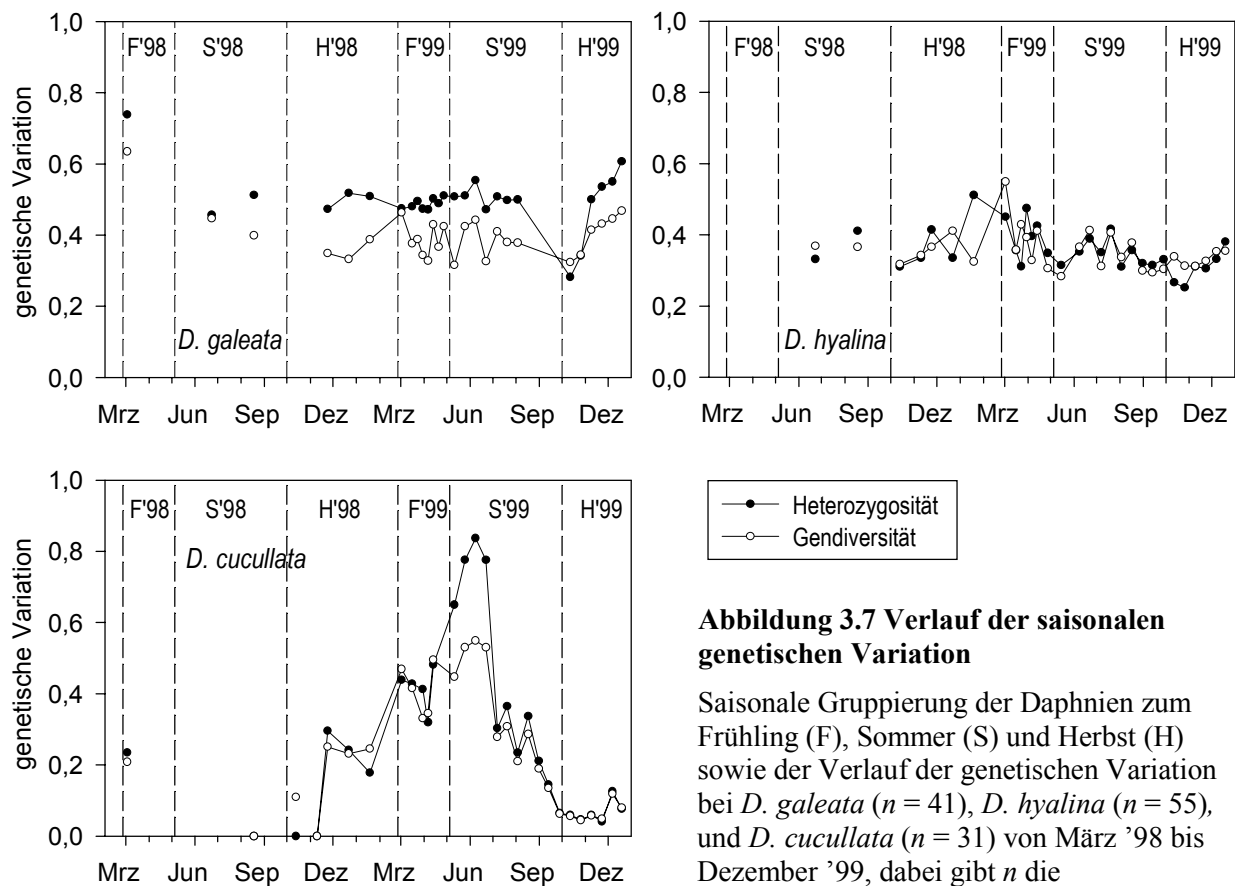
Die abiotischen Parameter für das Jahr '98 wurden freundlicherweise vom Ökologiezentrum der Christian-Albrechts-Universität (Kiel) bereitgestellt. Da die saisonale Entwicklung in Norddeutschen Seen auch über mehrere Jahre relativ stabil ist (Kreis-Plön, 1998), wird die saisonale Unterteilung auch als Anhaltspunkt für das Jahr 1999 betrachtet. In Abbildung 3.6 ist zu erkennen, daß der See bis zum März Temperaturen um 4 °C aufweist. Bis Ende März ist

der Belauer See homotherm und zeigt einen orthograden Verlauf der Sauerstoffkurve. In diesem Stadium liegen die höchsten Sichttiefen mit 2,5 m ebenfalls im März. Im April beginnt sich der See zu stratifizieren. Es kommt zur Ausbildung eines stabilen Epilimnions. Die Sommerstagnation hat bis Ende September bestand. Während dieser Phase sinkt die Sauerstoffsättigung im Hypolimnion auf bis zu 3 % ab. Nach der Sommerstagnation ist der See im November erneut sowohl homotherm als auch der Verlauf der Sauerstoffkurve orthograd. Sie reduziert sich auf 1,25 m im August und September und nimmt mit Beginn der Zirkulation wieder zu. Die Sichttiefe erreicht ein Maximum von 4,5 m im Dezember '98. Eine dünne Eisschicht bedeckte Ende Dezember '98 für wenige Tage den Belauer See und im Februar '99 bildete sich eine begehbare Eisdecke für etwa 8-10 Tage. Während dieser Zeit konnten keine Zooplanktonproben entnommen werden.

Anhand dieser Daten wurde die saisonale Entwicklung in drei Abschnitte untergliedert. Der Herbst und Winter beginnen nach dem Ende der Sommerstagnation (Oktober - Februar). Da besonders für den Winter (Januar - Februar) nur wenige Daten vorliegen, wird der Winter in den Herbst miteinbezogen. Der Frühling umfaßt den Zeitraum nach dem Schmelzen der Eisdecke bis zur Sommerstagnation (März - April). Kennzeichnend für den Sommer ist die Stagnation im See (April - Oktober). Dadurch wurde die Population in drei saisonale Gruppen untergliedert, um den Verlauf der genetischen Variation im Zusammenhang mit der jahreszeitlichen Entwicklung im Belauer See zu analysieren.

### **3.2.2 Saisonale Entwicklung der genetischen Variation der Daphnien im Belauer See**

Der Verlauf der genetischen Variation von zyklisch parthenogenetischen Daphnien im Belauer See wurde untersucht. Daphnien wurden vereinzelt im Jahre 1998 und regelmäßig 1999 aus dem Belauer See entnommen (Abschnitt 2.2). Für die Population im Belauer See sind die saisonale Gruppierung (Abschnitt 3.2.1) und die Ergebnisse für die genetischen Parameter in Abbildung 3.7 dargestellt. Der Verlauf von Heterozygotität ( $H$ ) und Gendiversität ( $D$ ) verhält sich annähernd synchron.



**Abbildung 3.7 Verlauf der saisonalen genetischen Variation**

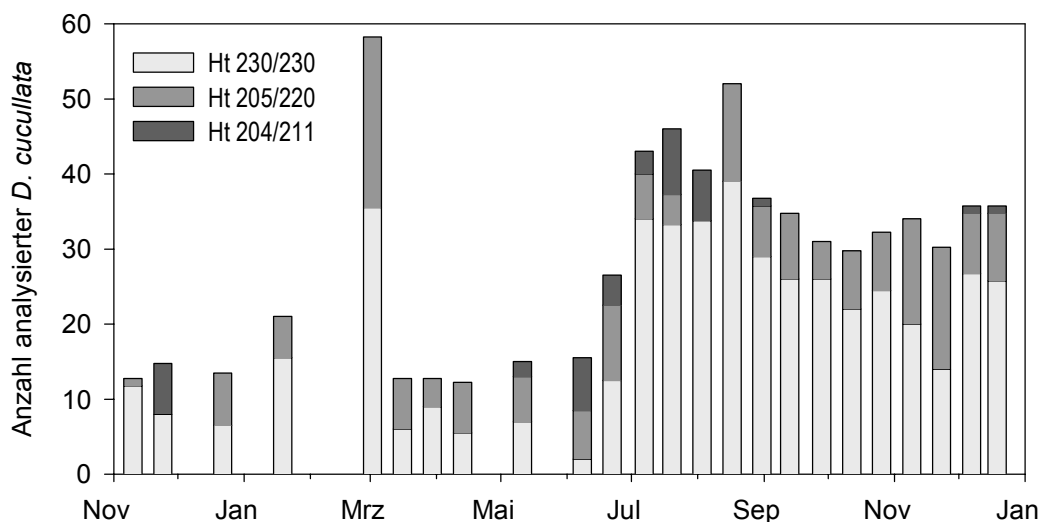
Saisonale Gruppierung der Daphnien zum Frühling (F), Sommer (S) und Herbst (H) sowie der Verlauf der genetischen Variation bei *D. galeata* ( $n = 41$ ), *D. hyalina* ( $n = 55$ ), und *D. cucullata* ( $n = 31$ ) von März '98 bis Dezember '99, dabei gibt  $n$  die durchschnittliche Anzahl der Daphnien pro Probenahmetag an. Probenahmetage, für die weniger als 10 Daphnien eines Taxons in der Probe gefunden wurden, blieben für dieses Taxon unberücksichtigt.

Bei *D. galeata* wurden geringere Mittelwerte für die Gendiversität ( $D = 0,4 \pm 0,07$ ) als für die Heterozygotie ( $H = 0,51 \pm 0,07$ ) ermittelt. Die Ergebnisse für die Frühlings-Daphnien vom März '98 zeigen die höchsten Werte für die genetische Variation ( $H = 0,74$ ;  $D = 0,63$ ). Verglichen dazu ist der Anstieg der Heterozygotie ( $H_{\max} = 0,63$ ) für die Herbst-Daphnien im Dezember '99 weniger ausgeprägt. Bis auf diese Ausnahmen bewegen sich beide Parameter ohne bezeichnende Schwankungen um die Mittelwerte.

Für *D. hyalina* ist der Verlauf der Heterozygotie und der Gendiversität nahezu identisch. Vergleichbar mit *D. galeata* bewegen sich die Kurven ebenso ohne ausgeprägte Schwankungen um einen Mittelwert ( $H = 0,38 \pm 0,07$ ;  $D = 0,36 \pm 0,06$ ). Maximale Werte werden für Daphnien im Januar und März '99 erzielt, wobei die Gendiversität höher ( $D_{\max} = 0,55$ ) als die Heterozygotie ( $H_{\max} = 0,51$ ) ist.

Wesentlich ausgeprägtere Schwankungen sind bei *D. cucullata* zu beobachten. Im August und November '98 wurde eine sehr geringe Heterozygotität und Gendiversität vorgefunden. Bis zum Sommer nimmt die genetische Variation der Daphnien zu und erreicht im Juni '99 maximale Werte ( $H = 0,84$ ;  $D = 0,55$ ). Auf diesen Anstieg folgt die Abnahme der Variation, die erneut im Dezember '99 in äußerst geringer Heterozygotität und Gendiversität resultiert. Im folgenden wird die genetische Variation von *D. cucullata* näher betrachtet.

Die Population von *D. cucullata* setzt sich im Belauer See aus drei maternalen Linien, Ht 204/211, 205/220 und 230/230, zusammen (s. Abschnitt 3.1.1.1), die morphologisch nicht zu unterscheiden sind. Insgesamt wurden 845 *D. cucullata* untersucht. Der maternale Haplotyp 230/230 macht 67,7 % der analysierten *D. cucullata* aus, gefolgt von dem Haplotypen 205/220 mit 27,2 %. Im Gegensatz zu diesen beiden Haplotypen wurde der Haplotyp 204/211 mit 5,1 % lediglich gelegentlich in 11 von 27 analysierten Populationen gefunden (Abbildung 3.8). Die maximalen Heterozygotitäten und Gendiversitäten (Abbildung 3.9) wurden für den Zeitraum von Mitte April bis Ende Juni '99 ermittelt, während dessen alle drei maternalen Linien in den Proben vorgefunden wurden.

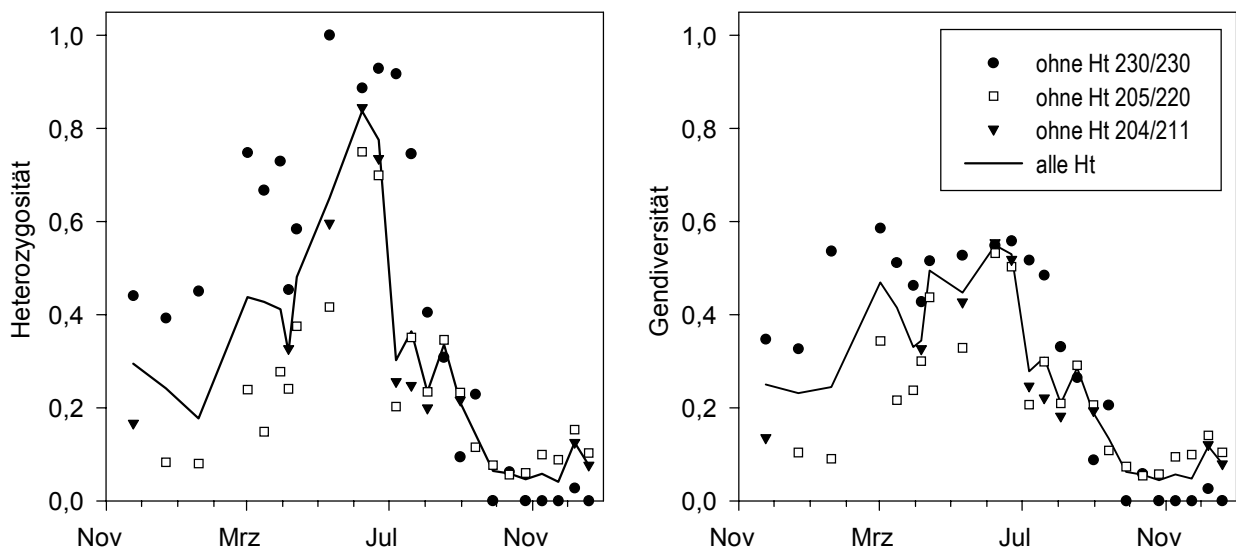


**Abbildung 3.8 Anteil der maternalen Linien der *D. cucullata*-Population**

Dargestellt ist die Anzahl der analysierten *D. cucullata* und der jeweiligen *D. cucullata*-Haplotypen (Ht) von November '98 bis Dezember '99.

In Abbildung 3.9 ist der Verlauf der genetischen Variation der gesamten Population und der Verlauf in Abwesenheit jeweils eines Haplotyps dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß für

*D. cucullata*, die im Zeitraum von Januar bis Oktober '99 aufgesammelt wurden, höhere Heterozygotitäten und Gendiversitäten ermittelt wurden, sobald der Haplotyp 230/230 aus der Analyse entfernt wurde. Im April wurde sogar der Maximalwert von 1 erreicht, der allerdings auf wenigen Individuen ( $n = 8$ ) basierte. Die analysierten Daphnien setzten sich in diesem Zeitraum größtenteils aus dem Haplotyp 230/230 zusammen. Die Anzahl der verbliebenen Daphnien war relativ gering ( $n < 6$ ; siehe dazu auch Abbildung 3.5). Im Gegensatz zum Haplotyp 230/230 nahm in diesem Zeitraum die genetische Variation bei Abwesenheit des Haplotyps 205/220 ab. Die Abwesenheit des seltener auftretenden Haplotyps 204/211 führte zu einer Abnahme der Heterozygotität und der Gendiversität. Der Verlauf der genetischen Variation bei *D. cucullata* zeigt, daß kein Haplotyp die genetische Variation absolut dominiert. Dennoch wird klar, daß die Veränderung der genetischen Variation nicht auf eine Änderung in der Haplotyp-Zusammensetzung zurückzuführen ist, sondern sich in allen Haplotypen widerspiegelt. Für die genetischen Analysen muß daher nicht zwischen den einzelnen maternalen Linien unterschieden werden.



**Abbildung 3.9 Einfluß der maternalen Haplotypen auf die genetische Variation**

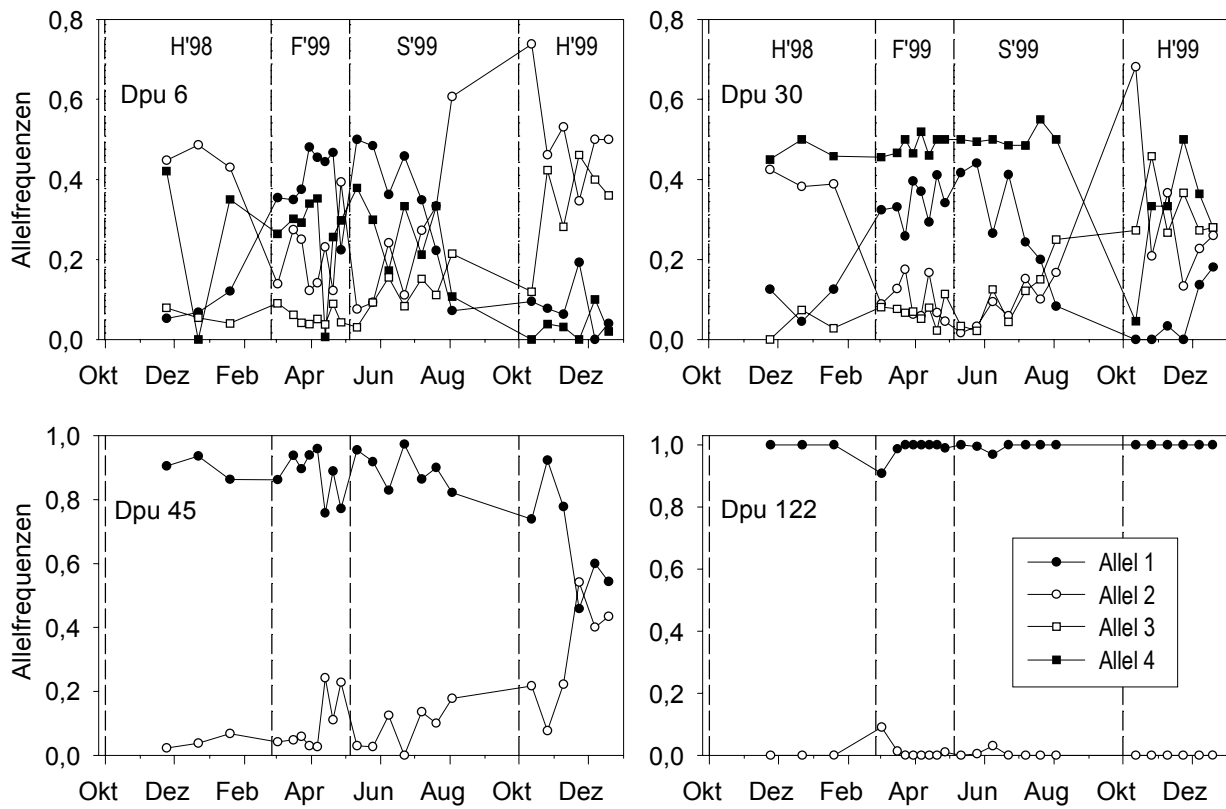
Die genetische Variation von maternalen *D. cucullata*-Linien dargestellt von November '98 bis Dezember '99. Gezeigt ist die Heterogenität in Anwesenheit aller und Abwesenheit jeweils eines Haplotyps (Ht).

### 3.2.3 Saisonale Entwicklung der Mikrosatelliten-Allelfrequenzen

In Abbildung 3.10 sind die Frequenzen der häufigsten Allele ( $f_{max}$ ) für *D. galeata* im Untersuchungszeitraum dargestellt. Für den Locus Dpu 6 ist zu erkennen, daß Allel 1 im Frühling und Sommer am häufigsten ist ( $f_{max} = 0,48$ ), im Herbst jedoch entweder überhaupt nicht, oder aber mit geringeren Frequenzen ( $f_{max} = 0,19$ ) auftritt. Weniger ausgeprägt ist dieser Verlauf für Allel 4 zu erkennen. Dieses Allel tritt vorwiegend vom Herbst '98 bis Sommer '99 ( $f_{max} = 0,38$ ) auf, während es im Herbst kaum vertreten ist ( $f_{max} = 0,04$ ). Die Allele 2 und 3 zeigen den umgekehrten Fall. Allel 2 tritt mit hohen Frequenzen im Frühling und im Spätsommer auf ( $f_{max} = 0,61$ ), erreicht im Mittel aber die höheren Frequenzen und die maximale Frequenz ( $f_{max} = 0,74$ ) im Herbst. Allel 3 tritt bis zum Herbst'99 mit geringeren Frequenzen ( $f_{max} = 0,16$ ) auf. Im Herbst'99 ist es dann mit deutlich höheren Frequenzen ( $f_{max} = 0,46$ ) vertreten. Die Allele 2 und 3 sind im Herbst'99 dominierend.

Für den Locus Dpu 30 zeigt Allel 1 ( $f_{max} = 0,42$ ) die höchsten Frequenzen im Frühling und Sommer und wird bei Daphnien im Herbst mit geringeren Frequenzen ( $f_{max} = 0,18$ ) vorgefunden. Im Gegensatz dazu zeigt Allel 3 vom Herbst '98 bis zum Sommer '99 geringere Frequenzen ( $f_{max} = 0,25$ ) und erreicht im Herbst im Mittel die höheren Werte ( $f_{max} = 0,46$ ). Allel 2 ist mit den größten Frequenzen im Herbst '98 sowie im Herbst'99 ( $f_{max} = 0,68$ ) vertreten. Allel 4 ist im gesamten saisonalen Verlauf mit höheren Frequenzen präsent ( $f_{max} = 0,55$ ).

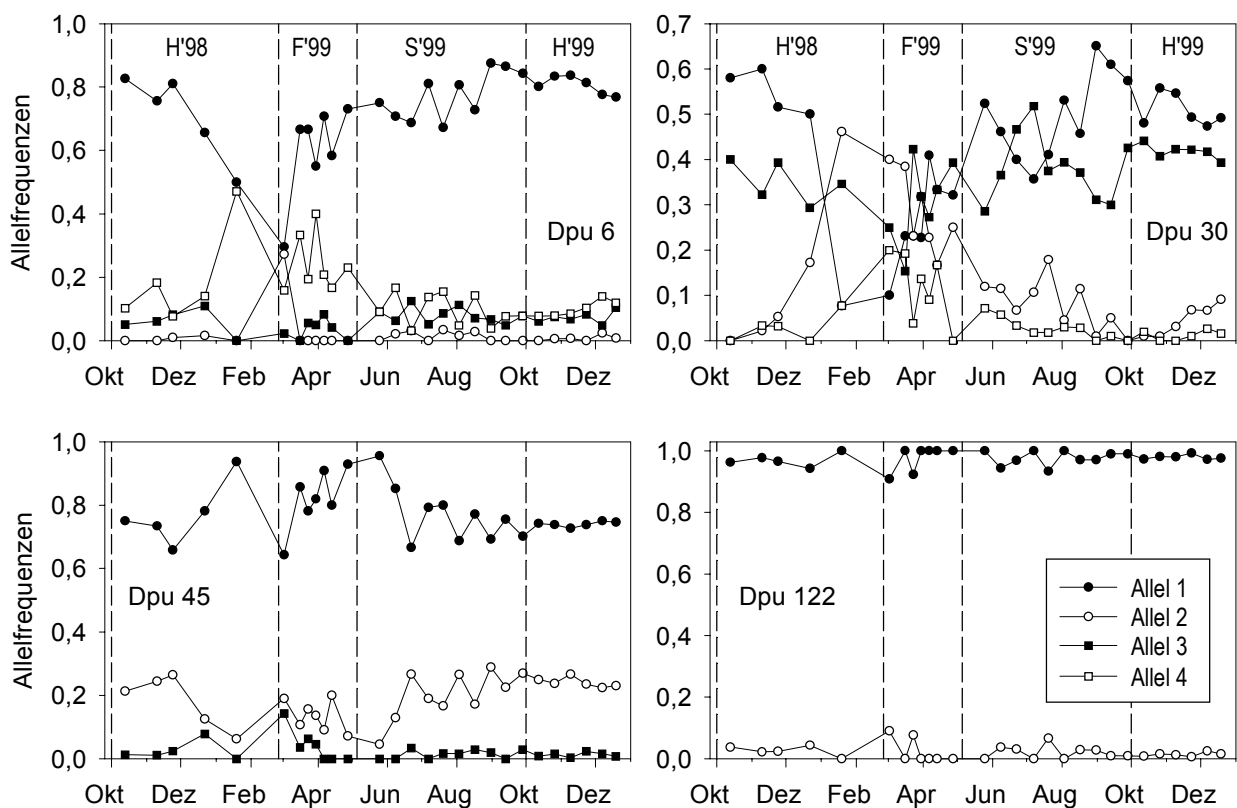
Die Loci Dpu 45 und 122 werden vorwiegend durch zwei Allele repräsentiert, von denen jeweils eines über nahezu den gesamten Untersuchungszeitraum dominant ( $f_{max} = 1$ ) auftritt. Im Verlauf des Herbstes '99 verringert sich die Frequenz von Allel 1 des Locus Dpu 45 soweit, daß Allel 1 und 2 mit gleichen Frequenzen vorkommen. Der Locus Dpu 122 ist den größten Teil des Jahres für ein Allel fixiert. Grundsätzlich lassen sich bei *D. galeata* Unterschiede in den Allelfrequenzen der vier Mikrosatelliten-Loci vor allem im Frühling und im Sommer im Vergleich mit den Daphnien im Herbst erkennen.



**Abbildung 3.10** Mikrosatelliten-Allelfrequenzen von *D. galeata*

Die häufigsten *D. galeata*-Mikrosatelliten-Allele vom November '98 bis Dezember '99. Insgesamt sind 9 Allele für den Locus Dpu 6, 7 für Dpu 30, 7 für Dpu 45 und 2 Allele für Dpu 122 vorhanden. Die Länge der Mikrosatelliten-Allele ist im Anhang aufgeführt.

Die saisonale Verteilung der häufigsten Mikrosatelliten-Allele bei *D. hyalina* ist in Abbildung 3.11 zusammengefasst. Der Locus Dpu 6 wird im saisonalen Verlauf vor allem durch Allel 1 ( $f_{\max} = 0,88$ ) repräsentiert. Allel 4 erreicht maximale Frequenzen ( $f_{\max} = 0,47$ ) im Herbst '98 und im Frühling '99 und tritt außerhalb dieser Zeit in geringen Frequenzen auf. Allel 2 erzielt die maximale Frequenz ( $f_{\max} = 0,27$ ) zu dem einzigen Zeitpunkt, an dem Allel 1 mit stark verminderter Frequenz vorkommt. Allel 3 ist immer mit geringen Frequenzen vorhanden. Der Locus Dpu 30 zeigt für die Allele 2 ( $f_{\max} = 0,46$ ) und 4 ( $f_{\max} = 0,19$ ) die größten Frequenzen im späten Herbst '98 und im Frühling '99, während die Allele 1 ( $f_{\max} = 0,56$ ) und 3 ( $f_{\max} = 0,47$ ) davor und danach dominieren. Der Verlauf der Allelfrequenzen bei den Loci Dpu 45 und Dpu 122 ist vergleichbar mit denen bei *D. galeata*, beide Loci werden von einem Allel dominiert.

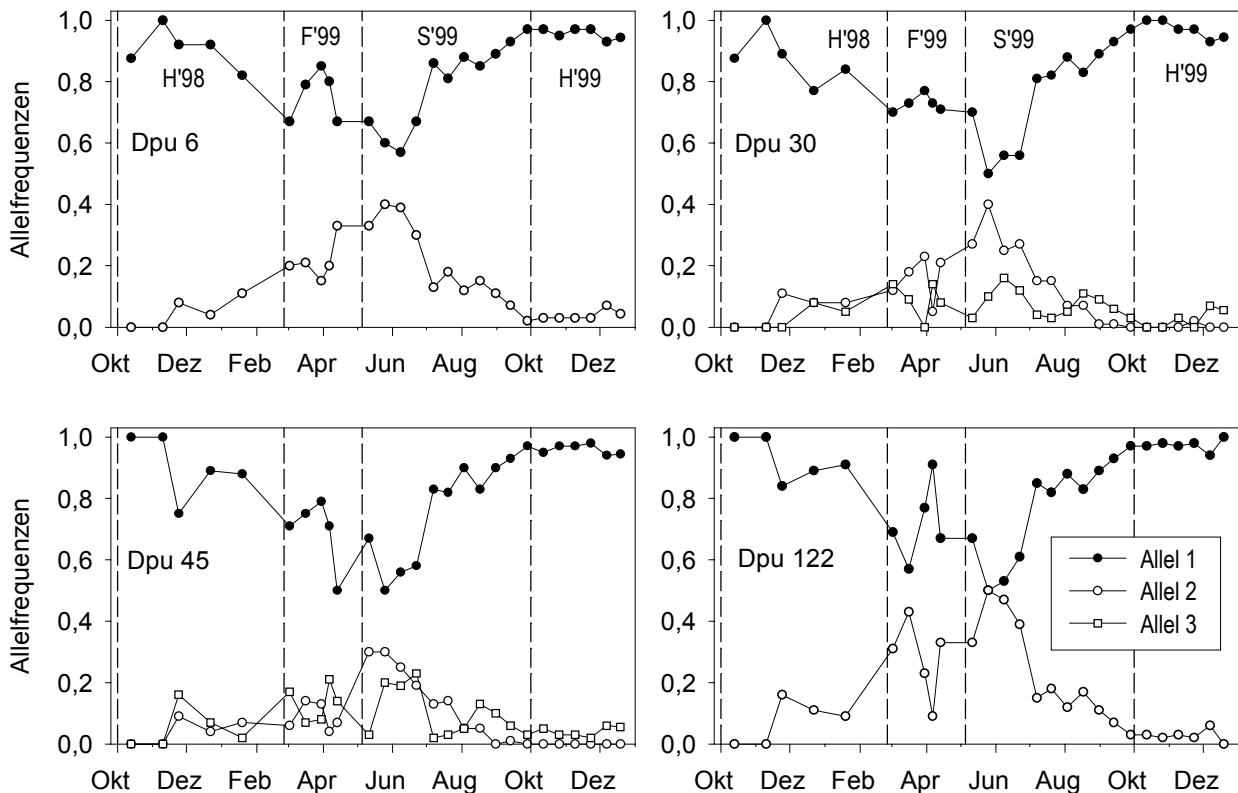


**Abbildung 3.11** Mikrosatelliten-Allelfrequenzen von *D. hyalina*

Die häufigsten *D. hyalina*-Mikrosatelliten-Allele vom Oktober '98 bis Dezember '99. Insgesamt sind 10 Allele für den Locus Dpu 6, 7 für Dpu 30, 8 für Dpu 45 und 4 Allele für Dpu 122 vorhanden. Die Länge der Mikrosatelliten-Allele ist im Anhang aufgeführt.



Die häufigsten Mikrosatelliten-Allele für *D. cucullata* sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Bei allen vier Loci dominiert ein Allel ( $f > 0,5$ ). Im Frühling und im Früh-Sommer nimmt die Allelfrequenz von Allel 1 ab ( $f = 0,50-0,67$ ). Die Frequenzen von Allel 1 liegen davor und danach in der Regel deutlich höher ( $f = 0,8$  bis  $1,0$ ). Dieses Muster beruht nicht auf einem Wechsel der drei Haplotypen, sondern ist innerhalb der verschiedenen Haplotypen nachvollziehbar.



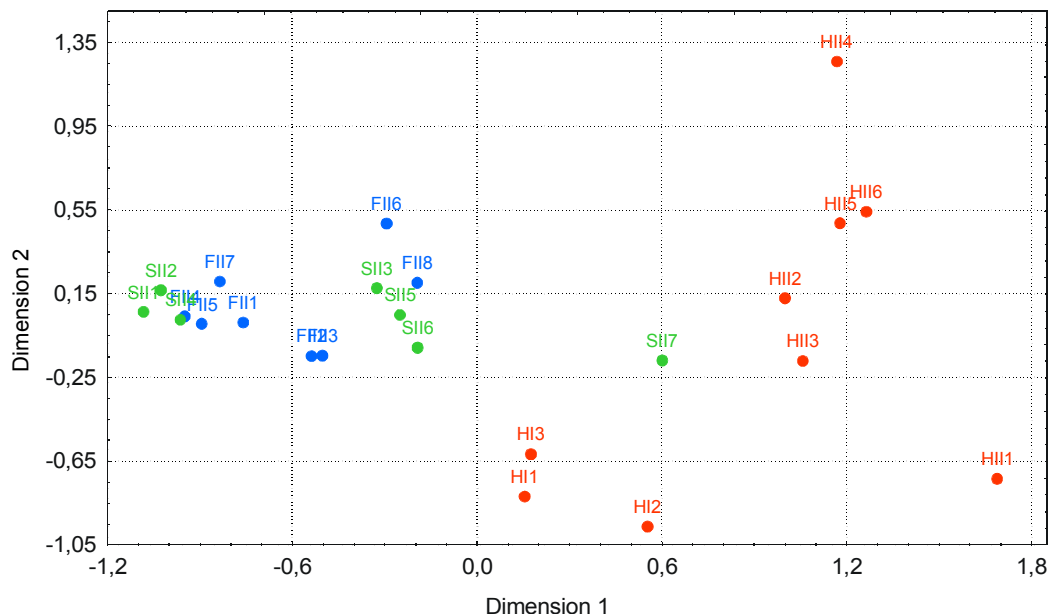
**Abbildung 3.12** Mikrosatelliten-Allelfrequenzen von *D. cucullata*

Die häufigsten *D. cucullata*-Mikrosatelliten-Allele vom Oktober '98 bis Dezember '99. Insgesamt sind 8 Allele für den Locus Dpu 6, 7 für Dpu 30, 6 für Dpu 45 und 2 Allele für Dpu 122 vorhanden. Die Länge der Mikrosatelliten-Allele ist im Anhang aufgeführt.

### 3.2.4 Saisonale Entwicklung der Populationsstruktur

Die Multidimensionale Skalierung (MDS) ermöglicht die graphische Darstellung einer genetischen Distanzmatrix. Die genetischen Distanzen wurden nach Nei (1972) berechnet. Dabei wurde jede Probenahme einer saisonalen Phase (Abschnitt 3.2.1) zugeordnet. Anhand der MDS kann die saisonale Entwicklung der Population nachvollzogen werden. Dabei ist zu

beachten, daß die saisonale Einteilung anhand der abiotischen Parameter nur einen Anhaltspunkt darstellt und unter Umständen willkürlich ist und angepaßt werden muß. In Abbildung 3.13 ist die MDS für die genetischen Distanzen von *D. galeata* für Probenahmetage vom Herbst '98 bis zum Herbst '99 dargestellt. Alle *D. galeata* vom Herbst liegen auf der rechten Seite, wobei der letzte Sommertag (SII7) auch als erster Herbsttag (HII0) betrachtet werden kann. Die genetischen Distanzen sind relativ hoch. Im Gegensatz dazu gruppieren sich *D. galeata* vom Frühling und Sommer auf der linken Seite und sind genetisch ähnlicher. Dies wird auch durch den  $F_{ST}$ -Index (Tabelle 3.8) bestätigt. Eine größere Differenzierung besteht zwischen den Daphnien vom Herbst und vom Frühling, sowie vom Sommer. Die  $F_{ST}$ -Werte zeigen keine Differenzierung zwischen den Daphnien vom Frühling bzw. Sommer '99.



**Abbildung 3.13 MDS-Diagramm für *D. galeata***

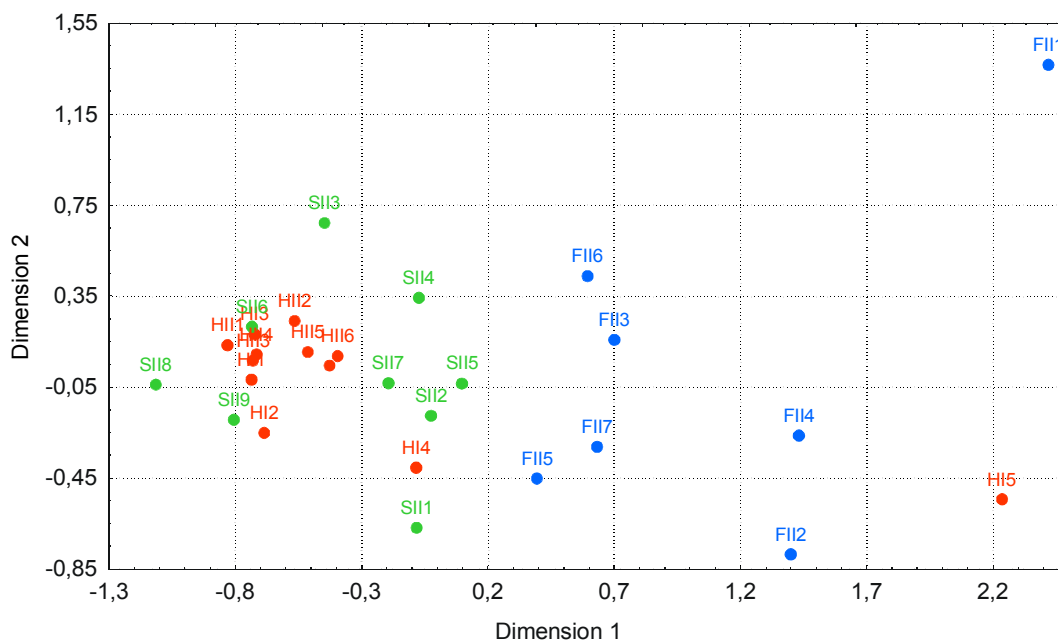
MDS-Diagramm für *D. galeata*, die den Jahreszeiten, Frühling (F), Sommer (S), Herbst (H), in den Jahren '98 (I) und '99 (II) zugeordnet wurden. Die arabischen Zahlen bezeichnen die Reihenfolge der Probenahmetage.

**Tabelle 3.8 Der  $F_{ST}$ -Index für saisonal gruppierte *D. galeata***

$F_{ST}$ -Werte für saisonal gruppierte *D. galeata*. Dargestellt sind nach dem Jackknifing-Verfahren die Mittelwerte und Standardabweichungen, die nach sequentiellm Eliminieren der Loci erhalten wurden.

	$F_{ST}$ -Index		
	Frühling '99	Sommer '99	Herbst '98/'99
Frühling '99	—————		
Sommer '99	0,002 ± 0,001	—————	
Herbst '98/'99	0,112 ± 0,019	0,129 ± 0,019	—————

In Abbildung 3.14 ist ein MDS-Diagramm für *D. hyalina* dargestellt. Alle Proben vom Frühling '99 liegen auf der rechten Seite. Die Daphnien des letzten Herbsttages (HI5) können auch als erster Frühlingsstag (FII0) betrachtet werden. Zwischen den Daphnien im Herbst und den Daphnien Frühling besteht eine moderate Populationsdifferenzierung (Tabelle 3.9), während zwischen den übrigen Gruppen kaum eine Differenzierung zu erkennen ist. Auch hier sind die genetischen Distanzen auf der rechten Seite (F) höher als auf der linken (S, H).



**Abbildung 3.14 MDS-Diagramm für *D. hyalina***

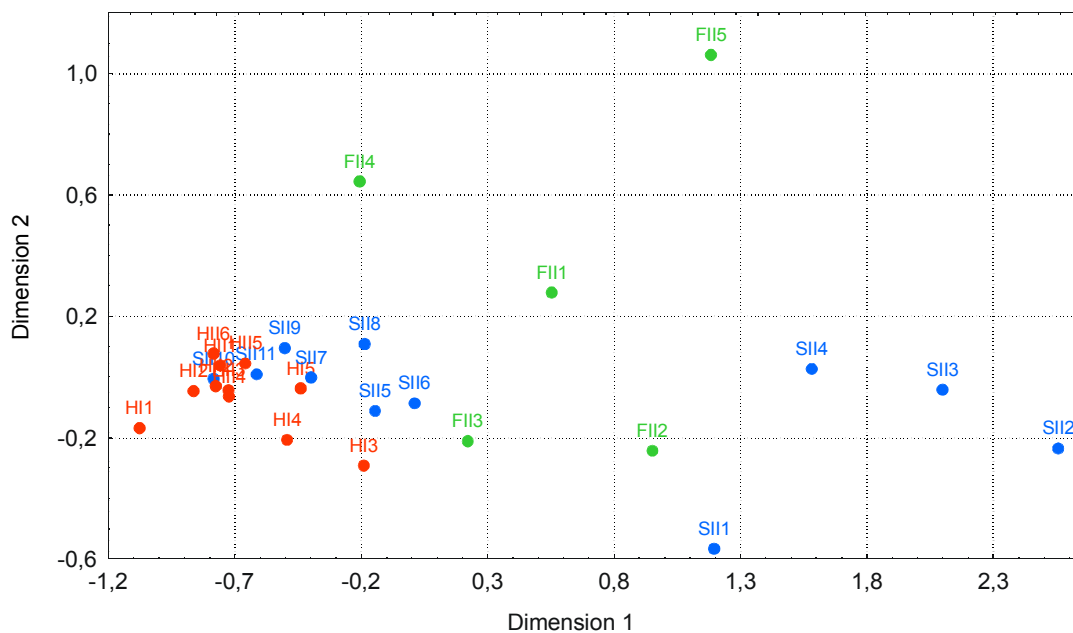
MDS-Diagramm für *D. hyalina*, die den Jahreszeiten, Frühling (F), Sommer (S), Herbst (H), in den Jahren '98 (I) und '99 (II) zugeordnet wurden. Die arabischen Zahlen kennzeichnen die Reihenfolge der Probenahmetage.

**Tabelle 3.9 Der  $F_{ST}$ -Index für saisonal gruppierte *D. hyalina***

$F_{ST}$ -Werte für saisonal gruppierte *D. hyalina*. Dargestellt sind nach dem Jackknifing-Verfahren die Mittelwerte und Standardabweichungen, die nach sequentiellm Eliminieren der Loci erhalten wurden.

	$F_{ST}$ -Index		
	Frühling '99	Sommer '99	Herbst '98/'99
Frühling '99	_____		
Sommer '99	0,022 ± 0,010	_____	
Herbst '98/'99	0,083 ± 0,032	0	_____

In Abbildung 3.15 ist die Distanzmatrix für *D. cucullata* graphisch dargestellt. Die Proben vom Frühling liegen gemeinsam mit den Proben vom frühen Sommer (SII1-4) auf der rechten Seite und zeigen relativ große genetische Distanzen. Daphnien vom Herbst und Sommer liegen mit geringer Streuung auf der linken Seite. Die  $F_{ST}$ -Werte (Tabelle 3.10) unterstreichen diese genetische Ähnlichkeit, bzw. den genetischen Unterschied.



**Abbildung 3.15 MDS-Diagramm für *D. cucullata***

MDS-Diagramm für *D. cucullata*, die den Jahreszeiten, Frühling (F), Sommer (S), Herbst (H), in den Jahren '98 (I) und '99 (II) zugeordnet wurden. Die arabischen Zahlen kennzeichnen die Reihenfolge der Probenahmetage.

**Tabelle 3.10 Der  $F_{ST}$ -Index für saisonal gruppierte *D. cucullata***

$F_{ST}$ -Werte für saisonal gruppierte *D. cucullata*. Dargestellt sind nach dem Jackknifing-Verfahren die Mittelwerte und Standardabweichungen, die nach sequentiellm Eliminieren der Loci erhalten wurden. Der Früh-Sommer (SII1-4) und der Spät-Sommer (SII5-11) sind getrennt dargestellt.

	$F_{ST}$ -Index			
	Frühling '99	Früh-Sommer '99	Spät-Sommer '99	Herbst '98/'99
Frühling '99	—————			
Früh-Sommer '99	0,026 ± 0,004	—————		
Spät-Sommer '99	0,063 ± 0,011	0,181 ± 0,014	—————	
Herbst '98/'99	0,155 ± 0,027	0,326 ± 0,030	0,021 ± 0,004	—————

### 3.3 Die Populationsstruktur von Daphnien während der Phase der sexuellen Reproduktion

Zu bestimmten Zeiten entwickeln sich Männchen. Die Produktion von Männchen leitet den Zyklus der sexuellen Reproduktion ein. Während dieser Zeit setzt sich die Population aus fünf verschiedenen *Daphnia*-Typen zusammen: Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), den Dauereiern im Brutraum ( $D_W$ ) und den Männchen ( $M$ ). Die Produktion von Ehippien konnte bei *D. galeata* im Sommer '99 sowie bei *D. hyalina* und *D. cucullata* im Herbst '99 beobachtet werden. Da für *D. cucullata* nur eine geringe Anzahl Daphnien zur Verfügung stand, konzentrieren sich im folgenden die Untersuchungen zur genetischen Struktur innerhalb der Population auf das Taxon *D. galeata* im Mai '99 und *D. hyalina* im Herbst '99.

#### 3.3.1 Populationsstruktur von *D. galeata* im Mai '99

Am 25. Mai 1999 wurden sich sexuell reproduzierende *D. galeata* aus dem Belauer See gefangen. Zu diesem Zeitpunkt wurden keine Männchen ( $M$ ) gefunden. Weder zwei Wochen davor, noch danach wurden Daphnien mit Dauereiern ( $W_D$ ) beobachtet. Im selben Zeitraum trieben Ehippien am Ufer, die aufgesammelt und genetisch analysiert wurden.

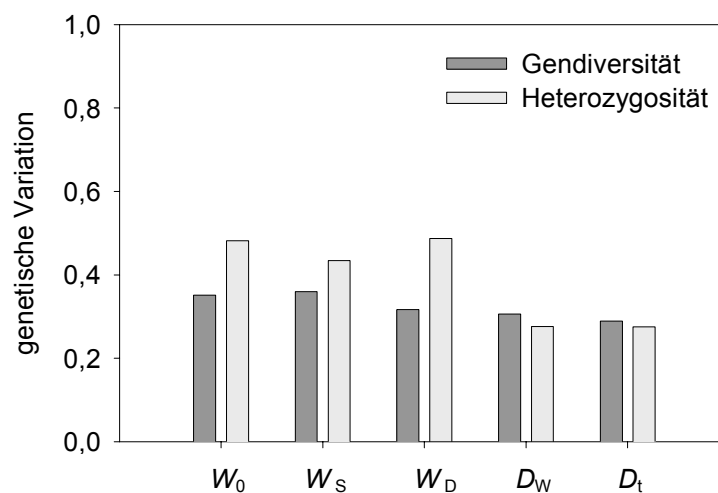
##### 3.3.1.1 Anteil der treibenden Ehippien

Nach der Häutung kann das Ehippium absinken oder an die Wasseroberfläche treiben und so der Verbreitung der Art und Klone dienen. In einem Versuch wurde abgeschätzt, welcher Anteil der Ehippien an die Wasseroberfläche treibt. Dazu wurden im Mai '99 ehippien-tragende *D. galeata* gefangen und einzeln in 50-ml-Kulturgefäßen kultiviert. Von über 100 eingesetzten Daphnien überlebten 64. Nach 1 bis 2 Tagen wurde das Ehippium mit der Häutung abgestoßen. Der größte Teil der Ehippien (61 Stück, 95 %) wurde auf dem Boden des Kulturgefäßes wiedergefunden. Von den abgesunkenen Ehippien enthielten 3 keine Dauereier. Nur 3 Ehippien (5 %) trieben an der Oberfläche. In allen treibenden Ehippien waren Dauereier enthalten. Der Versuch konnte nicht mit weiteren *D. galeata* wiederholt werden, da bei darauf folgenden Probenahmen keine ehippien-tragenden *D. galeata* aufgesammelt wurden.

### 3.3.1.2 Genetische Variation bei *D. galeata*

Aus der Population im Belauer See wurden im Mai '99 alle *D. galeata*-Typen mit Ausnahme der Männchen (*M*) aufgesammelt. Aus den Proben wurden sowohl Weibchen ohne ( $W_0$ ) und mit Subitaneiern ( $W_S$ ) isoliert. Weiterhin wurden Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ) analysiert. Zusätzlich wurden *D. galeata*-Dauereier aus Ehippien untersucht, die an der Wasseroberfläche trieben ( $D_t$ ). Treibende Dauereier eines anderen Taxons wurden nicht gefunden.

Die Heterozygotität von adulten Daphnien ( $W_0$ ;  $W_S$ ;  $W_D$ ) erreicht maximal 48 % und liegt damit deutlich über einer Heterozygotität von 28 % bei den Dauereiern (Abbildung 3.16), sowohl bei denen, die aus dem Brutraum ( $D_W$ ), als auch bei denen, die aus an der Wasseroberfläche treibenden Ehippien ( $D_t$ ) isoliert wurden. Die Unterschiede in der Gendiversität zwischen adulten Daphnien und Dauereiern hingegen sind gering.



**Abbildung 3.16 Genetische Variation von *D. galeata* im Mai**

Genetische Variation von *D. galeata*-Typen im Mai im Belauer See. Gendiversität und Heterozygotität wurden ermittelt für *Daphnia* ohne Eier ( $W_0$ ), mit Subitaneiern ( $W_S$ ), mit Dauereiern ( $W_D$ ), für Dauereier im Brutraum ( $D_W$ ) und für treibende Dauereier ( $D_t$ ).

### 3.3.1.3 Einfluß der sexuellen Reproduktion auf die Heterozygotität

Die Dauereier, die sich im Brutraum von Daphnien befinden, und die Dauereier, die an die Wasseroberfläche treiben, werden getrennt betrachtet. Aufgrund einer Abschätzung (siehe Abschnitt 3.3.1.1) wird lediglich von 5 % der Dauereier erwartet, daß diese an die Wasseroberfläche treiben. Für Dauereier, als sexuell erzeugte Generation, wird eine Übereinstimmung mit dem HWE erwartet.

Die Ergebnisse in Tabelle 3.11 zeigen für ehippien-tragende Weibchen ( $W_D$ ), bis auf den Locus Dpu 122, keine Übereinstimmung mit dem HWE. Dieser Locus ist bei allen Dauereiern ( $D_W$ ;  $D_t$ ) fixiert. Die Dauereier, die aus dem Brutraum isoliert wurden ( $D_W$ ), weisen nur noch für den Locus Dpu 45 eine signifikante Abweichung vom HWE auf. Die Dauereier, die an der Wasseroberfläche treiben ( $D_t$ ), weichen bei den Loci Dpu 6 und 30 signifikant vom HWE ab. Obwohl für die Dauereier ( $D_W$ ;  $D_t$ ) keine vollständige Übereinstimmung mit dem HWE erzielt wird, nähern sie sich jedoch wie erwartet dem HWE an.

**Tabelle 3.11 Abweichung vom HWE bei *D. galeata***

Wahrscheinlichkeiten nach einem Exakten Test für die Abweichung vom HWE von sich sexuell reproduzierenden *D. galeata* und Dauereiern. Durchschnittlich basieren die Berechnungen auf 60 *D. galeata* mit Dauereiern ( $W_D$ ), 60 *D. galeata* Dauereiern vor der Häutung ( $D_W$ ) und 82 treibenden *D. galeata* Dauereiern ( $D_t$ ). Das Zeichen — symbolisiert einen fixierten Locus und das Symbol \* kennzeichnet die signifikante Abweichung ( $p < 0,05$ ) vom HWE.

Mikrosatelliten- Locus	Abweichung vom HWE		
	$W_D$	$D_W$	$D_t$
Dpu 6	< 0,001 *	0,092 ± 0,009	0,005 ± 0,001 *
Dpu 30	< 0,001 *	0,769 ± 0,010	0,026 ± 0,004 *
Dpu 45	< 0,001 *	< 0,001 *	1
Dpu 122	1	—	—

### 3.3.1.4 Klonale Zusammensetzung in der *D. galeata*-Population

Die klonale Zusammensetzung der *D. galeata*-Typen aus der Population im Mai '99 im Pelagial ( $W_0$ ;  $W_S$ ;  $W_D$ ;  $D_W$ ) sowie der treibenden Dauereier ( $D_t$ ) und der Dauereier in den Sedimentabschnitten I bis IV ( $D_{SI}$ - $D_{SIV}$ ; vgl. Abschnitt 2.2.3.1) wurde analysiert. Die klonale Zusammensetzung soll Aufschluß über die Strukturierung innerhalb der Population geben, insbesondere zwischen treibenden und sinkenden Dauereiern.

Die Klonfrequenzen ( $f$ ) der 8 häufigsten Klone sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Die adulten *D. galeata* ( $W_0$ ;  $W_S$ ;  $W_D$ ) der Population unterscheiden sich in der Dominanz einzelner Klone. Während die Teilpopulation von *D. galeata* mit Dauereiern ( $W_D$ ) überwiegend von Klon 1 verkörpert wird, treten Klon 5 bei *D. galeata* ohne Eier ( $W_0$ ) sowie die Klone 5 und 7 bei Daphnien mit Subitaneiern ( $W_S$ ) am häufigsten auf. Klon 1 hingegen wurde in diesen Teilpopulationen nicht gefunden. Für die Dauereier, die aus dem Brutraum der Daphnien isoliert wurden ( $D_W$ ), wurde Klon 1 zwar ebenfalls mit der größten Häufigkeit vorgefunden, jedoch ist der Anteil deutlich geringer als bei den Weibchen mit Dauereiern. Ebenfalls vermehrt tritt Klon 2 bei den Dauereiern ( $D_W$ ) auf. Klon 3 wurde nur bei diesen Dauereiern und bei den Dauereiern im Sediment ( $D_{SI}$ - $D_{SIV}$ ) beobachtet. Bei den treibenden Dauereiern überwiegen die Klone 2 und 5, Klon 6 ist ebenfalls häufiger vertreten. Daneben wurde Klon 6 nur noch bei den Dauereiern beobachtet, die aus dem Brutraum isoliert wurden. Der Klon 1, der von besonderer Bedeutung für Daphnien mit Dauereiern ( $W_D$ ) und Dauereier aus dem Brutraum ( $D_W$ ) ist, wurde mit einer geringen Frequenz auch bei den treibenden Dauereiern ( $D_t$ ) gefunden. Bei Dauereiern im Sediment ( $D_{SI}$ - $D_{SIV}$ ) wurden die Klone 4, 5 und 6, die etwa 28 % der treibenden Dauereier ( $D_t$ ) ausmachen, nicht gefunden. Die übrigen Klone sind in fast allen Sedimentabschnitten vertreten, besonders häufig dabei, die Klone 2, 7 und 8. Alle Klone, die häufig im Sediment auftreten, sind auch bei den Dauereiern, die aus dem Brutraum stammen ( $D_W$ ), vertreten. Nicht alle diese Klone sind aber auch bei den adulten Daphnien ( $W_0$ ;  $W_S$ ;  $W_D$ ) präsent.

Bei den treibenden Dauereiern ( $D_t$ ) werden durch 7 Klone 57 % der Daphnien widerspiegelt, bei Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ) sind es 69 % der Daphnien, die durch 8 Klone verkörpert werden und bei ehippien-tragenden Daphnien ( $W_D$ ) werden sogar 87 % durch 5 Klone repräsentiert. Diese Weibchen kennzeichnet auch die geringste Anzahl von Klonen.



**Tabelle 3.12 Klonfrequenzen von *D. galeata* der Mai-Population**

Klonfrequenzen der 8 häufigsten Klone von *D. galeata* Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen ( $M$ ) und Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ), die aus dem Pelagial gefangen wurden, sowie von an der Wasseroberfläche treibende Dauereier ( $D_t$ ). Die Klonfrequenzen sind ebenfalls für Dauereier der Sedimentabschnitte I bis IV ( $D_{SI}$ - $D_{SIV}$ ) aus zwei Kernen vom Dezember '98 und einem Kern vom März '99 dargestellt. In Klammern angegeben ist die durchschnittliche Anzahl von Daphnien pro Klon. Dargestellt sind die Klone, für die vier Mikrosatelliten-Loci (Dpu 6, 30, 45, 122) analysiert wurden. Das Zeichen — symbolisiert, daß keine entsprechenden Klone gefunden wurden.

Typ	Anzahl		Frequenz der Klone								
	<i>Daphnia</i>	Klone	1	2	3	4	5	6	7	8	$\Sigma$
$W_0$	14	8 (1,8)	—	—	—	0,07	0,21	—	—	—	0,29
$W_S$	19	11 (1,7)	—	—	—	0,05	0,16	—	0,16	—	0,37
$W_D$	53	10 (5,3)	0,72	0,02	—	0,02	0,09	—	0,02	—	0,87
$D_W$	61	23 (2,7)	0,25	0,13	0,08	0,07	0,02	0,02	0,05	0,05	0,69
$D_t$	67	24 (2,8)	0,03	0,13	—	0,05	0,13	0,10	0,05	0,06	0,57
$D_{SI}$	127	55 (2,3)	0,10	0,13	0,01	—	—	—	0,17	0,02	0,43
$D_{SII}$	92	50 (1,8)	0,04	0,08	0,05	—	—	—	0,07	0,04	0,28
$D_{SIII}$	84	54 (1,6)	0,06	0,10	0,06	—	—	—	0,10	0,02	0,33
$D_{SIV}$	76	44 (1,7)	—	0,01	0,03	—	—	—	0,15	0,13	0,32

### 3.3.1.5 Genetische Differenzierung innerhalb der Population

Anhand der Allelfrequenzen wurde die genetische Differenzierung innerhalb der *D. galeata*-Population im Mai ermittelt (Tabelle 3.13). Daphnien ohne Eier ( $W_0$ ) und mit Subitaneiern ( $W_S$ ) zeigen Ähnlichkeiten bei den Allelfrequenzen. Erwartungsgemäß ergibt sich bei den Weibchen mit Dauereiern und deren Dauereiern ebenfalls keine signifikante Differenzierung. Die beiden Typen von Dauereiern ( $D_W$ ,  $D_t$ ) sind hingegen signifikant voneinander differenziert, ebenso wie die treibenden Dauereier ( $D_t$ ) von den ehippien-tragenden Daphnien ( $W_D$ ) differenziert sind. Ehippien-tragende Daphnien ( $W_D$ ) und deren Dauereier ( $D_W$ ) wiederum weisen signifikante Unterschiede in den Allelfrequenzen im Vergleich zu Daphnien ohne Eier ( $W_0$ ) und mit Subitaneiern ( $W_S$ ) auf. Innerhalb der *D. galeata*-Population ergeben sich 3 Teil-Gruppen, die genetisch voneinander differenziert sind: Weibchen mit ( $W_S$ ) und ohne Subitaneier ( $W_0$ ), dauerei-tragende Weibchen ( $W_D$ ) und deren Dauereier ( $D_W$ ) und schließlich die treibenden Dauereier ( $D_t$ ).

### Tabelle 3.13 Genetische Differenzierung zwischen *D. galeata*-Typen

Genetische Differenzierung von *D. galeata* ohne Eier ( $W_0$ ), mit Subitaneiern ( $W_S$ ), mit Dauereiern ( $W_D$ ), von Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ) und von an der Wasseroberfläche treibenden Dauereiern ( $D_t$ ) im Mai '99 nach einem Exakten Test. Das Symbol \* kennzeichnet eine signifikante Differenzierung ( $p < 0,05$ ).

Genetische Differenzierung von <i>D. galeata</i>					
	$W_0$	$W_S$	$W_D$	$D_W$	$D_t$
$W_0$	————				
$W_S$	0,1541	————			
$W_D$	< 0,0001 *	< 0,0001 *	————		
$D_W$	< 0,0001 *	< 0,0001 *	0,5408	————	
$D_t$	< 0,0001 *	< 0,0001 *	< 0,0001 *	< 0,0001 *	————

### 3.3.2 Populationsstruktur von *D. hyalina* im Herbst '99

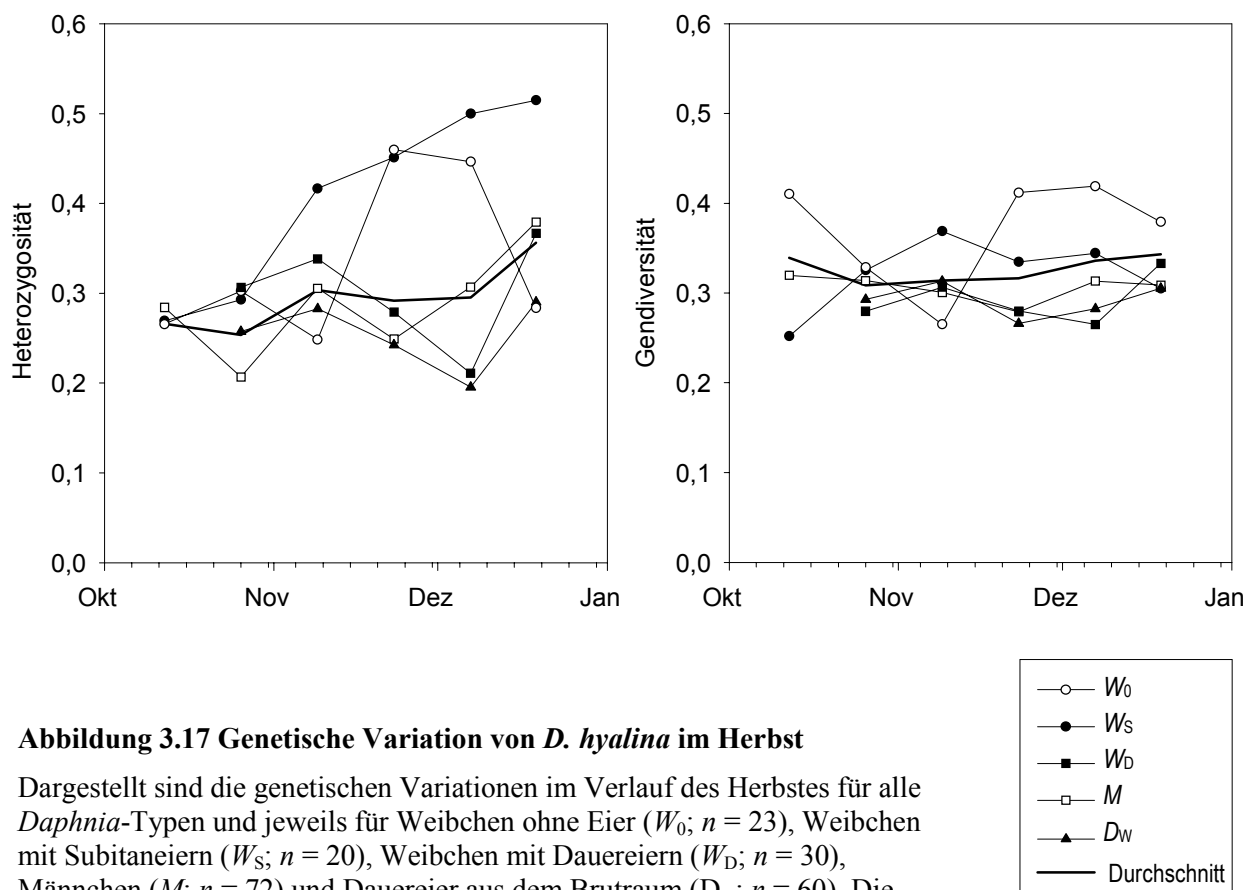
Im Herbst '99, am 12. Oktober, wurden neben Daphnien ohne Eier ( $W_0$ ) und mit Subitaneiern ( $W_S$ ) auch männliche Daphnien ( $M$ ) in der Probe beobachtet. Daneben wurden an weiteren fünf Probenahmetagen vom 26. Oktober bis zum 19. Dezember Daphnien mit Dauereiern ( $W_D$ ) aufgesammelt. Die Daphnien und jeweils ein Dauerei ( $D_W$ ) jeder ephippien-tragenden Daphnie wurden genetisch analysiert.

#### 3.3.2.1 Genetische Variation bei *D. hyalina*

Die genetische Variation der fünf *D. hyalina*-Typen wurde im Herbst '99 anhand der Heterozygotität und der Gendiversität untersucht. In Abbildung 3.17 ist illustriert, daß drei *Daphnia*-Typen, Daphnien ohne Eier ( $W_0$ ), mit Subitaneiern ( $W_S$ ) und Männchen ( $M$ ), zu Beginn des Beobachtungszeitraums in der Population einen nahezu identischen Anteil von Heterozygoten aufweisen. Die Anzahl von heterozygoten Daphnien mit Subitaneiern ( $W_S$ ) steigt innerhalb des dargestellten Zeitraumes sukzessive bis zum letzten Probenahmetag an. Diese Daphnien erreichen die vergleichsweise höchsten Heterozygotitäten und liegen deutlich über dem Durchschnitt aller *Daphnia*-Typen. Im Gegensatz zur Heterozygotität ist bei der Gendiversität keine ausgeprägte Veränderung zu erkennen. Daphnien ohne Eier ( $W_0$ ) erreichen am Ende des Novembers und zu Beginn des Dezembers annähernd hohe Heterozygotitäten wie Daphnien mit Subitaneiern ( $W_S$ ). Die Heterozygotitäten davor und nach diesem Zeitpunkt sind deutlich niedriger. Da die Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ) sich aus den beiden anderen Gruppen ( $W_S$ ;  $W_D$ )

zusammensetzen und jeder Anteil unterschiedlich ausfallen kann, könnte die unterschiedliche Heterozygotität durch einen jeweilig großen Anteil der einen oder anderen Weibchen gegeben sein.

Bei Daphnien ohne Eier ( $W_0$ ) wird in der Regel auch die höchste Gendiversität der *Daphnia*-Typen über den dargestellten Zeitraum vorgefunden, was wiederum für eine Zusammensetzung aus den beiden anderen Gruppen ( $W_S$ ;  $W_D$ ) spricht. Die Heterozygotität und Gendiversität der Männchen ( $M$ ) ähnelt im Untersuchungszeitraum denen der Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ) und der Dauereier ( $D_W$ ).



### 3.3.2.2 Einfluß der sexuellen Reproduktion auf die Heterozygotität

In Tabelle 3.14 sind die Wahrscheinlichkeiten für die Abweichung vom HWE für die *D. hyalina*-Typen der Herbst-Population dargestellt. Die Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ) und mit Subitaneiern ( $W_S$ ) zeigen die meisten Abweichungen vom HWE, gefolgt von den Männchen

(*M*). Dabei sind die meisten Abweichungen für die Loci zu verzeichnen, die einen relativ hohen Polymorphismus zeigen, wie dies für die Loci Dpu 6 und Dpu 30 zutreffend ist. Für den Locus Dpu 45 wurden weniger Abweichungen vom HWE gefunden. Der Locus Dpu 122 weist den geringsten Polymorphismus bei teilweise fixierten Allelen auf. Eine Abweichung vom HWE wurde für diesen Locus lediglich einmal bei Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ) festgestellt. Am häufigsten zeigen Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ) und die Dauereier ( $D_W$ ) Übereinstimmung mit dem HWE.

**Tabelle 3.14 Abweichungen vom HWE bei *D. hyalina***

Abweichung vom HWE bei vier Mikrosatelliten (MS)-Loci von Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen (*M*) und Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ). Dargestellt sind die *p*-Werte mit Standardfehlern nach einem Exakten Test. Aus dem Freiland wurden aus der Population am 12. Oktober '99 keine Daphnien mit Dauereiern oder Dauereier aufgesammelt (*n.a.*). Ein fixierter Locus ist mit dem Zeichen — kenntlich gemacht. Signifikante Abweichungen ( $p < 0,05$ ) vom HWE sind durch das Symbol \* hervorgehoben. Signifikante Abweichungen nach einer Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,01$ ) sind fett markiert.

MS-Locus	Datum (1999)	Abweichungen vom HWE für <i>D. hyalina</i> -Typen				
		$W_0$	$W_S$	$W_D$	<i>M</i>	$D_W$
Dpu 6	12. Okt.	0,282 ± 0,013	1	<i>n.a.</i>	1	<i>n.a.</i>
	26. Okt.	0,050 ± 0,018*	<b>0,004 ± 0,001*</b>	1	<b>0,001 ± 0,001*</b>	0,750 ± 0,015
	09. Nov.	1	0,736 ± 0,010	0,081 ± 0,008	0,449 ± 0,010	1
	23. Nov.	0,227 ± 0,013	<b>0,001 ± 0*</b>	1	0,480 ± 0,019	0,264 ± 0,016
	07. Dez.	<b>0,002 ± 0,002*</b>	<b>0,002 ± 0,002*</b>	<b>0,005 ± 0,002*</b>	<b>0,001 ± 0,001*</b>	0,200 ± 0,009
	19. Dez.	0,024 ± 0,006*	< <b>0,001*</b>	0,671 ± 0,013	< <b>0,001*</b>	0,646 ± 0,020
Dpu 30	12. Okt.	< <b>0,001*</b>	1	<i>n.a.</i>	0,523 ± 0,019	<i>n.a.</i>
	26. Okt.	0,108 ± 0,009	0,644 ± 0,010	0,720 ± 0,016	< <b>0,001*</b>	0,057 ± 0,004
	09. Nov.	0,612 ± 0,015	0,021 ± 0,002*	0,287 ± 0,012	1	0,045 ± 0,008
	23. Nov.	0,022 ± 0,007*	< <b>0,001*</b>	1	0,508 ± 0,012	<b>0,001 ± 0,001*</b>
	07. Dez.	<b>0,001 ± 0,001*</b>	< <b>0,001*</b>	1	0,191 ± 0,004	0,898 ± 0,009
	19. Dez.	0,145 ± 0,009	< <b>0,001*</b>	0,036 ± 0,006*	0,330 ± 0,010	0,036 ± 0,004*
Dpu 45	12. Okt.	0,339 ± 0,017	0,551 ± 0,013	<i>n.a.</i>	1	<i>n.a.</i>
	26. Okt.	1	0,550 ± 0,004	0,468 ± 0,015	0,010 ± 0,003*	0,106 ± 0,008
	09. Nov.	0,553 ± 0,018	0,186 ± 0,015	0,691 ± 0,013	1	1
	23. Nov.	0,632 ± 0,016	0,103 ± 0,009	0,668 ± 0,018	0,693 ± 0,014	0,515 ± 0,011
	07. Dez.	<b>0,005 ± 0,002*</b>	<b>0,006 ± 0,003*</b>	0,251 ± 0,016	0,019 ± 0,003*	<b>0,003 ± 0,002*</b>
	19. Dez.	< <b>0,001*</b>	0,095 ± 0,009	0,404 ± 0,014	0,700 ± 0,015	0,267 ± 0,013
Dpu 122	12. Okt.	1	—	<i>n.a.</i>	1	<i>n.a.</i>
	26. Okt.	1	1,000 ± 0,013	—	1	1
	09. Nov.	—	1	1	1	1
	23. Nov.	0,027 ± 0,006*	—	—	1	—
	07. Dez.	1	—	1	—	0,115 ± 0,008
	19. Dez.	—	—	1	1	1

### 3.3.2.3 Klonale Zusammensetzung in der *D. hyalina*-Population

Die klonale Zusammensetzung von *D. hyalina* wurde für den Herbst '99 untersucht. Dazu wurden die Frequenzen der sechs häufigsten Klone für die *Daphnia*-Typen aus sechs Probenahmen vom 12. Oktober bis zum 19. Dezember '99 jeweils zusammengefaßt und des Weiteren die entsprechenden Klonfrequenzen für Dauereier im Sediment ( $D_{SI}$  -  $D_{SIV}$ ) ermittelt (Tabelle 3.15). Für *D. hyalina*-Männchen ( $M$ ) wurden mit 80 zwar die meisten Klone gefunden, die durchschnittliche Anzahl von Klonen ist jedoch am geringsten. Die Ergebnisse zeigen, daß bereits wenige Klone einen großen Teil der gesamten Population ausmachen.

Die Daphnien, die sich in der sexuellen Phase des Lebenszyklus befinden, d.h. die Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), die Männchen ( $M$ ), sowie die Dauereier selbst ( $D_W$ ) werden hauptsächlich durch die Klone 1 bis 3 verkörpert. Daphnien ohne Eier ( $W_0$ ) zeigen besonders hohe Frequenzen bei den Klonen 1 und 6, Daphnien mit Subitaneiern ( $W_S$ ) vor allem bei Klon 6, der am häufigsten auftritt. Der Klon 6 wurde weder bei Daphnien mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen ( $M$ ) oder Dauereiern ( $D_W$ ), noch bei den Dauereiern im Sediment ( $D_{SI}$ - $D_{SIV}$ ) vorgefunden.

**Tabelle 3.15 Klonfrequenzen von *D. hyalina* im Herbst**

Klonfrequenzen der häufigsten Klone für *D. hyalina* Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen ( $M$ ) und Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ), die aus dem Pelagial an 6 Probenahmetagen, vom 12. Oktober bis 19. Dezember '99, gefangen wurden. Ebenfalls gezeigt sind die Klonfrequenzen für Dauereier aus den Sedimentabschnitten I-IV ( $D_{SI}$ - $D_{SIV}$ ), die aus den Kernen vom Dezember '98 und März '99 isoliert wurden. In Klammern gegeben ist die durchschnittliche Anzahl von Daphnien zu Klonen. Dargestellt sind die Klone, bei denen alle vier Mikrosatelliten-Loci (Dpu 6, 30, 45, 122) vollständig analysiert wurden. Das Zeichen — symbolisiert, daß keine entsprechenden Klone gefunden wurden.

Typ	Anzahl		Frequenz der Klone						
	<i>Daphnia</i>	Klone	1	2	3	4	5	6	$\Sigma$
$W_0$	120	47 (2,6)	0,13	0,05	0,06	0,03	0,02	0,14	0,43
$W_S$	117	39 (3,0)	0,04	0,09	0,04	0,03	0,02	0,28	0,50
$W_D$	150	36 (4,2)	0,09	0,21	0,13	0,07	0,05	—	0,55
$M$	429	80 (5,4)	0,14	0,12	0,10	0,09	0,05	—	0,49
$D_W$	257	58 (4,4)	0,08	0,19	0,09	0,09	0,04	—	0,42
$D_{SI}$	71	39 (1,8)	0,13	0,09	0,18	0,01	0,03	—	0,44
$D_{SII}$	51	28 (1,8)	0,10	0,20	0,18	0,06	0,02	—	0,55
$D_{SIII}$	26	19 (1,4)	0,15	0,08	0,04	0,08	0,04	—	0,39
$D_{SIV}$	15	15 (1,0)	0,07	—	0,07	—	—	—	0,13

In Tabelle 3.16 ist der Verlauf der Frequenzen für die sechs häufigsten Klone bei den Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ) aufgeschlüsselt für die einzelnen Probenahmetage. Es ist zu erkennen, daß die Klone 1 bis 5, die während des Beobachtungszeitraums bei allen übrigen *Daphnia*-Typen präsent waren, spätestens nach dem 3. Probenahmetag, am 9. November '99, nicht mehr bei den Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ) beobachtet wurden. Die Weibchen mit Subitaneiern bestehen bis zu 70 % aus einem Klon, der nicht im Sediment nachweisbar ist. Somit grenzen sich diese Daphnien spätestens nach dem 23. November klar von den Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), den Männchen ( $M$ ) und den Dauereiern ( $D_W$ ;  $D_{SI}$  -  $D_{SIV}$ ) ab.

**Tabelle 3.16 Klonfrequenzen von *D. hyalina*-Weibchen mit Subitaneiern im Herbst**

Klonfrequenzen der häufigsten Klone für *D. hyalina* Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), aufgeschlüsselt für sechs Probenahmetage. Dargestellt sind die Klone, bei denen alle vier Mikrosatelliten-Loci (Dpu 6, 30, 45, 122) vollständig analysiert wurden. Das Zeichen — symbolisiert, daß keine entsprechenden Klone gefunden wurden.

Tag	Datum 1999	Anzahl der Daphnien	Frequenz der Klone						
			1	2	3	4	5	6	$\Sigma$
1	12. Okt.	26	0,08	0,19	0,15	0,12	0,04	0,04	0,58
2	26. Okt.	21	0,10	0,24	0,05	0,05	0,05	—	0,43
3	09. Nov.	16	0,06	—	—	—	—	0,31	0,38
4	23. Nov.	21	—	—	—	—	—	0,33	0,33
5	07. Dez.	16	—	—	—	—	—	0,50	0,50
6	19. Dez.	17	—	—	—	—	—	0,71	0,71
gesamt		117	0,04	0,09	0,04	0,03	0,02	0,28	0,50

### 3.3.2.4 Genetische Differenzierung innerhalb der Population

Die genetische Differenzierung von *D. hyalina*-Typen zeigt, daß in der frühen Herbstpopulation (12. Oktober '99; Tabelle 3.17), in der die ersten Männchen ( $M$ ) gefunden wurden, eine genetische Differenzierung zwischen den *Daphnia*-Typen zu erkennen ist. Die Ergebnisse für den darauffolgenden Probenahmetag, an dem die ersten Daphnien mit Dauereiern ( $W_D$ ) und die ersten Dauereier ( $D_W$ ) aufgesammelt wurden, spiegeln ein homogenes Bild für die gesamte Population wider. An den nachfolgenden Probenahmetagen zeichnet sich eine genetische Differenzierung der Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), der Männchen ( $M$ ) und der Dauereier ( $D_W$ ) gegenüber den Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ) und mit Subitaneiern ( $W_S$ ) ab. Die Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), die Männchen ( $M$ ) die Dauereier zeigen keine Unterschiede

bei den Allelhäufigkeiten zueinander. Diese Ergebnisse deuten auf eine Differenzierung innerhalb der *D. hyalina*-Herbstpopulation.

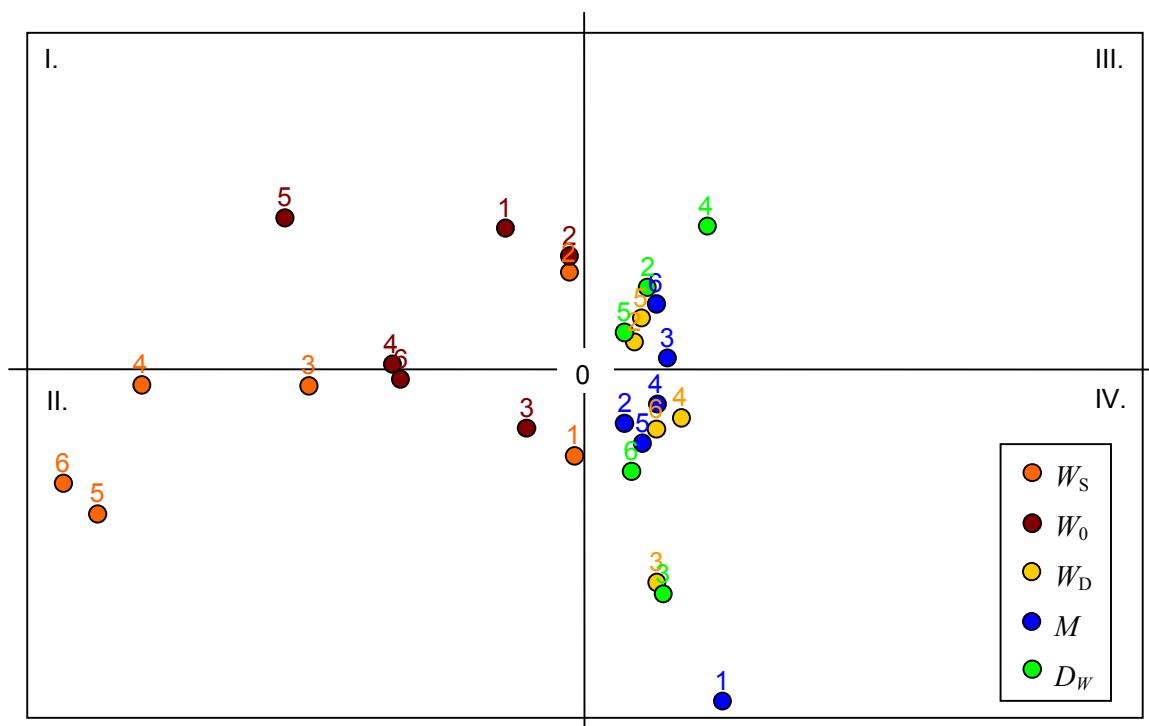
**Tabelle 3.17 Differenzierung zwischen *Daphnia*-Typen**

Paarweise genetische Differenzierung von Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen ( $M$ ) und Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ) im Herbst. Aus dem Freiland wurden am 12. Oktober keine Daphnien mit Dauereiern bzw. Dauereier aufgesammelt (*n.a.*). Das Symbol \* kennzeichnet eine signifikante Differenzierung ( $p < 0,05$ ).

Datum (1999)	genetische Differenzierung zwischen <i>Daphnia</i> -Typen					
		$W_0$	$W_S$	$W_D$	$M$	$D_W$
12. Okt. Tag 1	$W_0$	—				
	$W_S$	0,004 *	—			
	$W_D$	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	—		
	$M$	0,074	0,050	<i>n.a.</i>	—	
	$D_W$	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	—
26. Okt. Tag 2	$W_0$	—				
	$W_S$	0,925	—			
	$W_D$	0,277	0,461	—		
	$M$	0,215	0,259	0,953	—	
	$D_W$	0,377	0,256	0,991	0,627	—
09. Nov. Tag 3	$W_0$	—				
	$W_S$	0,024 *	—			
	$W_D$	0,074	< 0,001 *	—		
	$M$	0,004 *	< 0,001 *	0,777	—	
	$D_W$	0,005 *	< 0,001 *	1	0,334	—
23. Nov. Tag 4	$W_0$	—				
	$W_S$	0,042 *	—			
	$W_D$	< 0,001 *	< 0,001 *	—		
	$M$	< 0,001 *	< 0,001 *	0,981	—	
	$D_W$	< 0,001 *	< 0,001 *	0,873	0,279	—
07. Dez. Tag 5	$W_0$	—				
	$W_S$	0,114	—			
	$W_D$	< 0,001 *	< 0,001 *	—		
	$M$	< 0,001 *	< 0,001 *	0,068	—	
	$D_W$	< 0,001 *	< 0,001 *	0,762	0,077	—
19. Dez. Tag 6	$W_0$	—				
	$W_S$	0,002 *	—			
	$W_D$	< 0,001 *	< 0,001 *	—		
	$M$	< 0,001 *	< 0,001 *	0,424	—	
	$D_W$	< 0,001 *	< 0,001 *	0,492	0,712	—

### 3.3.2.5 Entwicklung der Populationsstruktur im Herbst

Der Verlauf der genetischen Strukturierung in der *D. hyalina*-Population während des Herbstes wurde mit der Prinzipiellen-Komponenten-Analyse (*Principal Component Analysis*; PCA) dargestellt (Abbildung 3.18). Die PCA ist eine neuere Analysemöglichkeit und Darstellungsform für genetische Daten. In der Graphik ist eine räumliche Anordnung der *Daphnia*-Typen zueinander dargestellt, die an sechs Probenahmetagen (Tag 1 bis 6, Tabelle 3.17) im Herbst aufgesammelt wurden. Insgesamt wird 85,8 % der genetischen Variation dargestellt, wobei die Abszisse 76,7 % und die Ordinate 9,1 % widerspiegeln.



**Abbildung 3.18 Genetische Variation von *D. hyalina* während der sexuellen Reproduktions-Phase**

Prinzipielle-Komponenten-Analyse von *D. hyalina* Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen (c) und Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ) während des Herbstes '99. Die Zahlen kennzeichnen die Reihenfolge der sechs Probenahmetage: 12. Okt. (1), 26. Okt. (2), 9. Nov. (3), 23. Nov. (4), 7. Dez. (5) und 19. Dez. (6). Am 1. Probenahmetag wurden keine Weibchen mit Dauereiern aufgesammelt. Durch die Abszisse werden 76,7 % der Variation gezeigt, durch die Ordinate 9,1 %.



Zu Beginn des Herbstes (Tag 1, 2) liegen alle *Daphnia*-Typen horizontal betrachtet nahe beieinander. Die Männchen ( $M$ ), die Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ) und die Dauereier ( $D_W$ ) entfernen sich kaum vom Nullpunkt. Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ) bewegen sich im Verlauf des Herbstes (Tage 1-6) zunehmend vom Zentrum bis zum äußeren Rand des I. und II. Quadranten. Daphnien ohne Subitaneier ( $W_0$ ), d.h. mit unbekannter Fortpflanzungsstrategie, nehmen eine mittlere Position zwischen den Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ) und den übrigen *Daphnia*-Typen ein ( $W_D$ ;  $M$ ;  $D_W$ ). Die genetische Strukturierung in der Population zeichnet sich mit dem Verlauf des Herbstes zunehmend deutlicher ab.

Anhand der Analyse der genetischen Differenzierung (Tabelle 3.18) ist eine Aussage über die Unterschiede innerhalb eines *Daphnia*-Typs im Verlauf des Herbstes möglich. Die Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ) sind genetisch signifikant voneinander differenziert, besonders die der ersten drei Probenahmetage (12. Okt. - 9. Nov.) gegenüber denen der übrigen Probenahmetagen (23. Nov. - 19. Dez.). Die Daphnien, die vom 23. November bis zum 19. Dezember (Tag 4 - 6) aufgesammelt wurden, sind genetisch nicht voneinander verschieden. Bei den Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ) können zwei Gruppen unterschieden werden. Daphnien vom 12. und 26. Oktober (Tag 1 - 2) sind genetisch ähnlich, unterscheiden sich jedoch von denen, die an den nachfolgenden Probenahmetagen (Tag 3 - 6) gefangen wurden. Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ) bilden eine einheitliche Gruppe und sind zu keinem Zeitpunkt genetisch voneinander verschieden. Die Männchen ( $M$ ) vom 23. November (Tag 4) sind genetisch sowohl von denen vom 26. Oktober (Tag 2) und 9. November (Tag 3) als auch von denen vom 7. Dezember (Tag 5) unterschiedlich. Diese Differenzierung wird auch von den Dauereiern ( $D_W$ ) gezeigt, wobei sich zeitversetzt vor allem die Dauereier vom 7. Dezember (Tag 5) von denen der übrigen Probenahmetage unterscheiden.

**Tabelle 3.18 Differenzierung im Verlauf des Herbstes bei den verschiedenen *Daphnia*-Typen**

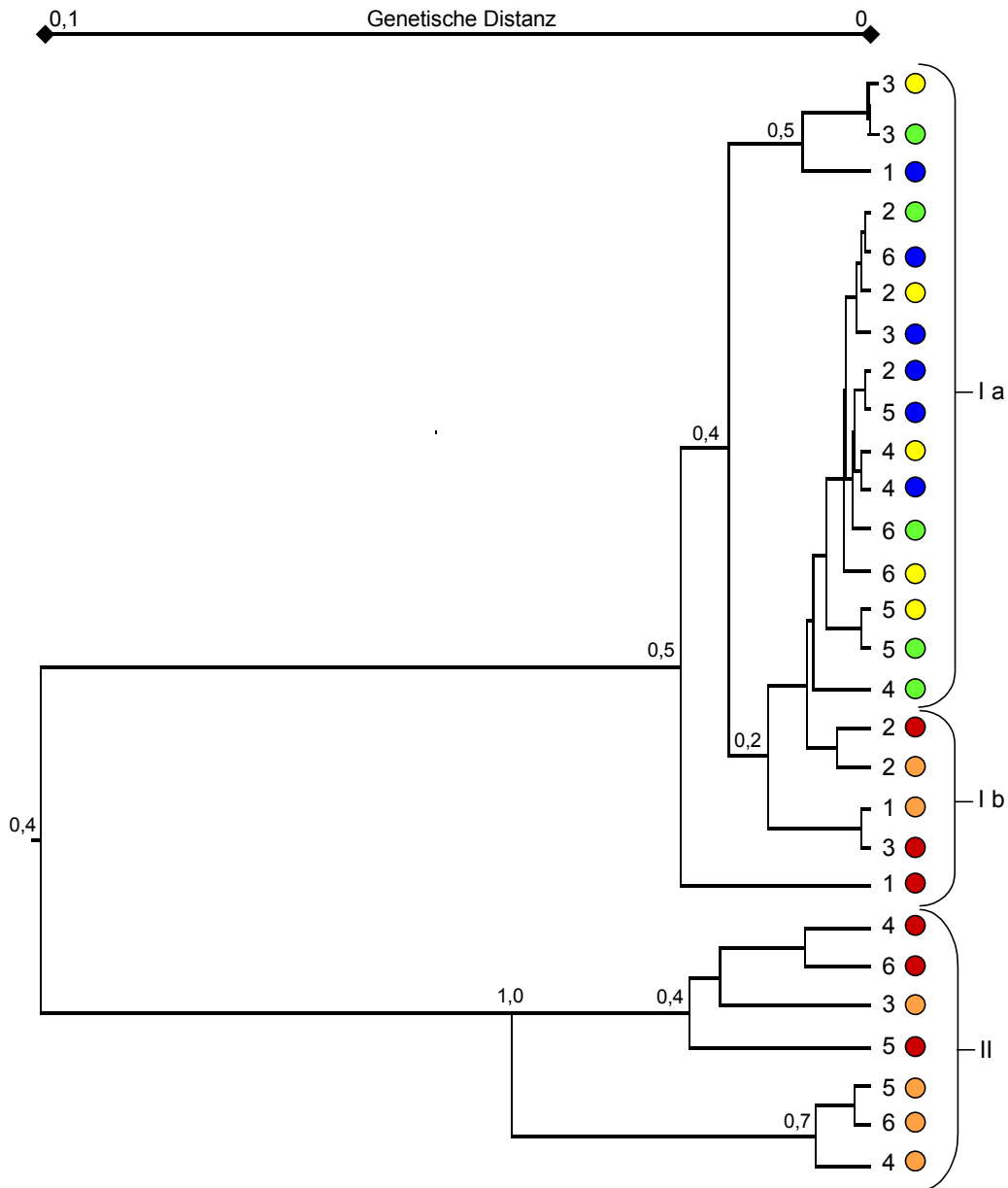
Genetische Differenzierung im Verlauf des Herbstes von Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ), Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ), Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), Männchen ( $M$ ) und Dauereiern aus dem Brutraum ( $D_W$ ). Dargestellt sind nur signifikante Werte ( $p < 0,05$ ). Am 12. Oktober wurden keine Weibchen mit Dauereiern und Dauereier aufgesammelt (*n.a.*).

Typ	Tag	Datum (1999)	genetische Differenzierung der <i>Daphnia</i> -Typen					
			Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
$W_0$	1	12. Okt.	————					
	2	26. Okt.		————				
	3	09. Nov.	< 0,001		————			
	4	23. Nov.			0,029	————		
	5	07. Dez.	0,033	0,001	< 0,001		————	
	6	19. Dez.	0,006	0,024				————
$W_S$	1	12. Okt.	————					
	2	26. Okt.		————				
	3	09. Nov.	0,001	0,009	————			
	4	23. Nov.	< 0,001	< 0,001		————		
	5	07. Dez.	< 0,001	< 0,001			————	
	6	19. Dez.	< 0,001	< 0,001				————
$W_D$	1	12. Okt.	————					
	2	26. Okt.	<i>n.a.</i>	————				
	3	09. Nov.	<i>n.a.</i>		————			
	4	23. Nov.	<i>n.a.</i>			————		
	5	07. Dez.	<i>n.a.</i>				————	
	6	19. Dez.	<i>n.a.</i>					————
$M$	1	12. Okt.	————					
	2	26. Okt.		————				
	3	09. Nov.			————			
	4	23. Nov.		0,008	0,012	————		
	5	07. Dez.				0,001	————	
	6	19. Dez.						————
$D_W$	1	12. Okt.	————					
	2	26. Okt.	<i>n.a.</i>	————				
	3	09. Nov.	<i>n.a.</i>		————			
	4	23. Nov.	<i>n.a.</i>		0,016	————		
	5	07. Dez.	<i>n.a.</i>	0,024	0,007	0,003	————	
	6	19. Dez.	<i>n.a.</i>				0,018	————

Für die *D. hyalina*-Population im Herbst wurden, basierend auf den Algorithmen von Nei (1972) die genetischen Distanzen errechnet und mittels einer Clusteranalyse (Abbildung 3.19) dargestellt. Basierend auf anderen Distanzalgorithm wurden die gleichen Ergebnisse produziert, die nicht dargestellt werden.

Die UPGMA-Clusteranalyse verdeutlicht die genetische Gruppierung von *D. hyalina* im Herbst '99. Nach der UPGMA-Clusteranalyse sind zwei Gruppen zu erkennen. Eine Gruppe

(I a) enthält alle Weibchen mit Dauereiern ( $W_D$ ), die Dauereier ( $D_W$ ) und die Männchen ( $M$ ). Weiterhin sind in dieser Gruppe Daphnien ( $W_0$ ;  $W_S$ ) vom frühen Herbst, d.h. bis zum 2. bzw. 3. Probenahmetag (I b). Die zweite Gruppe (II) besteht aus Weibchen mit Subitaneiern ( $W_S$ ) und ohne Eier ( $W_0$ ), die nach dem 2. bzw. 3. Probenahmetag gefangen wurden.



**Abbildung 3.19 Clusteranalyse für *D. hyalina* im Herbst**

Clusteranalyse für *D. hyalina* Weibchen ohne Eier ( $W_0$ ; ●), mit Subitaneiern ( $W_S$ ; ●), mit Dauereiern ( $W_D$ ; ●), Männchen ( $M$ ; ●) und Dauereiern ( $D_W$ ; ●) dargestellt für die Probenahmetage 1 - 6 im Herbst (12. Oktober bis 19. Dezember '99). Zu Beginn des Beobachtungszeitraums wurden keine Daphnien mit Dauereiern oder Dauereier beobachtet. Angegeben ist für die wichtigsten Knotenpunkte der Anteil gleicher Replikate nach dem Bootstrap. Die Klammern verdeutlichen nur die Zugehörigkeit der Proben zu Daphnien, die sich nicht oder asexuell (I b; II) oder die sich bisexuell (I a) fortpflanzen.

### 3.4 Dauereier im Sediment und im Spülsaum

*Daphnia*-Dauereier, die ins Sediment absinken, können dort im Diapause-Stadium Monate und Jahre lebensfähig überdauern. Zu gegebener Zeit können die Dauereier schlüpfen und den Genpool einer bestehenden Population beeinflussen oder sogar eine neue Population aufbauen. Die Bedeutung des Dauerei-Reservoirs für die Populationsdynamik der Daphnien im Belauer See soll in den folgenden Kapiteln näher untersucht werden.

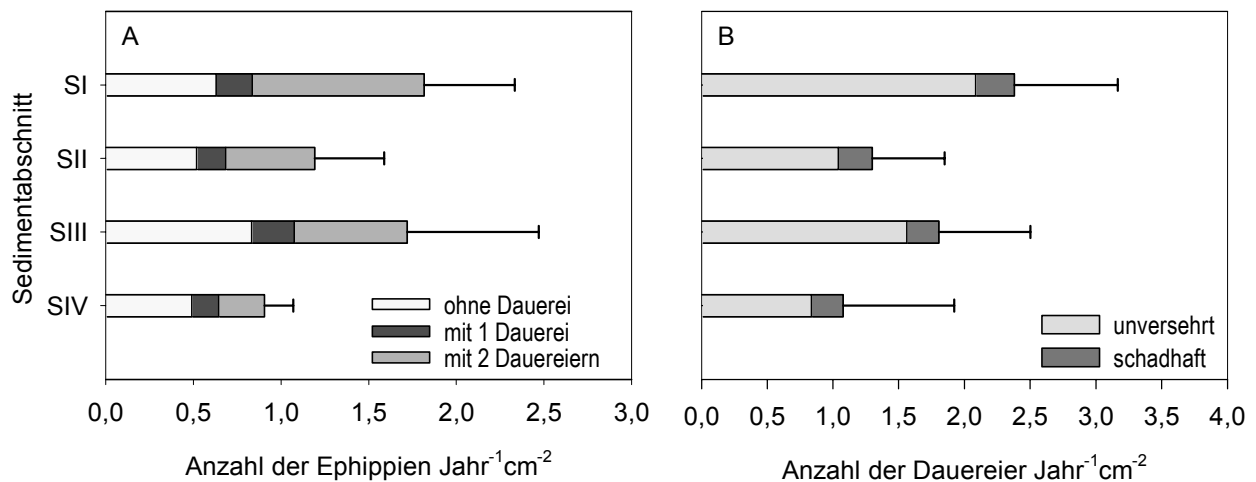
#### 3.4.1 Abundanzen von Dauereiern im Sediment

In Abbildung 3.20 sind die Abundanzen und die Zusammensetzung der Ehippien und Dauereier im Sediment des Belauer Sees dargestellt. Für die Analyse wurden insgesamt 3 Sedimentkerne gezogen (Abschnitt 2.2.3.1). Während eine dünne Eisschicht den Belauer See bedeckte wurden 2 Sedimentkerne im Dezember '98 gezogen. Im März '99, kurz nach dem Auftauen der Eisdecke, wurde ein weiterer Sedimentkern gezogen. Da eine jährliche Sedimentationsrate von 2 cm ( $\pm 0,2$  cm) an dieser Stelle im Belauer See gemessen wurde (persönliche Mitteilung Dr. D. Garbe-Schönberg, Christian-Albrechts-Universität, Kiel), kann davon ausgegangen werden, daß der obere Sedimentabschnitt von 2 cm Tiefe annähernd die Sedimentation im Jahre 1998 widerspiegelt.

Bei der Analyse wurden sowohl Ehippien mit 1 oder 2 Dauereiern als auch leere Ehippien gefunden. Im Sedimentabschnitt I (obere 2 cm) wurden doppelt so viele Ehippien wie im Sedimentabschnitt IV (10 - 14 cm) gefunden. Allerdings wurden im Sedimentabschnitt III mehr Ehippien als im Sedimentabschnitt II beobachtet. Der Anteil der Ehippien ohne Dauereier nimmt mit zunehmender Tiefe des Sediments von 35 % auf über 50 % zu. Ehippien mit nur einem Dauerei stellen den geringsten Anteil dar, während im Sedimentabschnitt I in über 50 % der Ehippien zwei Dauereier gefunden wurden. Bis zum Sedimentabschnitt IV reduziert sich dieser Anteil auf 30 %.

Weiterhin wurde die Beschaffenheit der Dauereier untersucht. Dazu wurden die Ehippien vorsichtig geöffnet und zwischen unversehrten und schadhafte Dauereiern unterschieden. Als schadhaft wurden die Dauereier angesehen, die ausgetrocknet oder verkümmert waren, und daher offensichtlich ein geringes oder kein Potential zum Schlüpfen besitzen. Der Anteil der schadhafte Dauereier betrug 13 % bis 22 %. Die Zahl der jährlich produzierten Dauereier

liegt zwischen 1,1 - 2,4 pro  $\text{cm}^2$ . Dabei nimmt die Zahl der Dauereier nicht stetig ab, sondern schwankt jährlich.



**Abbildung 3.20 Jährliche Dauerei-Produktion im Belauer See**

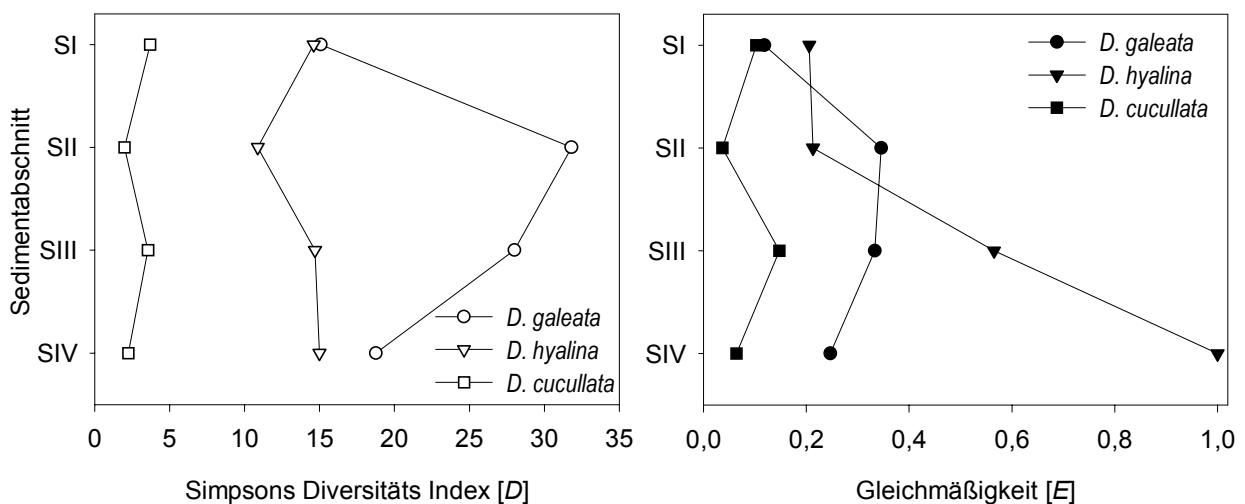
Dargestellt sind die mittleren Abundanzen mit Standardabweichungen ( $n = 3$ ) für die Zusammensetzung von Ehippien (A) und für die Anzahl der Dauereier (B) der *D. longispina*-Gruppe im Sediment des Belauer Sees. Die Ehippien und Dauereier wurden aus zwei Sedimentkernen vom 22. Dezember '98 und aus einem vom 2. März '99 isoliert.

### 3.4.2 Gleichmäßigkeit der Verteilung der Dauereier im Sediment

Die Daphnien-Klone stellen die Basis für die Berechnung von Simpsons Diversitäts Index (Simpson, 1949) dar. Neben der Diversität ( $D$ ) wurde die Gleichmäßigkeit ( $E$ ) der Verteilung der Klone ermittelt. Dabei bedeuten an Null grenzende Werte eine ungleichmäßige Verteilung der Klone, während der maximale Wert von 1 anzeigt, daß alle Klone gleich häufig vertreten sind. Dieser Index wird stark durch die am häufigsten vorkommenden Arten bzw. Klone gewichtet und ist weniger sensitiv in Bezug auf den Artenreichtum bzw. die klonale Vielfalt (Magurran, 1988).

Die Ergebnisse für die Taxa im Belauer See sind in Abbildung 3.21 dargestellt. *D. galeata*-Dauereier zeigen die größte Diversität. Die Diversität nimmt nicht mit zunehmender Tiefe ab, sondern die maximalen Werte werden für Dauereier in den Sedimentabschnitten II ( $D = 32$ ) und III ( $D = 28$ ) erzielt. Die klonale Variation von *D. hyalina*- und *D. cucullata*-Dauereiern verläuft relativ konstant in allen Sedimentabschnitten, wobei die Diversität mit Abstand am niedrigsten für *D. cucullata*-Dauereier ( $D = 2 - 3$ ) ist. Dabei ist zu beachten, daß die maximal

erreichbare Diversität vom Probenumfang abhängig ist, und bei *D. cucullata* die wenigsten Dauereier analysiert wurden (Tabelle 3.20). Der Index für die Äquitabilität der Klone bei *D. galeata*-Dauereiern nimmt zunächst zwischen den Sedimentabschnitten I ( $E = 0,12$ ) und II ( $E = 0,35$ ) stark zu und verringert sich dann zunehmend bis zum Sedimentabschnitt IV. Die *D. hyalina*-Dauereier unterscheiden sich im Sedimentabschnitt I und Sedimentabschnitt II kaum in der Äquitabilität ( $E = 0,21$ ). Die Äquitabilität steigt im Sedimentabschnitt III und erreicht im Sedimentabschnitt IV den maximalen Wert von 1. In diesem Abschnitt wurden allerdings die wenigsten *D. hyalina*-Dauereier ( $n = 15$ ) gefunden. Die Gleichmäßigkeit der *D. cucullata*-Dauereier schwankt in den Sedimentabschnitten I bis IV um einen Mittelwert ( $E = 0,09$ ).



**Abbildung 3.21 Simpson's Diversitäts Index und die Äquitabilität von Daphnia-Klonen im Sediment**

Simpsons Diversitäts Index ( $D$ ) und Gleichmäßigkeit ( $E$ ) wurden für die Sedimentabschnitte I bis IV (SI bis SIV) zweier Sedimentkerne vom Dezember '98 und eines Kernes vom März '99 ermittelt. Für die Anzahl der analysierten Dauereier siehe Tabelle 3.20.

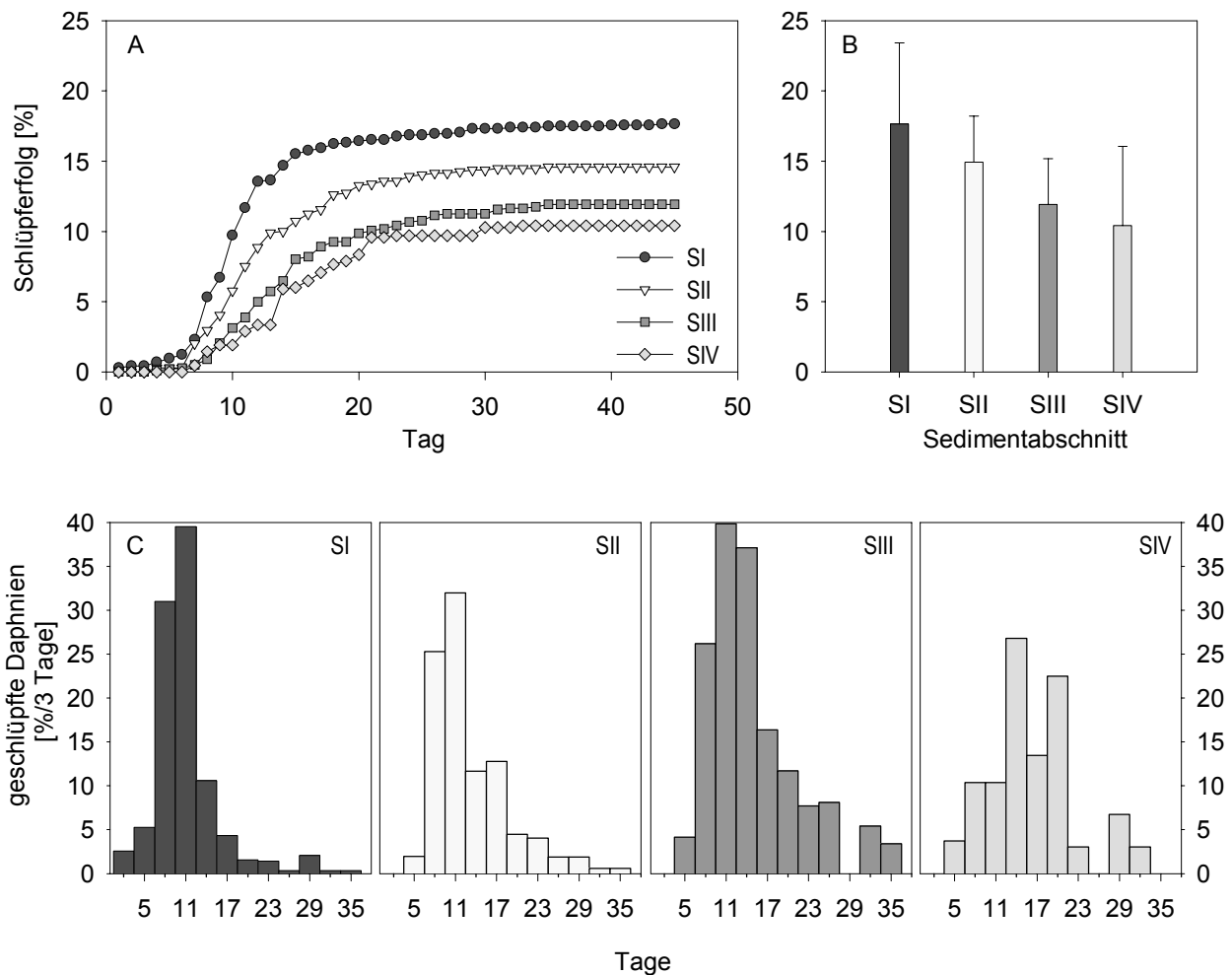
### 3.4.3 Schlüpfertfolg von *Daphnia*-Dauereiern

Die Schlüpfertfähigkeit von Dauereiern aus dem Sediment wurde einerseits unter optimalen Bedingungen untersucht, andererseits mit einer Sediment-Überschichtung. Die Schlüpfertfähigkeit von treibenden Dauereiern aus dem Spülsaum wurde unter optimalen Bedingungen analysiert.

#### 3.4.3.1 Schlüpfertfolg von *Daphnia*-Dauereiern aus dem Sediment ohne Sediment-Überschichtung

Der jeweilige Schlüpfertfolg von *Daphnia*-Dauereiern aus den Sedimentabschnitten I bis IV wurde für 80 Tage unter optimalen Bedingungen ohne Sediment registriert (s. Abschnitt 2.3.3). Nach 45 Tagen wurden aus den Sedimentabschnitten I, II und IV keine geschlüpferten Daphnien mehr beobachtet. Ein Nachzügler aus dem Sedimentabschnitt III schlüpfte am Tag 60 mit einer Verzögerung von 28 Tagen. In Abbildung 3.22 (A) sind die Mittelwerte für den kumulativen Schlüpfertfolg von Daphnien aus den Dauereiern der Sedimentabschnitte I bis IV über 45 Tage dargestellt. In Abbildung 3.22 (B) sind die Standardabweichungen abgebildet. Nach 45 Tagen ist der größte Schlüpfertfolg bei den Dauereiern aus dem Sedimentabschnitt I zu verzeichnen. Der Schlüpfertfolg nimmt in den tieferen Sedimentabschnitten zunehmend ab. Einige Daphnien ( $4,7\% \pm 1,06$ ) starben trotz fortgeschrittener Entwicklung bereits im Dauerei und werden nicht in den Schlüpfertfolg miteinbezogen. Andere Daphnien schlüpferten mit Mißbildungen oder starben bereits kurze Zeit nach dem Schlüpfen ( $3,6\% \pm 2,62$ ). Die Mehrzahl der Daphnien schlüpferte jedoch unversehrt.

Der Schlüpfprozess setzte für Dauereier aus dem Sedimentabschnitt I bereits nach einem Tag (Abbildung 3.22 (C)) ein. Mit zunehmender Tiefe des Sediments schlüpferten die Daphnien später. Während beispielsweise die Hälfte der Daphnien aus dem Sedimentabschnitt I bereits nach 10 Tagen geschlüpfert war, wurde dieses Ergebnis für Dauereier aus dem Sedimentabschnitt II nach 11 Tagen, für Dauereier aus dem Sedimentabschnitt III nach 14 Tagen und für Dauereier aus dem Sedimentabschnitt IV erst nach 15 Tagen erreicht.



**Abbildung 3.22 Schlüpfertag von *Daphnia*-Dauereiern ohne Sediment-Überschichtung**

Schlüpfertag von *Daphnia*-Dauereiern ohne Sediment-Überschichtung aus den Sedimentabschnitten I bis IV (SI bis SIV) zweier Kerne vom Dezember '98 und eines Kernes vom März '99 ( $n = 3$ ). (A) Mittelwerte für den kumulativen Schlüpfertag. (B) Mittelwerte und Standardabweichungen für den Schlüpfertag. (C) Anteil der geschlüpften Daphnien dargestellt in Gruppen von jeweils 3 Tagen. Insgesamt wurden aus SI 903 Dauereier, aus SII 723 Dauereier, aus SIII 1050 Dauereier und aus SIV 381 Dauereier zum Schlüpfen exponiert.

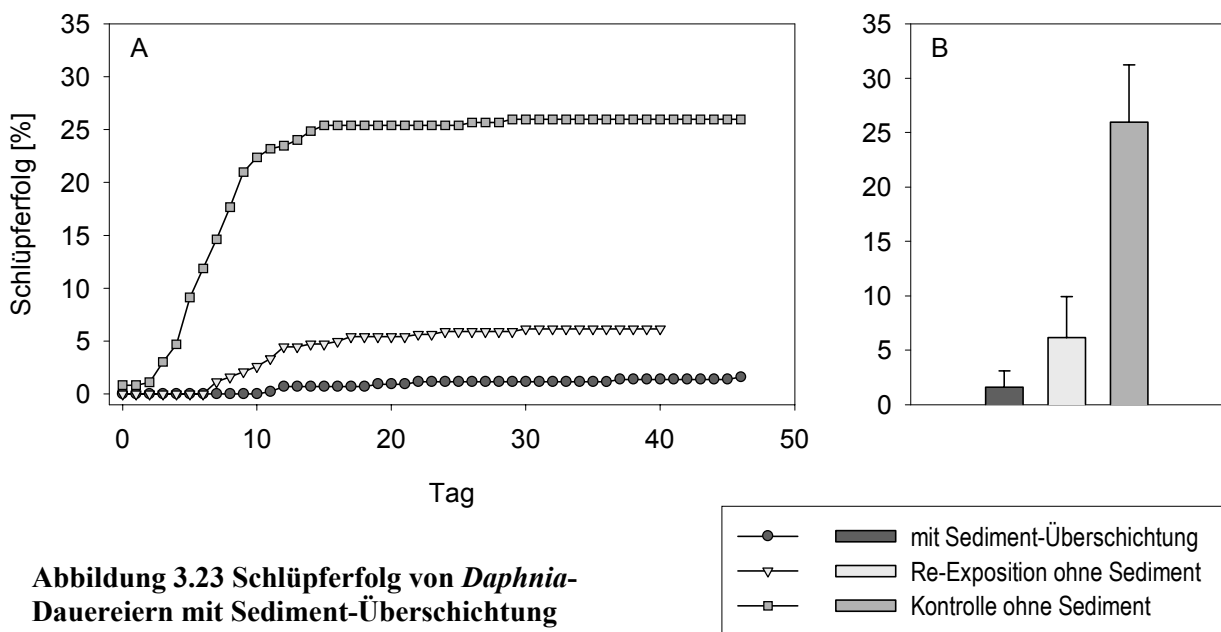
### 3.4.3.2 Schlüpfertag von *Daphnia*-Dauereiern aus dem Sediment mit Sediment-Überschichtung

In einem Versuch wurden Dauereier aus dem Sedimentabschnitt I mit gesiebttem Sediment aus dem Belauer See vermischt und mit filtriertem Seewasser überschichtet. Die Sedimentschicht betrug etwa 2 cm. Zur Kontrolle wurden Dauereier parallel dazu ohne Sediment-Überschichtung exponiert. In beiden Ansätzen wurden die geschlüpften Daphnien über eine Dauer von 68 Tagen registriert.



Der Schlüpfertag beim Kontrollansatz (Abbildung 3.23) lag bei 25 %. Die Dauereier, die von einer Sedimentschicht bedeckt wurden, zeigten einen wesentlich geringeren Schlüpfertag (1,6 %), nur 7 Daphnien, 4 *D. galeata*, 2 *D. hyalina* und 1 *D. cucullata* (Ht 230/230), schlüpften aus insgesamt 434 Dauereiern. Die Taxa schlüpften ungefähr im gleichen Verhältnis, wie ohne Sediment-Überschichtung (Abschnitt 3.4.4). Die hohen Standardabweichungen erklären sich teilweise dadurch, daß in einem von 4 Replikaten keine Daphnien geschlüpft sind.

Nach 68 Tagen wurde der Versuch mit Sediment-Überschichtung unterbrochen und die verbliebenen, nicht geschlüpften Dauereier (427) isoliert. Unmittelbar danach wurden die Dauereier ohne eine Sediment-Überschichtung zum Schlüpfen exponiert. Nach 8 Tagen begannen die ersten Daphnien zu schlüpfen. Nach 30 Tagen schlüpfte die letzte Daphnie. Es schlüpften 16 *D. galeata*, 6 *D. hyalina* und 4 *D. cucullata* (Ht 230/230), auch dieses Verhältnis entspricht ungefähr dem in Abschnitt 3.4.4 dargestellten. Der Schlüpfertag ist mit 4,6 % deutlich geringer als in der Kontrolle, jedoch wesentlich höher als mit Sediment-Überschichtung zuvor.

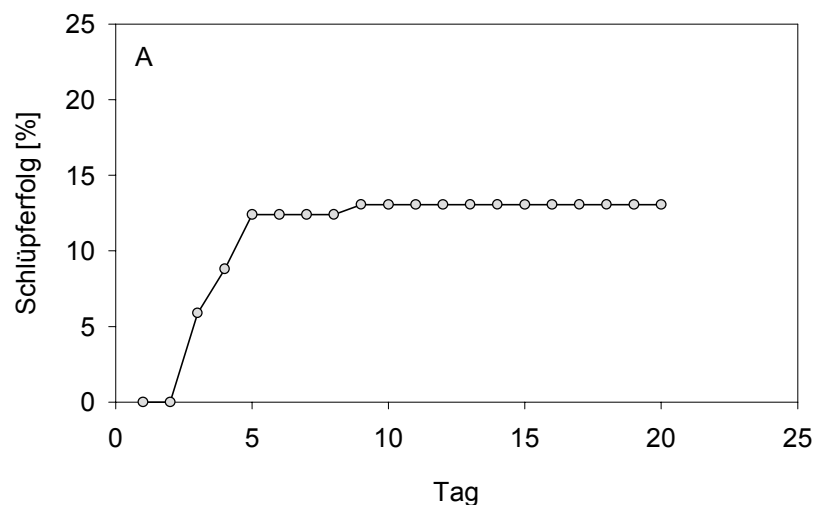


Schlüpfertag von *Daphnia*-Dauereiern bei drei unterschiedlichen Bedingungen. (A) Mittelwerte für den kumulativen Schlüpfertag sowie (B) die Mittelwerte und Standardabweichungen nach 60 Tagen. Insgesamt wurden 434 Dauereier in 4 Replikaten zwei Monate zum Schlüpfen mit Sediment-Überschichtung exponiert. Danach wurden die Dauereier aus dem Sediment isoliert und die verbleibenden, nicht geschlüpften 427 Dauereier ohne Sediment-Überschichtung erneut zum Schlüpfen belassen. Drittens wurden 362 Dauereier zur Kontrolle in 4 Replikaten ohne Sediment-Überschichtung zum Schlüpfen exponiert. Die Dauereier stammen aus dem Sedimentabschnitt I mehrerer Kerne vom März '99.

### 3.4.3.3 Schlüpfertag von *Daphnia*-Dauereiern aus dem Spülsaum

Im Mai '99 wurden über tausend treibende Dauereier aufgesammelt und zwei Monate lang zum Schlüpfen in Seewasser überführt. Eine Teilprobe (67) wurde genetisch analysiert und alle Dauereier als *D. galeata* bestimmt. Nach 9 Tagen schlüpfte eine einzige Daphnie. Daraufhin wurde der Versuch mit treibenden *D. galeata*-Dauereiern, die überwintert hatten und im März '00 aufgesammelt wurden, wiederholt. Dabei wurde angenommen, daß es sich um die im Mai '99 produzierten *D. galeata*-Dauereier handelte, da in der Zwischenzeit keine ephippien-tragenden *D. galeata* beobachtet wurden. Für die Schlüpfversuche standen verhältnismäßig wenige Dauereier (128) zur Verfügung, deren Ephippien in äußerlich schlechtem Zustand waren.

Aus den im Versuch eingesetzten 128 Dauereiern schlüpften insgesamt 15 Daphnien (13,1 %  $\pm$  9,27) innerhalb der Versuchsdauer (Abbildung 3.24). Schon nach 3 Tagen begannen die Eier zu schlüpfen, nach dem 9. Tag schlüpften keine weiteren Daphnien.



**Abbildung 3.24 Schlüpfertag von treibenden *D. galeata*-Dauereiern**

Schlüpfertag von 128 treibenden *D. galeata*-Dauereiern. (A) Mittelwerte aus 3 Unterproben für den kumulativen Schlüpfertag sowie (B) der Mittelwert und die Standardabweichung nach 60 Tagen.

### 3.4.4 Vergleich der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien

#### 3.4.4.1 Taxonomische Zusammensetzung der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien

Mit Hilfe einer SSCP-Analyse wurden die maternalen Haplotypen der Dauereier im Sediment und der daraus geschlüpften Daphnien verglichen. Die jeweilige Anzahl der Daphnien ist in Tabelle 3.19 angegeben.

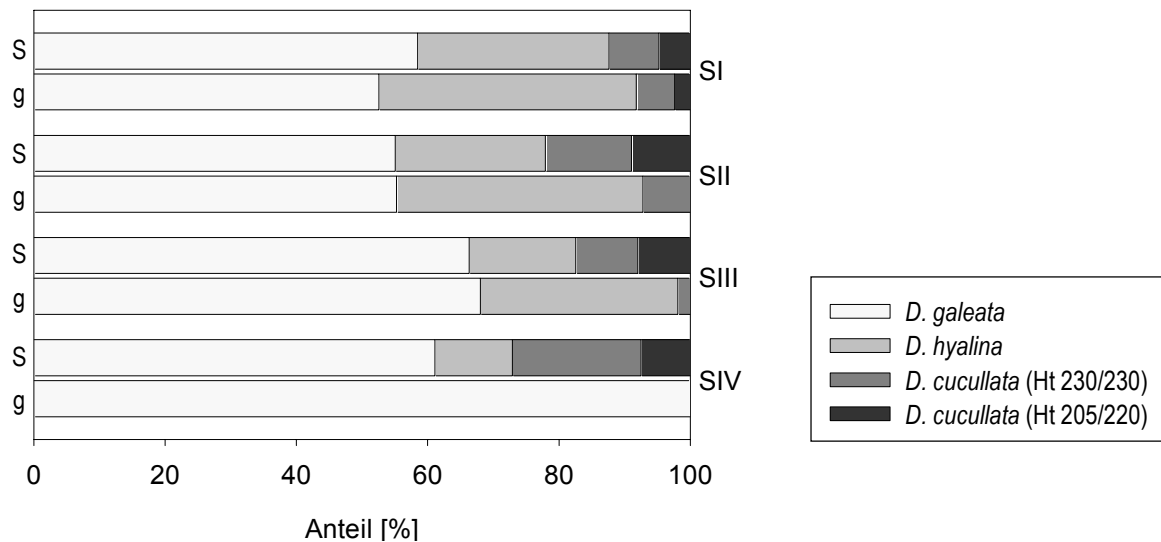
**Tabelle 3.19 Anzahl und Anteil der Taxa im Sediment und bei den geschlüpften Daphnien**

Anzahl ( $n$ ) und Anteil (%) der Dauereier im Sediment (S) und der geschlüpften Daphnien (g; Abschnitt 3.4.3.1). Angegeben ist auch die Gesamtzahl der zum Schlüpfen exponierten Dauereier ( $n_{\Sigma}$ ). Die Dauereier wurden jeweils aus den Sedimentabschnitten I - IV (SI - SIV) zweier Sedimentkerne vom Dezember '98 und eines Sedimentkernes vom März '99 isoliert.

Sediment- abschnitt	<i>D. galeata</i>				<i>D. hyalina</i>				<i>D. cucullata</i>				gesamt		
	S		g		S		g		S		g		S	g	
	$n$	%	$n$	%	$n$	%	$n$	%	$n$	%	$n$	%	$n$	$n$	$n_{\Sigma}$
SI	185	57	171	24	96	29	87	24	45	14	21	12	326	279	1265
SII	153	52	52	14	70	24	41	24	72	24	5	3	295	98	723
SIII	143	67	51	7	34	16	45	27	37	17	3	2	214	99	1050
SIV	122	61	18	8	26	13	—	0	51	26	—	0	199	18	381
gesamt	603		292		226		173		205		29		1034	494	3419

Die meisten geschlüpften Daphnien (53 - 100 %) gehören zum Taxon *D. galeata* (Abbildung 3.25). Dabei ist der Anteil bei *D. galeata*-Dauereiern im Sediment und bei geschlüpften *D. galeata* in den ersten drei Sedimentabschnitten vergleichbar. Allerdings nimmt der Schlüpferfolg mit zunehmender Sedimenttiefe ab (Tabelle 3.19). Die Daphnien, die aus den Dauereiern des Sedimentabschnitts IV schlüpften, gehörten alle zum Taxon *D. galeata*. Allerdings schlüpften nur wenige Daphnien (18) aus Dauereiern, die aus dem Sedimentabschnitt IV isoliert worden waren. Während der Anteil von *D. hyalina*- und *D. cucullata*-Dauereiern im Sediment nahezu ausgeglichen war, schlüpften mit gleichbleibendem Erfolg deutlich mehr *D. hyalina*. Für *D. cucullata* wurden lediglich zwei (Ht 205/220; Ht 230/230) der drei im Pelagial auftretenden maternalen Linien gefunden. Ebenso wie im Pelagial (Abbildung 3.8) dominierte der Haplotyp 230/230 bei den Dauereiern im Sediment. Auch die geschlüpften *D. cucullata* setzten sich größtenteils aus dieser maternalen Linie zusammen. Die maternale Linie 205/220 wurde nur bei den geschlüpften Daphnien, die aus dem Sedimentabschnitt I

stammten, beobachtet. Die Taxa im Belauer See schlüpften in vergleichbaren Verhältnissen in den Versuchen ohne Sediment-Überschichtung wie in den Versuchen mit Sediment-Überschichtung (3.4.3.2).



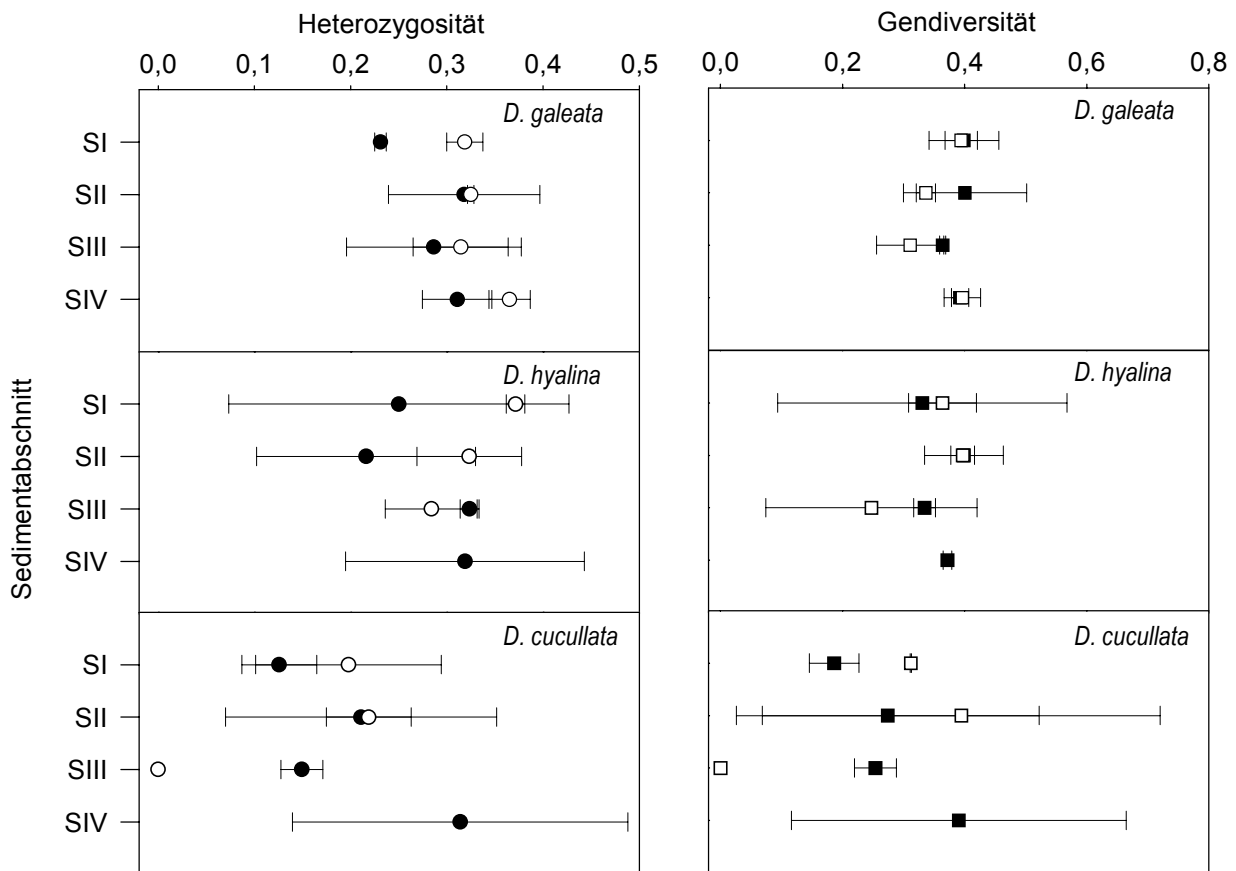
**Abbildung 3.25 Taxonomische Zusammensetzung**

Relative taxonomische Zusammensetzung von Dauereiern aus dem Sediment (S) und der daraus geschlüpften Daphnien (g). Die Dauereier stammen aus den Sedimentabschnitten I - IV der Sedimentkerne vom Dezember '98 und März '99.

### 3.4.4.2 Genetische Variation der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien

Die genetische Variation von Dauereiern im Sediment wurde mit der der geschlüpften Daphnien verglichen. Dazu wurden die Parameter Heterozygotität ( $H$ ) und Gendiversität ( $D$ ) untersucht (Abbildung 3.26). Aus jedem Ephippium wurde für die Analyse jeweils nur ein Dauerei verwendet, da bei den geschlüpften Daphnien beobachtet wurde, daß häufig nur eines von zwei Dauereiern schlüpft. Für *D. galeata* ist zu erkennen, daß die Heterozygotität der geschlüpften Daphnien im Sedimentabschnitt I signifikant höher und in den übrigen Sedimentabschnitten tendenziell höher als für die Dauereier im Sediment ist. Dieser Trend ist auch für *D. hyalina* zu beobachten. Die Ergebnisse für die geschlüpften *D. cucullata* sind dargestellt, basieren jedoch auf einem geringen Schlüpfertfolg. Die wenigen geschlüpften *D. cucullata* aus dem Sedimentabschnitt III sind genetisch identisch. In der Regel war die Gendiversität der geschlüpften *D. galeata* und *D. hyalina* entweder gleich oder sogar niedri-

ger als für die Dauereier im Sediment. Dies bedeutet einen Verlust von genetischer Information (Allele).



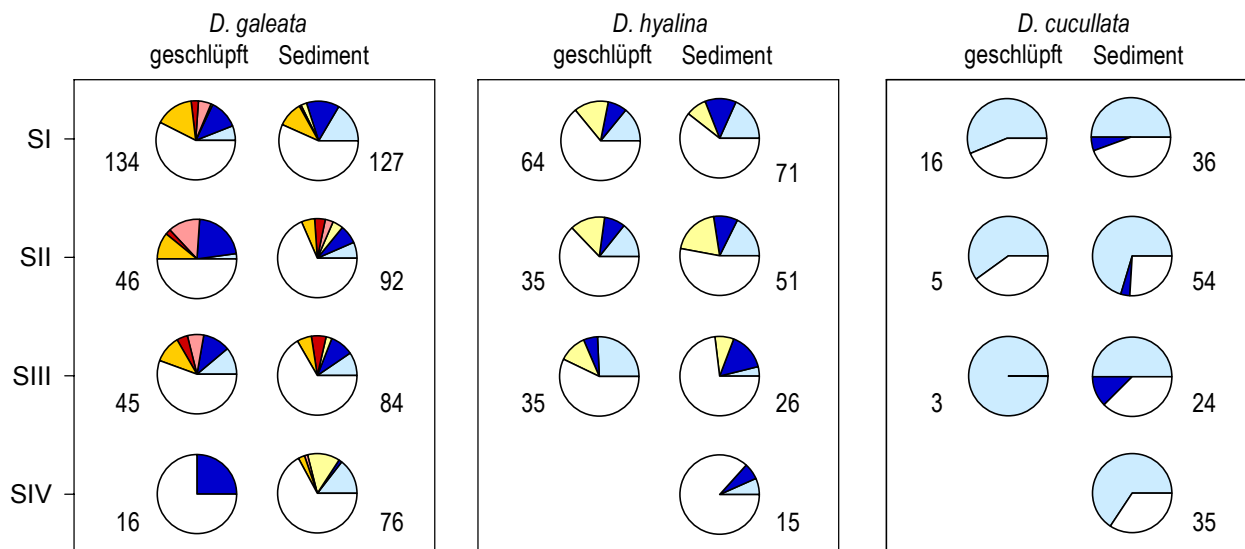
**Abbildung 3.26 Genetische Variation von Dauereiern im Sediment und geschlüpften Daphnien**

Darstellung der Heterozygotie und Gendiversität von Dauereiern aus dem Sediment (●; ■) und von geschlüpften Daphnien (○; □). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand zweier Sedimentkerne vom 22.12.98 und eines Sedimentkernes vom 2.3.99 für die Sedimentabschnitte I-IV ermittelt. Die Anzahl der Proben (Dauereier im Sediment; geschlüpfte Daphnien) betrug für *D. galeata*: SI (155; 155); SII (138; 52); SIII (135; 52); SIV (91; 18); für *D. hyalina*: SI (81; 81); SII (56; 41); SIII (27; 45); SIV (21; 0) und für *D. cucullata*: SI (43; 17); SII (64; 5); SIII (30; 3); SIV (43; 0).

### 3.4.4.3 Klonale Zusammensetzung der Dauereier im Sediment und der geschlüpften Daphnien

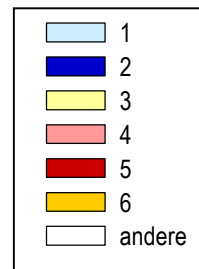
Die klonale Zusammensetzung der geschlüpften Daphnien und der Dauereier im Sediment wurde ermittelt und die Verteilung der häufigsten Klone, mit Frequenzen größer als 0,09, dargestellt (Abbildung 3.27). Die Darstellung aller Klone war nicht möglich. Die häufigsten Klone im Sediment waren auch die häufigsten Klone, die schlüpfen. Dies gilt sowohl für alle

drei Taxa. Während die Summe der häufigsten Klone bei *D. galeata* und *D. hyalina* einen Anteil von 25 bis 50 % ausmachte, stellten diese Klone bei *D. cucullata* mindestens einen Anteil von 60 % dar.



**Abbildung 3.27 Klonale Komposition von Dauereiern und geschlüpften Daphnien**

Dargestellt sind die häufigsten Mikrosatelliten-Klone von geschlüpften Daphnien und Dauereiern aus den Abschnitten I bis IV der Sedimentkerne vom Dezember '98 und März '99. Die Diagramme zeigen die Verteilung der häufigsten ( $f > 0,09$ ) Klone. Neben den Diagrammen aufgeführt ist die Anzahl der analysierten Daphnien. Die Zahlen in der Legende beziehen sich auf die Bezeichnung der Klone. Unter dem Begriff „andere“ sind die übrigen Klone mit geringeren Frequenzen ( $f < 0,09$ ) zusammengefasst. Gleiche Benennungen der Klone bei verschiedenen Taxa sind nicht gleichbedeutend mit identischen Klonen.



Der Vergleich der Allelfrequenzen der häufigsten Klone (Tabelle 3.20) in einem Exakten Test bestätigt die Aussage, daß die geschlüpften *D. hyalina* und *D. cucullata* nicht unterschiedlich von den Dauereiern im Sediment sind. Abweichungen sind bei *D. galeata* zu beobachten. Die häufigsten geschlüpften *D. galeata*-Klone aus dem Sedimentabschnitt II sind signifikant und die aus dem Sedimentabschnitt IV sind marginal signifikant verschieden von den Dauereiern aus den jeweiligen Sedimentabschnitten.

Ein Vergleich der Allelfrequenzen aller Klone weist für *D. galeata* und *D. hyalina* eine genetische Differenzierung der geschlüpften Daphnien und der Dauereier im Sediment auf. *D. cucullata* zeigt auch hier genetische Ähnlichkeiten für die wenigen geschlüpften Daphnien und die Dauereier im Sediment.

**Tabelle 3.20 Differenzierung von Dauereiern und geschlüpften Daphnien des gleichen Sedimentabschnitts**

Differenzierung unter Berücksichtigung der häufigsten ( $f < 0,09$ ) und aller Klone von Dauereiern und geschlüpften Daphnien, die aus denselben Sedimentabschnitten (SI-SIV) stammen. Signifikante Differenzierungen ( $p < 0,05$ ) nach einem Exakten Test sind mit dem Zeichen \* hervorgehoben.

Taxon	Differenzierung der häufigsten Klone				Differenzierung aller Klone			
	SI	SII	SIII	SIV	SI	SII	SIII	SIV
<i>D. galeata</i>	0,268	0,004 *	0,847	0,057	0,023 *	0,001 *	0,001 *	< 0,001 *
<i>D. hyalina</i>	0,984	0,902	0,244	—	0,011 *	0,040 *	< 0,001 *	—
<i>D. cucullata</i>	0,969	1	1	—	0,794	0,179	0,886	—

Die durchschnittliche Anzahl der Daphnien pro Klon wurde sowohl für geschlüpfte Daphnien als auch für die Dauereier im Sediment ermittelt (Tabelle 3.21). Dabei ist zu erkennen, daß in der Regel trotz der teilweise unterschiedlichen Anzahl analysierter Daphnien und Dauereier bei *D. galeata* und *D. hyalina* jeweils vergleichbare Werte erhalten wurden.

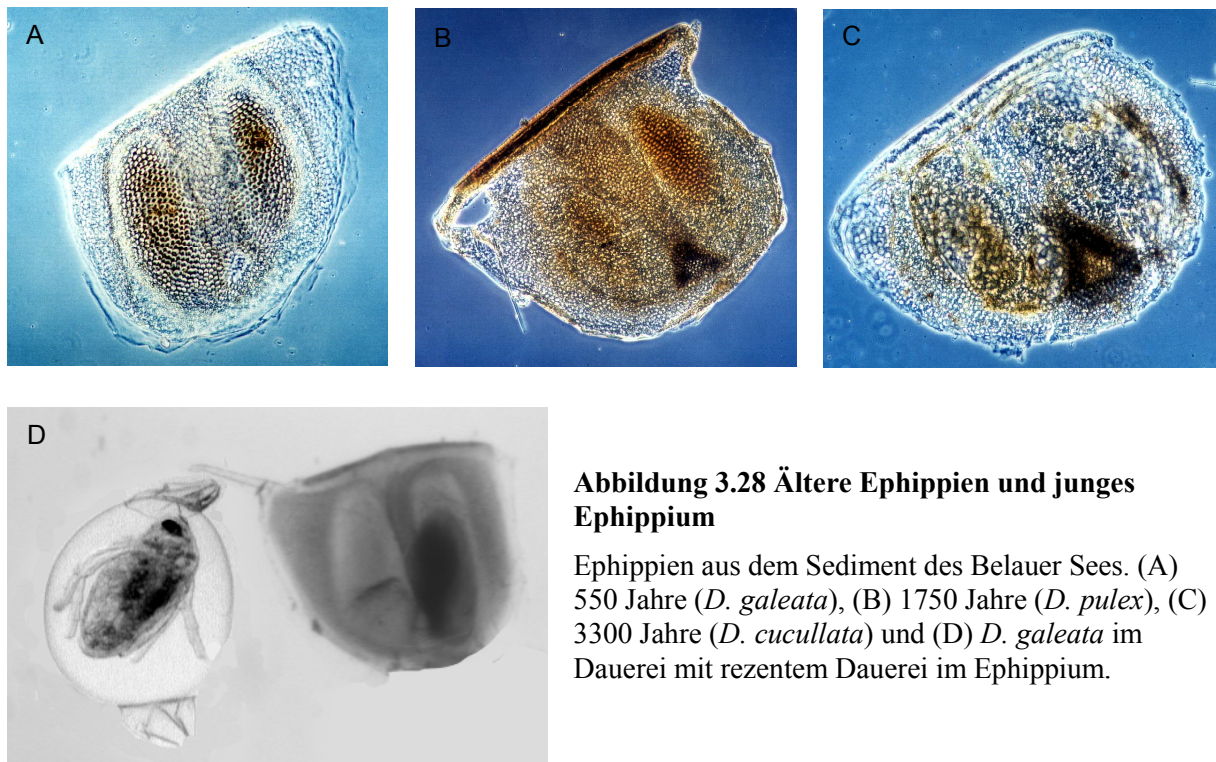
**Tabelle 3.21 Anzahl der untersuchten Daphnien-Klone**

Dargestellt sind die Anzahl der Daphnien und Klone sowie die durchschnittliche Anzahl von Daphnien pro Klon für geschlüpfte Daphnien und Dauereier aus dem Sediment. Es wurden nur Daphnien berücksichtigt, bei denen die vier Mikrosatelliten-Loci (Dpu 6, 30, 45, 122) vollständig analysiert werden konnten.

Taxon	Sediment- abschnitt	geschlüpfte Daphnien			Dauereier im Sediment		
		Anzahl		Daphnien pro Klon	Anzahl		Daphnien pro Klon
		Daphnien	Klone		Dauereier	Klone	
<i>D. galeata</i>	SI	134	56	2,4	127	52	2,4
	SII	46	23	2,0	92	47	2,0
	SIII	45	22	2,0	84	51	1,6
	SIV	16	12	1,3	76	44	1,7
<i>D. hyalina</i>	SI	64	35	1,8	71	36	2,0
	SII	35	25	1,4	51	25	2,0
	SIII	35	20	1,8	26	16	1,6
	SIV	0	—	—	15	12	1,3
<i>D. cucullata</i>	SI	16	8	2,0	36	13	2,8
	SII	5	3	1,7	54	13	4,2
	SIII	3	1	3,0	24	8	3,0
	SIV	0	—	—	35	8	4,4

### 3.5 Paläolimnologische Ergebnisse

Aus einem 30-m-langen Sedimentkern wurden Ehipprien und Dauereier isoliert, die mehrere hundert Jahre und älter waren. Diese Dauereier sind ausgetrocknet und häufig von einem äußerlich beschädigtem Ehippium umgeben. In Abbildung 3.28 ist zu erkennen, daß die Degeneration bei einem 3300 Jahre alten Ehippium oberflächlich nicht weiter fortgeschritten ist als bei einem 550 Jahre alten. Ebenso ist ein 1750 Jahre altes *D. pulex*-Ehippium (B) abgebildet (die Artbestimmung erfolgte freundlicherweise durch Prof. Dr. J. Hrbáček, Charles University, Prague, Czech Republic). Dieses Taxon ist heute nicht mehr im Belauer See vertreten.



**Abbildung 3.28 Ältere Ehippiumen und junges Ehippium**

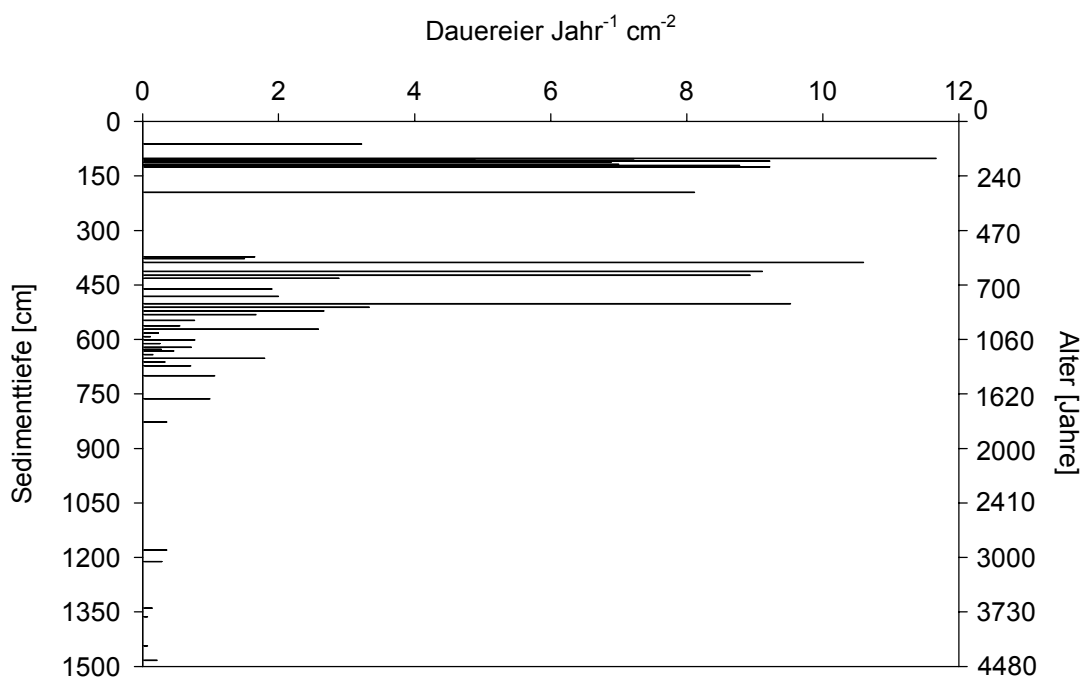
Ehippiumen aus dem Sediment des Belauer Sees. (A) 550 Jahre (*D. galeata*), (B) 1750 Jahre (*D. pulex*), (C) 3300 Jahre (*D. cucullata*) und (D) *D. galeata* im Dauereier mit rezentem Dauereier im Ehippium.

#### 3.5.1 Abundanzen von älteren Dauereiern

Die Abundanzen von Dauereiern im Sediment des Belauer Sees wurden anhand der zur Verfügung stehenden Sedimentabschnitte abgeschätzt. Der Sedimentkern war zum Zeitpunkt der Probenahme durch vorangegangene Projekte bereits stark beansprucht worden. Aufgrund des begrenzt zur Verfügung stehenden Materials war es nicht möglich Replikate für die verschiedenen Tiefen zu analysieren. In Abbildung 3.29 sind die Abundanzen der Dauereier im Sedi-



ment dargestellt. Die größte Anzahl an Dauereiern (bis zu 11 Dauereier pro Jahr und  $\text{cm}^2$ ) wurde für Sedimente festgestellt, die nicht tiefer als 6 m, d.h. nicht älter als 1000 Jahre sind. Die festgestellten Abundanzen stellen teilweise ein Vielfaches der Abundanzen der Dauereier in den Sedimentabschnitten I bis IV des Eckmann-Greifens (Abbildung 3.20) dar. Mit zunehmender Tiefe und zunehmendem Alter nimmt die Abundanz der Dauereier in der Probe ab. Für die in dieser Arbeit ältesten untersuchten Sedimente (4400 Jahre) wurden Abundanzen von lediglich 0,2 Dauereiern pro Jahr und  $\text{cm}^2$  festgestellt. Die meisten Ehippien enthielten zwei Dauereier ( $83,8\% \pm 13,1$ ), vergleichbar mit den rezenten Dauereiern (Abschnitt 3.4.1). Insgesamt wurden 2400 Dauereier aus den alten Sedimenten (62 cm bis 15 m) isoliert.



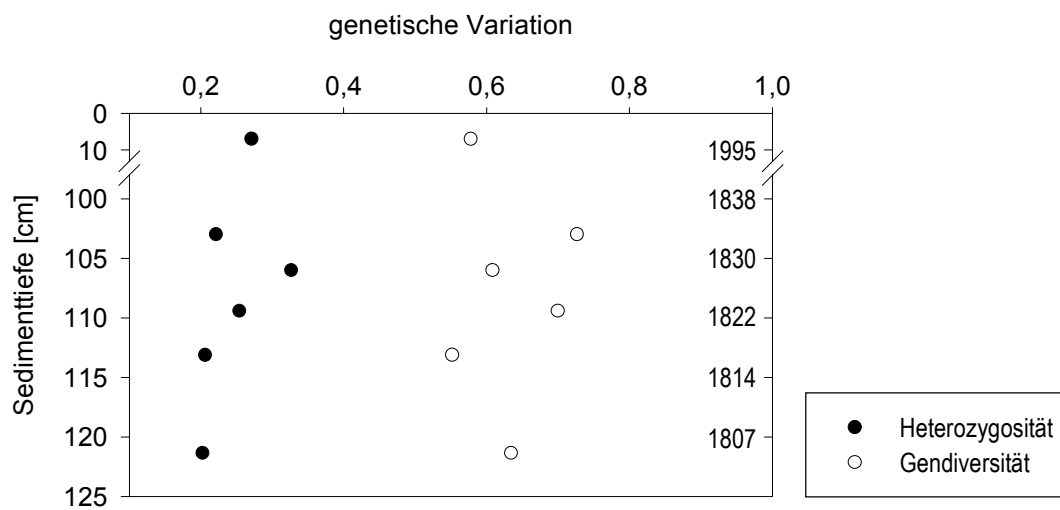
**Abbildung 3.29** Abundanzen von alten Dauereiern im Sediment

### 3.5.2 Genetische Variation von älteren Dauereiern im Sediment

Für die genetischen Analysen älterer Dauereier stehen nur geringe Mengen, von DNA zur Verfügung, die zusätzlich degeneriert sind. Im Unterschied zu den jüngeren Dauereiern war der Erfolg bei der Amplifikation der Mikrosatelliten-Sequenzen wesentlich geringer und benötigt weitere Optimierung. Es wurden Mikrosatelliten-Sequenzen aus etwa 100 Dauereiern amplifiziert. Für jedes analysierte Dauerei wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt. Die

Dauereier stammen aus unterschiedlichen Ephippien. Die analysierten Dauereier waren 150 bis 200 Jahre alt.

In Abbildung 3.30 ist die genetische Variation der Dauereier dargestellt. Die Dauereier zeigen eine geringe Heterozygotität (0,20 bis 0,32) im Gegensatz zur Gendiversität (0,55 bis 0,73). Diese Werte sind vergleichbar mit denen von jüngeren Dauereiern ( $n = 1034$ ) aus den Sedimentabschnitten I bis IV.



**Abbildung 3.30 Genetische Variation bei älteren Dauereiern**

Genetische Variation bei durchschnittlich 7 Jahre alten *D. galeata*, *D. hyalina* und *D. cucullata* Dauereiern (1034) und älteren Dauereiern aus fünf Abschnitten eines 30-m-langen Sedimentkernes (1990). Es wurden 23 Dauereier analysiert, die im Mittel 159 Jahre, 10 Dauereier, die 171 Jahre, 36 Dauereier, die 177 Jahre, 15 Dauereier, die 183 Jahre und 27 Dauereier, die 195 Jahre alt waren.

### 3.5.3 Vergleich der Allelfrequenzen von älteren und jüngeren Dauereiern

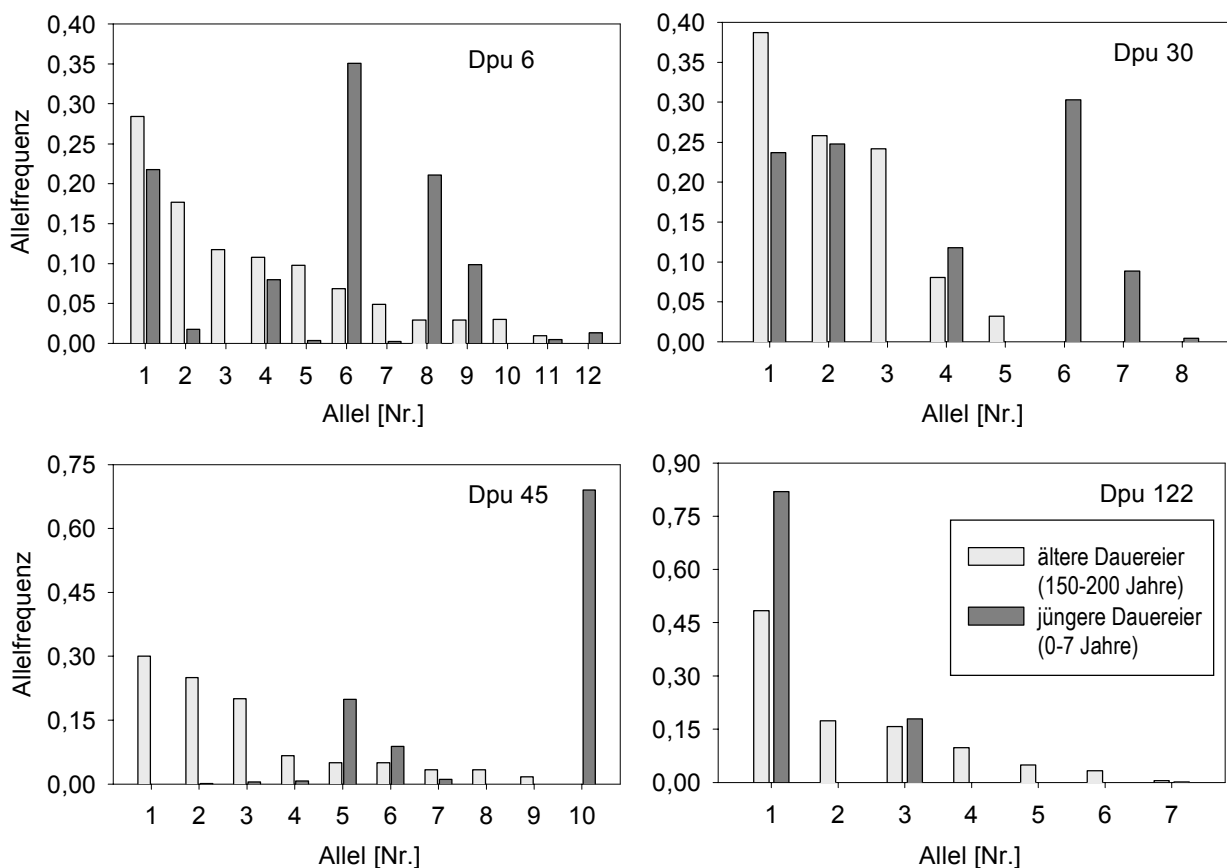
Die Mikrosatelliten-Allelfrequenzen der jüngeren Dauereier aus den Sedimentabschnitten I bis IV der Kerne von Dezember '98 und März '99 wurden mit denen der 150 bis 200 Jahre alten *Daphnia*-Dauereier verglichen. Da bisher keine SSCP-Analyse mit den älteren Dauereiern durchgeführt wurde und das Taxon aufgrund der beschädigter Ephippien teilweise auch morphologisch nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurden die Allelfrequenzen für alle Taxa im Belauer See zusammen dargestellt.

In Abbildung 3.31 sind die Allelfrequenzen der älteren und jüngeren Dauereier für die vier Mikrosatelliten-Loci gezeigt. Für die älteren Dauereier ( $n = 111$ ) wurden mehr Allele als bei

den jüngeren Dauereiern ( $n = 848$ ) beobachtet. Neben den gemeinsamen Allelen sind auch Allele bei den älteren Dauereiern zu erkennen, wie z.B., Allel 3 bei Dpu 6 und Dpu 30 oder Allel 1 bei Dpu 45, die bisher weder bei rezenten Dauereiern noch bei Daphnien im Pelagial gefunden wurden. Andererseits sind auch bei den rezenten Dauereiern häufige Allele vorhanden, wie z.B., Allel 6 bei Dpu 30 oder Allel 10 bei Dpu 45, die nicht bei den älteren Dauereiern gefunden wurden. Die größte Anzahl an Allelen wurde sowohl bei den älteren als auch bei den jüngeren Dauereiern für den Locus Dpu 6 ermittelt. Von den insgesamt 111 Klonen konnte 1 Klon auch in der rezenten Population nachgewiesen werden.

Die Allelfrequenzen der älteren und jüngeren Dauereier unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,0001$ ) und zeigen eine genetische Distanz (Nei, 1972) von  $D = 0,36$ . Die  $F_{ST}$ -Werte ( $0,15 \pm 0,04$ ) deuten ebenfalls auf eine größere Differenzierung zwischen den älteren und jüngeren Dauereiern.

**Abbildung 3.31 Allelfrequenzen von älteren und jungen Dauereiern**



Allelfrequenzen der Mikrosatelliten-Loci Dpu 6, 30, 45 und 122 von 111 älteren (150 bis 200 Jahre) und 848 rezenten (0-7 Jahre) *Daphnia*-Dauereiern. Dargestellt sind Allelfrequenzen für alle Taxa im Belauer See.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methodendiskussion

#### 4.1.1 Bestimmung der maternalen Linien

##### *Methode*

Die Taxa der Daphnien im Belauer See, *D. galeata*, *D. hyalina* und *D. cucullata*, wurden anhand der mitochondrialen DNA bestimmt. Die mitochondrielle DNA (mtDNA) wird bei den meisten Vertebraten und Invertebraten maternal vererbt. Bei manchen Arten ist allerdings paternale (Fungi, Yang & Griffiths, 1993; Muscheln, Zouros, 1992) oder biparentale (Muscheln, Hoeh et al., 1991; Drosophila, Kondo et al., 1990; Samenpflanzen, Mogensen, 1996) Vererbung die Regel. Obwohl seit kurzem die Rekombination von humaner und humanider mtDNA intensiv und kontrovers diskutiert wird (Awadalla et al., 1999; Eyre-Walker et al., 1999; Hagelberg et al., 1999; Hey, 2000; Kivisild et al., 2000), finden in der Regel keine Rekombinations-Ereignisse bei der Vererbung von mtDNA statt (diskutiert in Brown, 1985). Daher können Individuen durch ihre mtDNA-Sequenz einer Art oder maternalen Linie zugeordnet werden (Solignac et al., 1983). Als Marker wurden mtDNA-Sequenzen (280 Nukleotide) einer variablen Region der kleinen ribosomalen Untereinheit (12S rDNA), die aus etwa 950 Nukleotiden (Brown, 1985) besteht, ausgewählt. Diese wurden dann durch eine PCR amplifiziert. Die Sequenzunterschiede in der mtDNA wurden in dieser Arbeit mit der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen (SSCP)-Analyse, die erstmalig für Daphnien optimiert wurde, nachgewiesen. Die SSCP-Analyse (Orita et al., 1989) ist eine schnelle und effiziente Methode, um geringe Sequenzvariationen aufzudecken.

Zu Beginn wurde die SSCP-Analyse mit radioaktiv-markierten PCR-Produkten durchgeführt (Abschnitt 2.4.2.3). Bei dieser Methode können schon geringe Mengen von DNA, wie sie z.B., nach einer PCR der Dauereiern vorliegen, nachgewiesen werden. Daher war es möglich die PCR-Produkte in sehr geringen Mengen einzusetzen und so ein anormales Migrationsverhalten der DNA durch eine Überladung des Gels zu vermeiden. Häufig werden gute Ergebnisse bei Raumtemperatur mit 5-10 % Glycerol (Hayashi, 1991) erreicht. Auch in dieser Arbeit wurden mit den radioaktiv-markierten PCR-Produkten die besten Ergebnisse nach einer Gelelektrophorese bei Raumtemperatur und mit 5 % Glycerol erzielt. Die Gelelektrophorese

mußte allerdings über einen längeren Zeitraum (12 Stunden) durchgeführt werden. Durch die radioaktive Strahlung von  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$  wurde eine stärkere Streuung der DNA-Banden, die als Schwärzung auf einem Röntgenfilm sichtbar wurden, verursacht (Abbildung 3.2). Dies führte dazu, daß die beiden Einzelstränge der PCR-Produkte optisch zu einer einzigen Bande verschmolzen. Dieses Phänomen trat vorwiegend bei  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$  auf. Die mit  $\gamma^{33}\text{P-ATP}$ -markierten PCR-Produkte zeigten zwar schärfere Banden, verursachten aber gleichzeitig eine wesentlich geringere Schwärzung des Röntgenfilms. Dies führte insbesondere bei quantitativ schwächeren PCR-Produkten zu Schwierigkeiten bei dem Nachweis und der Auswertung der Banden.

Ein grundsätzliches Problem, besonders bei der Verwendung größerer Gel-Systeme, ist ein ungleichmäßiger Lauf der PCR-Produkte in der nativen Gelmatrix. Gleiche PCR-Produkte, die in verschiedenen Spuren aufgetragen wurden, migrierten teilweise verschieden weit im Gel. Dies führte zu einem sogenannten *Smile*-Effekt, da das Wanderverhalten von der Entfernung der Spur vom Gelrand abhängig war. Dieser Effekt erschwerte oftmals die Auswertung der Gelläufe, besonders, da die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität der 12S rDNA-PCR-Produkte bei den *Daphnia*-Taxa im Belauer See marginal waren. Weder eine Veränderung der Geldichte, noch der Laufzeit der Gelelektrophorese führten zu einer verbesserten Auftrennung der Produkte.

Ein weiteres Manko der Methode lag in der Markierung selbst. Die radioaktive Markierung mit  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$  oder  $\gamma^{33}\text{P-ATP}$  ist nicht nur kostenintensiv, sondern birgt vor allem auch ein Gesundheitsrisiko und ist daher auch sehr umständlich durchzuführen. Eine alternative Methode bildet die SSCP-Analyse mit unmarkierten PCR-Produkten. Die unmarkierten 12S rDNA-PCR-Produkte wurden nach einer Gelelektrophorese mit einer Silberfärbung nachgewiesen. Die nativen Gele waren an ein Kühlsystem angeschlossen, so daß der Gellauf bei einer niedrigeren Temperatur (10 °C) und kürzerer Laufzeit (2 Stunden) optimiert werden konnte. Nach der Silberfärbung waren deutlich drei Banden zu erkennen (Abbildung 3.3). Es wurden jedoch nur geringe Unterschiede im Laufverhalten der einzelsträngigen PCR-Produkte bei den getesteten *Daphnia*-Taxa beobachtet. Auch bei dieser Analyse kann es zu den o.g. *Smile*-Effekten kommen, die eine Auswertung erschweren. Weiterhin kommt es, trotz qualitativ ausreichender PCR-Produkte, selbst bei den PCR-Produkten von adulten Daphnien, nur zu einer schwachen Anfärbung der Banden. Ohne eine graphische Nachbearbeitung der photographierten, angefärbten PCR-Produkte im Gel (z.B. mit Adobe Photoshop) war eine

Auswertung kaum möglich. Bei den Dauereiern reichte die DNA-Menge nach einer PCR für eine Analyse nicht aus. Daher mußten für die Dauereier die PCR-Produkte aus dem ersten PCR-Lauf in einem zweiten Lauf reamplifiziert werden, um ausreichend DNA für die SSCP-Analyse zu erhalten.

Die Silberfärbung bot zwar eine adäquate Auflösung der Banden, jedoch war vor allem der Nachweis der PCR-Produkte von Dauereiern problematisch. Die Silberfärbung wurde nur bis zum Mai '99 angewendet. Danach stand ein Kapillarelektrophorese-System zur Verfügung, welches zur SSCP-Analyse fluoreszenz-markierter PCR-Produkte genutzt werden konnte.

Die besten Ergebnisse wurden mit dem Kapillarelektrophorese-System erzielt. Die Auftrennung der fluoreszenz-markierten PCR-Produkte in der Kapillare gelang bei hohen Temperaturen (30 –35 °C) am besten. Der Nachweis der PCR-Produkte von adulten und juvenilen Daphnien und sogar von Dauereiern war trotz geringer Mengen von DNA unproblematisch. *D. galeata*, *D. hyalina* und *D. cucullata* (Abbildung 3.1) waren eindeutig anhand der Elektropherogramme voneinander zu unterscheiden. Neben diesen Taxa, konnten weitere *Daphnia*-Arten voneinander unterschieden werden (Tabelle 3.1). Dies zeigt, daß das ausgewählte 12S rDNA-Fragment zur Unterscheidung von *Daphnia*-Arten und maternalen Linien geeignet ist. Probleme traten lediglich bei der Amplifikation der DNA auf. Die Fluoreszenzfarbstoffe, besonders der Farbstoff *ned* (gelb), konnten sich negativ auf den PCR-Lauf auswirken. Trotz bereits etablierter PCR-Bedingungen führten einige Fluoreszenzfarbstoff-Primer-Kombination nicht zu einer erfolgreichen Amplifikation. Teilweise konnte das Problem durch eine Veränderung der PCR-Bedingungen behoben werden.

Die Ergebnisse der drei verschiedenen Methoden der SSCP-Analyse sind nicht direkt miteinander vergleichbar. Die Gelelektrophoresen wurden unter jeweils unterschiedlichen Bedingungen, wie z.B. Temperaturbedingungen, durchgeführt, die die Konformation und somit auch die Migration der PCR-Produkte beeinflussten. Die Fluoreszenzfarbstoff-Markierung der PCR-Produkte wirkte sich teilweise negativ auf die Amplifikation der mtDNA aus. Eine solche Beeinträchtigung der PCR-Ergebnisse konnte bei radioaktiv-markierten oder unmarkierten PCR-Produkten nicht festgestellt werden. Allerdings war die Auftrennung von radioaktiven und unmarkierten PCR-Produkten durch die Gelelektrophorese, die in vertikalen Gelkammern durchgeführt wurde, häufig nicht ausreichend, um *Daphnia*-Taxa oder maternale Linien eindeutig unterscheiden zu können. Von den drei angewendeten Methoden die SSCP-

Analyse durchzuführen, war die Kapillarelektrophorese in der Handhabung am unkompliziertesten und produzierte auch die besten Ergebnisse.

#### *Bewertung der Ergebnisse*

Für *D. hyalina* und *D. galeata* konnten jeweils nur eine maternale Linie im Belauer See bestimmt werden. Die Sequenzierung der 12S rDNA-PCR-Produkte von unterschiedlichen Individuen zeigte, daß eine Punktmutation bei *D. hyalina* durch die SSCP-Analyse nicht dargestellt wurde. Es gelang nicht, die Bedingungen der SSCP-Analyse so zu ändern, daß diese PCR-Produkte voneinander unterschieden werden konnten. Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere maternale Linien existieren. Die Unterschiede können entweder nicht durch eine SSCP-Analyse aufgezeigt werden oder aber außerhalb des analysierten Fragmentes liegen. Die Anzahl der nicht entdeckten Mutationen innerhalb eines analysierten Fragmentes wird allerdings aufgrund einer Bewertung von Hayashi & Yandell (1993) als eher gering eingeschätzt. Für eine Sequenz mit der Länge des 12S rDNA-Fragmentes (280 Basenpaare) gilt, daß in der Regel 80 bis 90 % der Nukleotid-Mutationen durch eine SSCP-Analyse bestimmt werden können.

Für *D. cucullata* wurden nach der SSCP-Analyse zunächst vier maternale Haplotypen unterschieden. Nach der Sequenzierung stellte sich jedoch heraus, daß das unterschiedliche Migrationsverhalten der Haplotypen 230/230 und 227/224 auf identische Sequenzen zurückzuführen ist (Abbildung 3.1). Möglicherweise treten bei den verwendeten Laufbedingungen die PCR-Produkte in zwei unterschiedlichen Konformationszuständen auf, die sich auch auf das Laufverhalten auswirken. Die beiden unterschiedlich wandernden PCR-Produkte wurden als Haplotyp 230/230 zusammengefaßt. Der zweite Haplotyp 205/220 unterscheidet sich zwar lediglich durch eine Punktmutation vom Haplotypen 230/230, kann aber durch die SSCP-Analyse eindeutig von diesem unterschieden werden. Dies zeigt, daß die Bedingungen der SSCP-Analyse grundsätzlich ausreichend sind, um auch Punktmutationen nachzuweisen.

#### **4.1.2 Bestimmung der klonalen Struktur**

Die Existenz von repetitiven Elementen, den Grundeinheiten der Mikrosatelliten, ist seit den 70er Jahren bekannt. Die große Anzahl von repetitiven Sequenzen und die nahezu ubiquitäre Verteilung bei Eukaryonten wurde jedoch erstmalig von Hamada et al. (1982) beschrieben. Aufgrund des ausgeprägten Längenpolymorphismus (Epplen, 1988; Litt & Luty, 1989; Tautz,

1989; Weber & May, 1989) sind Mikrosatelliten besonders als Marker für die genetische Variabilität geeignet. Da die flankierenden Sequenzen häufig konserviert sind, besteht die Möglichkeit denselben Marker bei verwandten Arten anzuwenden (Primmer et al., 1996; Schlötterer et al., 1991). In dieser Arbeit wurden Mikrosatelliten als Marker für die genetische Variabilität einer *Daphnia*-Population im Belauer See genutzt. Bisher sind wenige populationsgenetische Arbeiten bei marinen (z.B. Bagshaw & Buckholt, 1997; Tam & Kornfield, 1996) und limnischen Crustaceen (Gómez & Carvalho, 2000; Lynch et al., 1999; Pálsson, 2000; Reid et al., 2000) bekannt, die auf der Mikrosatelliten-Analyse basieren.

#### *Auswahl der Mikrosatelliten-Loci*

In dieser Arbeit wurden Mikrosatelliten-Primer verwendet, die ursprünglich für die flankierenden Sequenzen von *D. pulex* (Subgenus *Daphnia*) und *D. magna* (Subgenus *Ctenodaphnia*) entwickelt worden waren. Diese wurden für die im Belauer See vorkommenden Taxa der *D. longispina*-Gruppe (Subgenus *Hyalodaphnia*) optimiert. Darüber hinaus wurde versucht heterologe Mikrosatelliten bei verschiedenen *Daphnia*-Arten der drei Subgenera *Daphnia*, *Hyalodaphnia* und *Ctenodaphnia* zu amplifizieren, um genetische Marker zu finden, die universell einsetzbar sind. Bisher konnten vor allem bei aquatischen Organismen heterologe Mikrosatelliten erfolgreich amplifiziert werden (Schildkröten, FitzSimmons et al., 1995; Fische, Rico et al., 1996; Wale, Schlötterer et al., 1991; Zardoya et al., 1996). Brohede & Ellegren (1999) konnten aber auch mit den gleichen Primern Mikrosatelliten bei Rindern und Schafen amplifizieren. Sie postulieren, daß der relativ große Erfolg der *Cross*-Arten-Amplifikation nicht auf die Konservierung der flankierenden Sequenzen zurückzuführen ist, sondern daß diese selektivitäts-neutral sind. Der PCR-Erfolg ist somit wahrscheinlich eine direkte Funktion der durchschnittlichen Rate neutraler molekularer Evolution.

Die *Cross*-Arten-Amplifikation war mit den verwendeten *D. pulex*- und *D. magna*-Primern bei *Daphnia* von geringem Erfolg. Es war nicht möglich PCR-Produkte für alle getesteten *Daphnia*-Arten zu erhalten (Tabelle 3.2). Nur mit zwei *D. pulex*-Primern (Dpu 6; Dpu 122) war es möglich, Sequenzen für alle eingesetzten *Daphnia*-Arten der Subgenera *Daphnia* und *Hyalodaphnia* zu amplifizieren. Von den insgesamt 34 Primern, waren nur 6 *D. pulex*-Primer geeignet, um Mikrosatelliten-Sequenzen von *D. galeata*, *D. hyalina* und *D. cucullata* zu amplifizieren. Von diesen verblieben 4 Loci, die polymorph für die genannten Taxa (Tabelle 3.3) waren und die bei allen *Daphnia*-Typen mit einem Erfolg von 80-96 % amplifiziert



wurden (Abbildung 3.4). Nur 4 Mikrosatelliten-Primer waren daher als Marker geeignet, um die genetische Variation in der *Daphnia*-Population im Belauer See zu untersuchen.

#### *Validität der Mikrosatelliten-Marker für geringe DNA-Mengen*

Die Eignung der Mikrosatelliten-Marker für geringe DNA-Mengen wurde an Müttern und direkt an ihren Subitaneiern getestet. Da erwartet werden kann, daß asexuell produzierte Subitaneier genetisch identisch mit der Mutter sind, sollten aus der Analyse dieser „unabhängigen Proben“ identische Ergebnisse resultieren. Allerdings beobachteten Bacci et al. (1961) und Kaestner (1967) eine Endomeiose während der parthenogenetischen Reproduktion. In diesem Stadium der Zellteilung verbinden sich Bivalente ohne die Anaphase zu durchlaufen. Als Folge können Rekombinationsereignisse für asexuell entstandene Eier und damit eine Produktion von nicht-klonalem Nachwuchs nicht ausgeschlossen werden. Hebert & Ward (1972) demonstrierten jedoch bei Müttern und den aus deren Subitaneiern geschlüpften Daphnien durch die Allozym-Analyse die rein klonale Reproduktion während der Parthenogenese. Im Vergleich zu den Allozymen mit einer geringen Mutationsrate (Voelker et al., 1980), zeigen Mikrosatelliten eine höhere Variabilität und schnellere Evolution (Bruford & Wayne, 1993; Ellegren, 1993; Tautz et al., 1986). Daher sollten Mikrosatelliten-Marker besser als Allozym-Marker geeignet sein, eventuelle Unterschiede zwischen Müttern und Subitaneiern aufzudecken.

Trotz der vergleichsweise höheren Auflösung wurden nach der Mikrosatelliten-Analyse ausschließlich identische Allele bei Müttern und ihren Subitaneiern festgestellt (Abschnitt 3.1.2.2). Auf der einen Seite bestätigt dies die Annahme der klonalen Reproduktion. Die Endomeiose kann zwar nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, sollte sie dennoch stattfinden, dann vermutlich nur als seltenes Ereignis. Andererseits zeigt das identische Bandenmuster bei Müttern und Töchtern darüber hinaus die Validität der genetischen Marker, besonders auch bei so geringen DNA-Mengen, wie sie in den Eiern vorhanden sind.

#### *Linkage-Analyse der Mikrosatelliten-Loci*

Ein wichtiges Kriterium und Voraussetzung für einige populationsgenetische Analysen, wie z.B. die Populationsdifferenzierung mit einem Exakten Test (Abschnitt 2.5.5), ist die unabhängige Vererbung (*linkage equilibrium*) der Allele verschiedener Loci. Für *Daphnia* kann bei der *Linkage*-Analyse eine Kopplung der Loci nicht ausgeschlossen werden, wenn alle analysierten Individuen berücksichtigt werden (Tabelle 3.4). Allerdings reproduzieren sich

Daphnien den größten Teil des Jahres parthenogenetisch. Während dieser Zeit wird die DNA nicht neu rekombiniert, sondern identische Kopien des Genoms werden an die Töchter weitergegeben. Der Anteil eines *D. cucullata*-Klons im Herbst betrug, beispielsweise, über 90 % (Abschnitt 3.1.2.1). Daher wurde für eine weitere Analyse jeweils nur ein Individuum eines Klons berücksichtigt. In Tabelle 3.5 ist zu erkennen, daß lediglich bei den *D. cucullata*-Männchen, von denen sehr wenige gefangen wurden, und die für weitere Analysen keine Bedeutung haben, sowie bei den *D. hyalina*-Weibchen mit Dauereiern und bei ihren Dauereiern eine Abweichung von der unabhängigen Vererbung festgestellt wurde. Eine Kopplung der Mikrosatelliten-Locus-Kombination Dpu 6/45 wurde zwar bei den *D. hyalina*-Dauereiern aber weder bei den *D. hyalina*-Weibchen mit Dauereiern noch bei den *D. hyalina*-Männchen gefunden. Da die Dauereier die rekombinierte DNA der Weibchen und Männchen beinhalten, wurde bei den Dauereiern ebenfalls keine Kopplung dieser Loci erwartet. Bei einer *Linkage*-Analyse der *D. hyalina*-Teilpopulation, die aus den Weibchen mit Dauereiern, ihrer Dauereier und der Männchen besteht, wurde festgestellt, daß die Mikrosatelliten-Loci unabhängig voneinander vererbt werden. Dies und die korrigierte *Linkage*-Analyse nach Bonferroni zeigen, daß die Mikrosatelliten-Loci auch bei den Dauereiern, ebenso wie in der parentalen Generation, unabhängig voneinander sind. Damit wird eine unabhängige Vererbung der Mikrosatelliten-Loci angenommen, was für weitere Analysen eine wichtige Voraussetzung erfüllt.

#### 4.1.3 Einfluß des Probenumfangs auf die Genauigkeit der genetischen Analyse

In dieser Arbeit wurden unterschiedlich große Teilproben analysiert, durchschnittlich 42 Daphnien. Dies bildet ein grundsätzliches Problem bei der Genauigkeit der genetischen Analyse. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Streuung der Werte für die genetische Variation (Heterozygotität, Gendiversität) schon bei der Analyse von nur wenigen Daphnien gering ist (Abbildung 3.5). Dieses wird auch durch einen Vergleich der genetischen Variation von unterschiedlich großen Proben unterstützt (Abbildung 3.8). Im März '99 wurde am ersten Probenahmetag im Vergleich zu den beiden folgenden Probenahmetagen, fast die 6-fache Anzahl *D. cucullata* analysiert. Dennoch sind die Heterozygotität und die Gendiversität an diesen drei Probenahmetagen ähnlich (Abbildung 3.9) und liegen im Rahmen der ermittelten Streuung (Abbildung 3.5). Es kann daher angenommen werden, daß die genetische Variation schon bei einem geringen Probenumfang repräsentativ ist.

#### 4.1.4 Vergleich von Allozym- und Mikrosatelliten-Analyse

Bei der Untersuchung der genetischen Populationsstruktur bei Daphnien, sind Allozym-Analysen weit verbreitet (z.B. Cerný & Hebert, 1999; Gießler, 1997; Hebert & Finston, 1996; Weider et al., 1999). Neuerdings werden aber auch Mikrosatelliten-Analysen aufgrund ihrer vermutlich höheren genetischen Auflösung vermehrt eingesetzt (Ender et al., 1996; Pálsson, 2000; Reid et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Allozym- und die Mikrosatelliten-Analyse miteinander verglichen, um zu ermitteln, inwieweit eine höhere genetische Auflösung durch die Mikrosatelliten-Marker auch bei *Daphnia* erreicht werden kann. Dazu wurden exemplarisch für einen Teil der *D. galeata*-Probe vom März '98 entweder eine Allozym- oder eine Mikrosatelliten-Analyse (Tabelle 3.6) durchgeführt. Insgesamt wurden nach der Mikrosatelliten-Analyse mehr Allele registriert, obwohl die Anzahl der analysierten Daphnien wesentlich geringer war. Für die gesamte analysierte *D. galeata*-Population '98/'99 wurden insgesamt 29 Allele für die vier Mikrosatelliten-Loci festgestellt (Tabelle 3.3). Während angenommen werden kann, daß die Anzahl der Mikrosatelliten-Allele auch für die März-Daphnien mit zunehmender Probenahmegröße noch ansteigt, ist dies aufgrund vorheriger Studien (Gießler, 1997) für Allozym-Allele der März-Daphnien nicht zu erwarten. Die verwendeten Mikrosatelliten-Marker haben demnach gegenüber den Allozym-Markern einen höheren Polymorphismus.

Die Auswirkung der vergleichsweise höheren Auflösung der Mikrosatelliten-Marker zeigt sich auch bei der ermittelten genetischen Variation (Tabelle 3.7). Die Heterozygotität ( $H$ ) und die Gendiversität ( $D$ ) sind deutlich geringer nach der Allozym-Analyse ( $H = 0,31$ ;  $D = 0,30$ ), als nach der Mikrosatelliten-Analyse ( $H = 0,73$ ;  $D = 0,63$ ). Dies gilt auch wenn der fixierte Locus GOT bei den Allozymen unberücksichtigt bleibt. Die Tests auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) zeigen ähnliche Ergebnisse für die Allozym- und Mikrosatelliten-Loci, mit einer leichten Tendenz zum Heterozygoten-Überhang. Die Mikrosatelliten-Analyse ermöglicht es, genetische Strukturen in der Daphnien-Population im Belauer See in einem Maße aufzulösen, wie dies durch eine Allozym-Analyse mit einer ähnlichen Anzahl von Loci nicht möglich wäre. Dies bedeutet jedoch auch, daß die Ergebnisse von Allozym- und Mikrosatelliten-Analyse nicht direkt vergleichbar sind. Trotz dieser Einschränkung in der Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten, kommt der Mikrosatelliten-Analyse eine große Bedeutung zu, nicht zuletzt aufgrund der Möglichkeit aus geringen und teilweise degenerierten Proben noch genetische Information zu erhalten (Abschnitt 4.1.6). Gegenüber der Allozym-Analyse hat die Mikrosatelliten-Analyse den Vorteil, daß die Möglichkeit besteht,

Eier zu analysieren, auch wenn diese noch nicht geschlüpft sind oder nie schlüpfen werden. Zusammen mit der hohen Auflösung bieten diese Möglichkeiten der Mikrosatelliten-Analyse eine wertvolle Methode zur genetischen Analyse.

#### 4.1.5 Hybride im Belauer See

Hybride entstehen bei der Paarung verschiedener Arten, so daß vormals voneinander isolierte Genome zusammen gebracht werden (Darwin, 1859). Durch die Hybridisierung entstehen neue Genotypen. Mit Hilfe sensitiver genetischer Marker konnten Hybrid- und Parentale-Genotypen bei zahlreichen Pflanzen, aber auch bei Tieren, entdeckt und unterschieden werden. Bei den verschiedensten Tiergruppen, wie z.B., Insekten, Fischen, Vögeln und Säugetieren, wurden interspezifische Hybride nachgewiesen (Harrison, 1990). Für Vögel und Insekten ist bekannt, daß diese aus 10 % hybridisierender Arten bestehen (Bullini, 1994; Grant & Grant, 1992). Die Bildung von interspezifischen Hybriden wird bei Pflanzen sogar auf einen Anteil von 50 - 70 % geschätzt (Stace, 1987).

Studien der Demographie, der Lebenszyklus-Parameter (*Life History Characteristics*) und der Verhaltensökologie (Boersma, 1994; Spaak, 1994; Weider, 1993) haben die ökologische Relevanz der interspezifischen Hybridisierung bei *Daphnia* gezeigt. *D. galeata*, *D. hyalina* und *D. cucullata* gehören zum *D. longispina*-Komplex und bilden drei interspezifische Hybride (Süddeutschland: Gießler, 1987; Bohemia: Hebert et al., 1989; Niederlande: Spaak & Hoekstra, 1993; Norddeutschland: Wolf & Mort, 1986). Auch im Belauer See wird das Auftreten von Hybriden erwartet. Wolf & Mort (1986) wiesen 1984 *D. hyalina x galeata* sowie *D. galeata x cucullata* im Belauer See nach. Spaak (1995) fand dort eine Decade später nur noch *D. galeata x cucullata*. Die Hybride von *D. hyalina x D. cucullata* wurden im Belauer See bisher nicht gefunden.

Theoretisch sind für den Nachweis von Hybriden fixierte, d.h. homozygote, Loci erforderlich, die für die einzelnen Taxa charakteristisch sind. Die Mikrosatelliten-Sequenzen der vier untersuchten Loci waren für *D. cucullata* häufig homozygot und zeigten für den Locus Dpu 122 ein Allel, daß nur selten bei den anderen Taxa gefunden wurde. Wenn dieses Allel allerdings bei den anderen beiden Taxa vertreten war, dann nur in Kombination mit den Allelen der übrigen Loci (Dpu 6, 30, 45), die charakteristisch für homozygote *D. cucullata* waren. Daher wird vermutet, daß es sich bei den *D. galeata* und *D. hyalina*, die das bei diesen Taxa selten

vorkommende Allel des Locus Dpu 122 besaßen, um Hybride handelt. Somit ist denkbar, mit den verwendeten Mikrosatelliten-Markern bei maternalen *D. galeata* und *D. hyalina* Hybridisierungen mit *D. cucullata* (*D. galeata x cucullata*, *D. hyalina x cucullata*) nachzuweisen. Dagegen kann bei maternalen *D. cucullata* zwar eine Hybridisierung angenommen werden, aber nicht zwischen Hybridisierungen mit *D. galeata* oder *D. hyalina* unterschieden werden. Auch Hybride zwischen *D. hyalina* und *D. galeata* sind nicht nachweisbar. Der Nachweis von Hybriden mit den verwendeten Mikrosatelliten-Markern ist daher nur unter Vorbehalt durchführbar.

Eine vorsichtige Schätzung nach der Mikrosatelliten-Analyse ergibt, daß in der gesamten Probe der Daphnien im Pelagial 5,1 % der *D. galeata*, 2,2 % der *D. hyalina* und 21,5 % der *D. cucullata* als Hybride identifiziert werden. Ähnliche Werte werden auch für die Dauereier im Sediment erhalten.

Im Gegensatz zu anderen Seen, z.B. Plußsee (Plön, Schleswig Holstein), wo Hybride zeitweise über 90 % der Population darstellen (Denk, 1998), bilden Hybride im Belauer See nur einen relativ geringen Anteil der Population. Wolf & Mort (1986) stellten 1984 einen Anteil der Hybride von etwa 20 % fest, während Spaak (1995) 1994 hingegen nur einen Anteil von weniger als 5 % ermittelte und keine *D. galeata x D. hyalina* finden konnte. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, daß die sexuellen Phasen von *D. galeata* im Sommer '99 (Mai) und von *D. hyalina* im Herbst '99 (Oktober - Dezember) zeitlich getrennt stattfanden. Die Verschiebung der sexuellen Phasen schränkt vermutlich die Möglichkeiten einer Hybridisierung zwischen den beiden Taxa ein.

Eine erfolgreiche sexuelle Reproduktion der Hybride (Rückkreuzung) beim *D. longispina*-Komplexes wurde bisher selten gefunden (Hebert et al., 1989; Taylor & Hebert, 1992; Wolf & Mort, 1986). Daher ist zwar die Entstehung von Hybriden während der Phase der sexuellen Reproduktion zu erwarten, ihr Einfluß auf die Populationsstruktur der sich sexuell rekombinierenden Daphnien wird aber als eher gering bewertet. Interspezifische Hybridisierung kann bei Arten, die einen geringen Polymorphismus zeigen zu einer deutlichen Veränderung in den Allelfrequenzen führen und die genetische Variation stark beeinflussen. Dies wird bei *D. cucullata* deutlich. Im Sommer des Jahres 1999 wurde ein starker Anstieg der genetischen Variation bei *D. cucullata* beobachtet (Abbildung 3.9). Der Kurvenverlauf von März bis August '99 ist vor allem durch das Auftreten von heterozygoten *D. cucullata* geprägt, bei

denen es sich möglicherweise um Hybride handelt. Während dieser Zeit wurden 88 % aller *D. cucullata*-„Hybride“ im Jahre 1999 gefangen. Der Verlauf der genetischen Variation läßt sich daher vermutlich teilweise auf das Schlüpfen und die anschließende Selektion von Hybriden aus dem Sediment zurückführen. Die genetische Variation bei *D. galeata* und *D. hyalina* dagegen ist vergleichsweise hoch (Abbildung 3.7), so daß ein starker Einfluß durch Hybride unwahrscheinlich ist.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatelliten-Markern war nur eine grobe Einschätzung der Anteile an Hybriden möglich. Der Anteil der Hybride im Belauer See wird danach als gering erachtet. Grundsätzliche Aussagen dieser Arbeit verändern sich dadurch nicht. Die Entwicklung weiterer Mikrosatelliten-Marker, mit denen Hybride eindeutig identifiziert werden können, wäre sicherlich lohnenswert, auch im Hinblick auf die Dynamik der interspezifischen Hybridisierung insbesondere bei den Dauereiern.

#### 4.1.6 Bestimmung der klonalen Struktur bei älteren Dauereiern

Das DNA-Molekül dient der dauerhaften Speicherung von genetischer Information. Als solche ist die DNA relativ stabil und unempfindlich. Während die paläobiologischen Untersuchungen von Tieren und Pflanzen anhand konservierter Skelette und Pollen (Hagelberg et al., 1991; Hofmann, 1999; Wiethold, 1996) verbreitet sind, besteht bei der Analyse der DNA das Problem, daß das Molekül zerfällt oder durch äußere Einflüsse verändert wird. Ältere DNA kann, z.B., durch endogene hydrolytische Prozesse, Strahlung und Oxidation, die u.a. zu kovalenten Bindungen zwischen den Basen der komplementären DNA-Stränge (intermolekulare *Crosslinks*) führen kann, modifiziert werden (Pääbo, 1989). Dabei wurde keine Korrelation zwischen der Anzahl der auftretenden Schäden und dem Alter der DNA festgestellt. Vielmehr scheinen DNA-Schädigungen von der Art der Konservierung des Organismus abhängig zu sein. Das Sediment eines Sees bietet ausgezeichnete Bedingungen für die Konservierung von DNA. Im anaeroben Sediment ist die DNA weitestgehend vor oxidativen Modifikationen und auch vor Strahlung geschützt. Die Temperatur im Sediment wirkt sich ebenfalls positiv auf die Konservierung aus (Höss, 2000). Bei *Daphnia* werden die Dauereier und somit auch die DNA zusätzlich durch das Ephippium vor äußeren Einflüssen geschützt (Zaffagnini, 1987). Ephippien, die einige hundert Jahre alt sind, können äußerlich nicht von denen unterschieden werden, die mehrere tausend Jahre alt sind (Abbildung 3.28). Obwohl die Dauereier ausgetrocknet und nicht mehr schlüpfähig sind, erscheinen sie ansonsten unversehrt. Unter diesen

Voraussetzungen kann erwartet werden, daß DNA aus den Dauereiern im Sediment isoliert werden kann, um paläolimnologische Studien durchzuführen.

Die Amplifikation und die anschließende Analyse der DNA aus älteren Dauereiern, wird vermutlich durch die Fragmentierung und die chemische Veränderung der DNA-Moleküle behindert. Daher können in der Regel nur kürzere Fragmente (ca. 250 Bp) erfolgreich amplifiziert werden (z.B. Höss, 1995; Pääbo et al., 1989; Poinar et al., 1996). Obwohl die verwendeten Mikrosatelliten-Marker diese Bedingung erfüllten (< 160 Bp), gelang die erfolgreiche Amplifikation älterer Dauerei-DNA bisher nur bei wenigen Individuen. Es wurde versucht falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, indem für jeden Mikrosatelliten-Locus zwei getrennte PCRs angesetzt wurden. Nur bei Übereinstimmung beider PCR-Ergebnisse wurde das Ergebnis anerkannt. Die geringe DNA-Menge, die in den Dauereiern enthalten ist (250 Zellen, Vollmer, 1912), in Kombination mit den nicht idealen *D. pulex*-Primer-Paaren, die schon zu einer verminderten Amplifikation bei rezenten Dauereiern geführt haben, erschweren zusätzlich die genetische Analyse. Die vermutete Fragmentierung der DNA in den Dauereiern könnte auch die Ursache dafür gewesen sein, daß es nicht gelang mitochondrielle 12S rDNA-Fragmente (280 Bp) für eine SSCP-Analyse zu amplifizieren. Für zukünftige genetische Analysen älterer Dauereier ist daher die Entwicklung von Mikrosatelliten-Primern mit einer größeren Spezifität für die *D. longispina*-Gruppe sinnvoll. Für die SSCP-Analyse älterer Dauereier scheint es notwendig, ein anderes System zu etablieren. Dabei ist vorstellbar, entweder neue Primer zu entwickeln und kürzere, diagnostische Fragmente zu amplifizieren oder überlappende Primer-Paare zu verwenden. Die längeren Fragmente könnten dann aus kürzeren Teil-Fragmenten abgeleitet werden.

#### **4.2 Populationsstruktur der Daphnien im Belauer See**

In den folgenden Abschnitten wird die Populationsstruktur der Daphnien im Belauer See untersucht. Die Bedeutung der Dauereier für die Population im Pelagial wird anhand der Bildung der Dauereier in der Population und der Rückkehr der aus Dauereiern geschlüpften Daphnien ins Pelagial diskutiert. Die Rolle der treibenden Dauereier wird dabei ebenfalls untersucht. Die Auswirkungen der sexuellen Reproduktion auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) und die Bedeutung der maternalen Linien für die genetische Struktur von *D. cucullata* werden behandelt. Der letzte Abschnitt befaßt sich mit den Dauereiern im Sediment als paläolimnologische Datenbank.

#### 4.2.1 Bedeutung der Dauereier im Sediment

Der Lebenszyklus von *Daphnia* ist den größten Teil des Jahres durch die Parthenogenese sowie während weniger Wochen oder Monate durch eine Kombination von Parthenogenese und sexueller Reproduktion gekennzeichnet. Als Produkt der sexuellen Reproduktion häufen sich die Dauereier im Sediment an und es entsteht, analog zu der Samenbank bei Pflanzen, ein Dauerei-Reservoir oder eine Dauereibank. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Bedeutung der Dauereier im Sediment für den Belauer See anhand zweier Hypothesen diskutiert werden. Die erste Hypothese besteht in der Annahme, daß die Dauereier im Sediment ein Spiegel vergangener Populationen sind. Unter dieser Annahme ist es möglich, die Geschichte und Struktur vergangener Daphnien-Populationen abzuleiten (Frey, 1958; Kerfoot, 1974). Dazu wird vorausgesetzt, daß alle Klone der Population Dauereier produzieren und nicht nur bestimmte Klone, und daß die Dauereier nach der Häutung ins Sediment absinken und nicht an die Wasseroberfläche treiben. Zudem muß der größte Teil der Dauereier im Sediment verbleiben und ein eventuelles Schlüpfen unabhängig vom Genotyp erfolgen (unselektives Schlüpfen). In der zweiten Hypothese wird postuliert, daß Dauereier im Sediment, ebenso wie Samenbanken, als aktive Elemente betrachtet werden können, die die Evolution verlangsamen können (Brown & Venable, 1986; Hairston & De Stasio, 1988). Die Dauereier entziehen sich dem Einfluß mikroevolutionärer Prozesse. Bedingung für eine Verlangsamung der Evolution ist, daß die Dauereier eines Jahres über mehrere Jahre hinweg schlüpfen. Je mehr Dauereier aus dem Sediment schlüpfen, desto weniger Dauereier verbleiben im Sediment und können als Spiegel vergangener Populationen dienen. Je vollständiger dagegen die Dauereier im Sediment die produzierten Dauereier darstellen, desto geringer wird der Einfluß der Dauereier auf die Evolutionsrate sein. Diese widersprüchlichen Hypothesen werden daher anhand verschiedener Prozesse untersucht. Im Folgenden werden im Hinblick auf die jeweilige Hypothese die Bildung der Dauereier in der Daphnien-Population, die Bedeutung der treibenden Dauereier für die Dauereibank, Schlüpfefolge und Abundanzen der Dauereier sowie selektives Schlüpfen untersucht.



#### 4.2.1.1 Bildung der Dauereier in der Daphnien-Population

Während der Phase der sexuellen Reproduktion einer Daphnien-Population produziert nur ein geringer Anteil der Daphnien Dauereier, während die meisten Daphnien Subitaneier produzieren (Spaak, 1995). Dabei stellt sich die Frage, ob es sich bei den relativ wenigen dauereierproduzierenden Weibchen um Klone handelt, die sich genetisch von den Weibchen, die Subitaneier produzieren, unterscheiden.

Hinweise auf genetische Unterschiede sind bei *D. galeata* vom Mai '99 anhand der Frequenzen der häufigsten Klone bei Weibchen mit Dauereiern und Weibchen mit Subitaneiern zu erkennen (Tabelle 3.12). Die ehippien-tragenden Weibchen wurden zu über 70 % einem Klon zugeordnet. Dagegen wurde dieser Klon nicht bei den Weibchen mit Subitaneiern gefunden. Aufgrund des geringen Probenumfangs besteht zwar die Möglichkeit, daß zu wenige Weibchen mit Subitaneiern gefangen wurden, um diesen Klon nachzuweisen, dennoch ist es unwahrscheinlich, daß dieser mit ähnlichen Frequenzen auftritt. Die genetische Verschiedenheit von Weibchen mit Subitaneiern und Weibchen mit Dauereiern zeigte sich auch nach einem Test zur Populationsdifferenzierung (Tabelle 3.13). Demzufolge sind die beiden *Daphnia*-Typen signifikant voneinander differenziert. Die Differenzierung hängt auch damit zusammen, daß sich die Weibchen mit Dauereiern im Vergleich zu den Weibchen mit Subitaneiern aus relativ wenigen Klonen zusammensetzten.

Auch bei *D. hyalina* sind deutliche Anhaltspunkte dafür vorhanden, daß die Population während der Phase der sexuellen Reproduktion im Herbst '99 (Oktober - Dezember) genetisch untergliedert werden kann. Die Phase der sexuellen Reproduktion dauerte bei *D. hyalina* wesentlich länger an als bei *D. galeata*. Dies ermöglichte, den Verlauf der genetischen Strukturierung in der Population zu untersuchen. Genetische Unterschiede zeichnen sich zwischen den *D. hyalina*-Typen bereits bei den Parametern Gendiversität und Heterozygotität ab (Abbildung 3.17). Die Heterozygotität der Weibchen mit Subitaneiern ist deutlich höher als die der Weibchen mit Dauereiern oder der Männchen. Aber auch klonale Unterschiede sind zu erkennen. Die Weibchen mit Subitaneiern konnten während des Herbstes zunehmend einem Klon (Klon 6) zugeordnet werden (Tabelle 3.16). Dieser Klon war zu Beginn der sexuellen Reproduktion kaum (4 %) nachweisbar, im Dezember jedoch bei 50 - 70 % der gefangenen Weibchen mit Subitaneiern vertreten. Dagegen wurde Klon 6 zu keinem Zeitpunkt im Herbst bei den Weibchen mit Dauereiern oder den Männchen gefunden (Tabelle 3.15). Unabhängig davon war Klon 6 ebenfalls nicht bei den *D. hyalina*-Dauereiern im Sedi-

ment, die während der letzten 7 Jahre produziert worden waren, vertreten. Daher wird angenommen, daß Klon 6 keine Dauereier produziert und frei-schwimmend im Belauer See persistiert. Obwohl Klon 6 sehr häufig in der Wassersäule auftritt, ist dies nicht anhand der klonalen Zusammensetzung im Sediment zu erkennen.

Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf die genetische Untergliederung ist durch den Verlauf der genetischen Variation in der *D. hyalina*-Population im Herbst dargestellt. Anhand der Prinzipialen-Komponenten-Analyse (PCA) ist eine Entwicklung der Strukturierung im Herbst erkennbar (Abbildung 3.18). Die Weibchen mit Dauereiern, ihre Dauereier und die Männchen der sechs Probenahmetage liegen um den Nullpunkt. Demzufolge ist keine genetische Differenzierung innerhalb der Gruppe der Weibchen mit Dauereiern und prinzipiell auch nicht innerhalb der Gruppe der Männchen im Verlauf des Herbstes erkennbar (Tabelle 3.18). Lediglich die Männchen eines Probenahmetages unterscheiden sich von denen der übrigen Probenahmetage. Im Gegensatz dazu steht die zunehmende Entfernung der Weibchen mit Subitaneiern von der Gruppe der Weibchen mit Dauereiern, den Dauereiern und den Männchen. Die zunehmende Entfernung der Weibchen mit Subitaneier vom Nullpunkt hat auch eine genetische Differenzierung zur Folge (Tabelle 3.18). Diese zunehmende Entfernung kann mit der Entwicklung der Frequenzen der häufigsten Klone im Herbst erklärt werden. Von den fünf häufigsten Klonen, die zu Beginn der sexuellen Reproduktion bei den Weibchen mit Subitaneiern, den Weibchen mit Dauereiern und den Männchen gemeinsam auftraten, wurde spätestens nach der 3. Probenahme kein Klon mehr bei den Weibchen mit Subitaneiern gefunden (Tabelle 3.16). Im Gegensatz dazu waren die fünf Klone durchgehend bei den Weibchen mit Dauereiern und den Männchen im Herbst vertreten. Ebenfalls angetroffen wurden diese fünf Klone bei den bis zu 7 Jahre alten Dauereiern im Sediment. Daher kann angenommen werden, daß diese fünf Klone mit großer Wahrscheinlichkeit bevorzugt Dauereier produzieren. Die klonalen Unterschiede tragen auch zu einer genetischen Differenzierung zwischen den Weibchen mit Subitaneiern und den Weibchen mit Dauereiern bzw. den Männchen bei (Tabelle 3.17). Eine solche Differenzierung wurde für keinen der sechs Probenahmetage zwischen den Weibchen mit Dauereiern, ihren Dauereiern und den Männchen ermittelt. Dies bedeutet, daß angenommen werden kann, daß die gleichen Klone sowohl Männchen wie auch Weibchen mit Dauereiern produzieren.

Die Annahme, daß während der Phase der sexuellen Reproduktion in der *D. hyalina*-Population genetisch zwei Gruppen unterschieden werden können, wird auch durch die UPGMA unterstützt (Abbildung 3.19). Dabei ist die Anwendung einer UPGMA, die auf den Ergebnissen der Mikrosatelliten-Analyse basiert, zunächst kritisch zu betrachten. Die Verzweigungen des Baumes basieren auf rekombinierter-DNA und nicht, wie z.B., bei mtDNA, auf Mutationen. Die genetische Geschichte einer Population anhand der Mikrosatelliten-DNA wäre vermutlich treffender mit einem komplexen Netzwerk widerzugeben als mit einem genetischen Baum (z.B. Hey, 2000; Smith, 1998). Dennoch erscheint die UPGMA als Darstellungsform anwendbar, da diese, wenn auch mit geringen Bootstrap-Werten, die Ergebnisse der PCA verdeutlicht. Die Strukturierung in der Population zeigt sich auch anhand der UPGMA. Es ist die Bildung zweier Gruppen erkennbar, wobei eine Gruppe lediglich aus den *D. hyalina*-Weibchen mit Subitaneiern sowie den Weibchen ohne Eier besteht, die gegen Ende des Herbstes gefangen wurden.

Die Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse zeigen eine zunehmende genetische Strukturierung der *D. hyalina*-Population, die sich im Verlauf des Herbstes in eine parthenogenetisch- und in eine vorwiegend sexuell-reproduzierende Fraktion aufteilt. Da nur verhältnismäßig wenige Daphnien an der Produktion von Dauereiern beteiligt sind (Spaak, 1995) und diese genetisch auch von den Weibchen unterschieden werden können, die sich parthenogenetisch fortpflanzen, können die Dauereier im Sediment nicht als Spiegel vergangener Populationen betrachtet werden. Dies wird auch dadurch unterstützt, daß manche dominante Klone im Pelagial, aber nicht im Sediment, auftraten. Zudem trägt die sexuelle Reproduktion zum Entstehen neuer Klone im Sediment bei. Das führt teilweise dazu, daß zwar die genetische Diversität, nicht aber auch die Heterozygotität, der parentalen Generation widergespiegelt wird (Abschnitt 4.2.3).

#### **4.2.1.2 Bedeutung der maternalen Linien für die Populationsstruktur von *D. cucullata***

Für *D. cucullata* wurden drei maternale Linien bestimmt, die während der Probenahmen zu unterschiedlichen Anteilen aufgesammelt wurden. Es kann vermutet werden, daß die maternale Linie 205/220 durch eine Punktmutation aus der maternalen Linie 230/230 hervorgegangen ist oder umgekehrt. Die maternale Linie 204/211 kann von den anderen beiden Linien durch eine Vielzahl an Nukleotid-Substitutionen unterschieden werden (s. Anhang). Vermutlich ist diese Linie erst vor relativ kurzer Zeit in den Belauer See gelangt, da sie bei Probe-

nahmen relativ selten gefangen wurde (Abbildung 3.8) und keine Dauereier im Sediment (0 - 7 Jahre) auftraten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß diese maternale Linie schon länger im Belauer See vorkommt, ohne daß die Weibchen Dauereier produziert haben. Dies würde wiederum ein Hinweis sein, daß das Sediment nicht als Spiegel vergangener Populationen gelten kann. Wenn nicht alle maternalen Linien an der Bildung von Dauereiern beteiligt sind, dann entziehen sich solche maternalen Linien dem Dauerei-Reservoir. Somit würde das Sediment keinen Rückblick auf vergangene Populationen bieten.

#### 4.2.1.3 Bedeutung von treibenden Dauereiern für die Dauereibank

Die Voraussetzung für die Ansammlung der Dauereier im Sediment ist das Absinken der Ehippien. Es gibt jedoch Beobachtungen, die zeigen, daß nicht alle Ehippien diesen Erwartungen entsprechen. Dauereier werden mit der Häutung der Daphnie, geschützt im Ehippium, abgestoßen. Das Ehippium kann dann entweder ins Sediment absinken oder an die Wasseroberfläche treiben. Ein Versuch zeigte, daß nur 5 % der Ehippien an die Wasseroberfläche trieben, während 95 % absanken (Abschnitt 3.3.1.1). Durch die treibenden Dauereier wird dem Dauerei-Reservoir im Sediment somit lediglich ein geringer Anteil entzogen.

Solange die Fraktionen der treibenden und der abgesunkenen Dauereier genetisch ähnlich sind, beeinträchtigen die treibenden Dauereier nicht die Funktion des Sediments als Abbild der produzierten Dauerei-Klone. Der Vergleich der häufigsten Klonfrequenzen bei den abgesunkenen und den treibenden Dauereiern zeigt jedoch, daß von den 8 Klonen nur 4 bei den abgesunkenen und den treibenden Dauereiern gemeinsam auftraten (Tabelle 3.12). Möglicherweise reicht die Auflösung der Mikrosatelliten-Marker nicht aus, um diese Klone noch weiter zu differenzieren. Drei Klone (Klon 4, 5, 6) die nur bei den treibenden Dauereiern gefunden wurden, konnten nicht bei den bis zu 7 Jahre alten Dauereiern im Sediment nachgewiesen werden. Die treibenden Dauereier sind von der Gruppe der ehippien-tragenden Weibchen genetisch differenziert (Tabelle 3.13). Denkbar erscheint daher auch, daß nur eine bestimmte Teilgruppe der Weibchen Dauereier produzierte, die an die Wasseroberfläche trieben. Bislang wurden im Belauer See nur treibende *D. galeata*-Ehippien im Spülsaum gefunden, so daß neben klonalen auch artspezifische Unterschiede in der Produktion von treibenden und absinkenden Dauereiern auftreten können. Einerseits zeigen die Versuche, daß nur von einem geringen Anteil der Dauereier erwartet werden kann, daß diese an die Wasseroberfläche treiben. Andererseits ist die klonale Zusammensetzung der treibenden Dauereier unter-

schiedlich von den Dauereiern im Sediment. Daher bildet das Sediment nicht die gesamte Vielfalt der im Belauer See produzierten Dauereier ab.

Die Schlüpfaktivität der treibenden Dauereier wird zwar nicht durch Sediment gehemmt, dafür sind die Ehippien aber harschen Bedingungen, wie z.B., Frost, Trockenheit oder UV-Strahlung, ausgesetzt. *D. galeata*-Dauereier, von denen angenommen werden konnte, daß diese im Mai '99 produziert wurden, wurden im März '00 aus dem Spülsaum aufgesammelt. Die Ehippien waren äußerlich gealtert und teilweise auch beschädigt. Außerdem wurde nur eine geringe Anzahl aufgefunden. Dennoch zeugten Schlüpfversuche von der Widerstandsfähigkeit der Ehippien. Versuche ohne Sediment-Überschichtung führten bei den treibenden Dauereiern aus dem Spülsaum zu einem durchschnittlichen Schlüpfertag von ca. 13 % (Abbildung 3.24). Für Dauereier als Verbreitungseinheiten ist das erfolgreiche Schlüpfen Voraussetzung für die Besiedelung neuer Habitate. Gegenüber den Dauereiern im Sediment des Belauer Sees haben treibende Dauereier vermutlich eine größere Aussicht sich zu entwickeln. Zugleich schränkt die Wahrscheinlichkeit, daß treibende Dauereier durch passiven Transport verbreitet werden und neue Habitate erschließen auch den Einfluß auf bestehende Populationen im Belauer See ein.

#### 4.2.1.4 Schlüpfertag und Abundanzen

##### *Schlüpfertag*

Die Unterbrechung der Diapause bei *Daphnia*-Dauereiern führt in der Regel zum Schlüpfen der Daphnien. Durch eine Kombination aus verschiedenen Reizen, z.B. aus Licht, Temperatur und Sauerstoff (Gilbert, 1974; Schwartz & Hebert, 1987; Stross, 1966) kann die Entwicklung der Dauereier induziert werden. Der Schlüpfertag und die Abundanzen der Dauereier im Sediment sind wichtige Kriterien, um die Bedeutung der Dauereier für den Belauer See zu ermitteln.

Die Schlüpfversuche wurden unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt, die bei Weider et al. (1997) bis zu 100 % Schlüpfertag führten. Der Schlüpfertag der Dauereier aus der oberen Sedimentschicht des Belauer Sees betrug durchschnittlich ca. 18 % bzw. 25 % (Abbildung 3.22; Abbildung 3.23). Der Anteil der Dauereier, aus denen während des Versuchs Daphnien schlüpften, nahm mit zunehmender Tiefe bis auf durchschnittlich 12 % ab. Auch der Zeitpunkt des Schlüpfens verzögerte sich tiefenabhängig. Nach mehr als 38 Tagen schlüpften fast

keine Daphnien mehr, unabhängig davon aus welcher Sedimenttiefe die Dauereier stammten. Diese Ergebnisse zeigen, daß es sich bei den Dauereiern in den Sedimentabschnitten II bis IV nicht um schlüpfunfähige Dauereier handelt. Möglicherweise waren diese Dauereier im Sediment ungünstig positioniert, so daß kein Reiz durchdrang, der die Diapause unterbrechen konnte.

Im Belauer See werden die Dauereier, die absinken, innerhalb eines Jahres mit ca. 2 cm Sediment überschichtet. Bei entsprechenden Schlüpfversuchen mit Sediment-Überschichtung reduzierte sich der Anteil der Dauereier aus denen Daphnien schlüpften von durchschnittlich 25 % im Kontrollansatz auf 1,6 % (Abbildung 3.23). Die natürlichen Bedingungen im See, die sich, z.B., in der Temperatur, der Photoperiode, den Lichtbedingungen und dem Wasserdruck unterscheiden, wurden nicht in den Schlüpfversuchen simuliert, da eine Reproduktion der natürlichen Gegebenheiten unter Labor-Bedingungen kaum möglich ist. Es war nicht Ziel des Versuchs, den Schlüpfertfolg der Dauereier unter natürlichen Bedingungen zu ermitteln, sondern vielmehr den Einfluß des Sediments auf den Schlüpfertfolg zu ermesen. Dazu wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie für die Schlüpfversuche ohne Sediment-Überschichtung gewählt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Trotz der artifiziellen Versuchsbedingungen liegt der ermittelte Schlüpfertfolg in einer vergleichbaren Größenordnung wie ihn Cáceres (1998) mit weniger als 1 % bei Freilanduntersuchungen für den Oneida Lake (New York State, USA) feststellte. Um sicherzustellen, daß es sich bei den Dauereiern, die mit Sediment-Überschichtung zum Schlüpfen exponiert wurden, nicht um schlüpfunfähige Dauereier handelte, wurden diese erneut zum Schlüpfen ohne Sediment-Überschichtung exponiert. Der Schlüpfertfolg war deutlich höher (4,6 %) als mit Sediment-Überschichtung. Dies zeigt, daß der geringe Schlüpfertfolg auf die Sediment-Überschichtung und nicht nur auf die Schlüpfunfähigkeit der Dauereier zurückzuführen ist. Der Schlüpfertfolg der Dauereier bei der Re-Exposition ohne Sediment muß um so höher eingestuft werden, da etliche Dauereier nach einer Versuchszeit von 60 Tagen mit Sediment-Überschichtung und der Exposition bei relativ hoher Temperatur (12 °C) von Mikroorganismen befallen waren. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, daß der Schlüpfertfolg im Vergleich zum Kontrollansatz relativ gering ausfiel.

Die Schlüpfversuche lassen erwarten, daß der weitaus größte Teil der Dauereier nicht ins Pelagial zurückkehrt, sondern im Sediment verbleiben wird. Somit kann das Sediment als Spiegel der produzierten Dauereier gelten. Das Sediment wirkt als nahezu unüberwindliche Barriere für die Dauereier. Im Hinblick auf die Hypothese, daß Dauereier im Sediment die

Evolutionsrate reduzieren können, postulierten Hairston & De Stasio (1988) ebenfalls einen geringen Schlüpferfolg für *Diaptomus sanguineus*-Dauereier in zwei Teichen. Sie konnten aber auch zeigen, daß eine geringe Sedimentationsrate in den Teichen ermöglichte, daß bis zu 5 Jahre alte Dauereier gleichzeitig schlüpften. Die aus mehreren Jahren geschlüpften Nauplien unterschieden sich dadurch, daß sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten Dauereier produzierten. Die aus unterschiedlichen Jahren geschlüpften Dauereier beeinflussten somit die Populationsstruktur. Diese Voraussetzungen sind für den Belauer See nicht gegeben. Eine Schlüpfaktivität ist hauptsächlich von den Dauereiern der oberen 2 cm zu erwarten (Herzig, 1985). Dies entspricht im Belauer See den zuletzt produzierten Dauereiern. Da das Sediment des Belauer Sees stratifiziert ist und keinerlei Anzeichen von Bioturbation zeigt, ist es unwahrscheinlich, daß die Dauereier in den tieferen Sedimentabschnitten unter den natürlichen Bedingungen im Belauer See schlüpfen. Die Zusammensetzung der Dauereier im Sediment unterscheidet sich zudem jährlich (Abbildung 3.21), so daß auch nicht von einer stabilisierenden Wirkung der Dauereier auf die Genotyp-Verteilung der aktiven Population ausgegangen werden kann. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die Evolutionsrate im Belauer See durch den Einfluß der Dauereier verlangsamt wird.

#### *Abundanzen*

Eine Abschätzung der Dauerei-Abundanzen im Sediment ist essentiell, um die Bedeutung des Dauerei-Reservoirs für den Belauer See zu ermessen. Dabei nimmt nicht zwangsläufig mit zunehmender Tiefe, d.h. zunehmendem Alter der Dauereier, auch die Abundanz ab. Dies läßt sich besonders bei den älteren Sedimentschichten nachvollziehen (Abbildung 3.29). In den vier obersten Sedimentabschnitten wurden Abundanzen von 1 - 2 Dauereiern pro Jahr und  $\text{cm}^2$  festgestellt (Abbildung 3.20). Im Vergleich ist die Anzahl der Dauereier größer als z.B. mit  $< 1$  für den Onondaga Lake (Cáceres, 1998) festgestellt, aber geringer als  $> 10$  im Bodensee (Weider et al., 1997). Unter der idealisierten Annahme einer homogenen Verteilung der Dauereier über das gesamte Sediment des Sees, bedeutet dies für den Belauer See mit einer Wasseroberfläche von  $1,1 \text{ km}^2$ , eine Produktion von über 23 Milliarden Dauereiern pro Jahr. Bei einem angenommenen Schlüpferfolg von maximal 1 - 2 % entspricht dies ca. 200 - 400 Millionen Daphnien, die jedes Jahr aus dem Sediment schlüpfen. Bei der Berechnung muß jedoch bemerkt werden, daß bisher in Sedimentproben aus der Uferregionen keine Dauereier gefunden wurden und sich die Anzahl der geschlüpften Daphnien daher weiter verringern könnte. Der Einfluß der Dauereier auf die Daphnien-Population wird neben der Schlüpftrate auch noch von anderen Faktoren gesteuert. Einerseits zeigten Hanazato & Yasuno (1989)

experimentell, daß Daphnien, die in geringer Anzahl als Individuen im Pelagial überwintert hatten, gegenüber den Daphnien überlegen waren, die aus Dauereiern schlüpften. Die Daphnien, die überwintert hatten, hatten einen größeren Einfluß auf die Populationsstruktur. Andererseits sind die Dauereier aber den Subitaneiern qualitativ überlegen. Dies äußerte sich in einem rascheren Wachstum, einer schnelleren Entwicklung und einer höheren Fruchtbarkeit der Daphnien, die aus Dauereiern geschlüpft waren (Arbaciauskas & Gasiunaite, 1996).

Während die Rate der Evolution wahrscheinlich nicht durch die Dauereibank beeinflusst wird, da nicht anzunehmen ist, daß Dauereier über mehrere Jahre hinweg schlüpfen, können rezente Dauereier aufgrund der Abundanzen für die Populationsstruktur der Daphnien im Pelagial von Bedeutung sein (Abschnitt 4.2.2).

#### 4.2.1.5 Selektion beim Schlüpfen

Da nicht alle Dauereier schlüpfen, stellt sich die Frage, ob die Daphnien in dem Verhältnis schlüpfen, indem sie auch im Sediment vorkommen. Dies gilt sowohl für die taxonomische als auch für die klonale Zusammensetzung der geschlüpften Daphnien. Falls die genetische Zusammensetzung von den Dauereiern im Sediment und den geschlüpften Daphnien verschieden ist, kann dies als Hinweis auf einen unterschiedlichen Schlüpfertag bei verschiedenen *Daphnia*-Taxa bzw. -Klonen im Belauer See gewertet werden. Durch den Einsatz von Mikrosatelliten-Markern war es möglich diese Fragestellung zu untersuchen, da die genetische Zusammensetzung der Dauereibank mit dieser Methode ermittelt werden konnte.

Der überwiegende Anteil der Dauereier im Sediment wird dem Taxon *D. galeata* zugeordnet, *D. hyalina* und *D. cucullata* kommen in geringeren Anteilen vor (Abbildung 3.25; Tabelle 3.19). *D. galeata* weist zunächst hohe Schlüpfertage (24 %) auf, die jedoch mit zunehmender Sedimenttiefe abnehmen. *D. cucullata* zeigt allgemein niedrige Schlüpfertage, während *D. hyalina* in den oberen drei Sedimentabschnitten einen gleichbleibend hohen Schlüpfertag zeigt (24 - 27 %). Im letzten Sedimentabschnitt sind die Schlüpfertage sehr niedrig. Es wird deutlich, daß sowohl die einzelnen Taxa als auch die Dauereier aus den verschiedenen Schichten unterschiedlichen Schlüpfertage zeigen.

Auch der Vergleich der genetischen Variation (Heterozygotizität; Gendiversität) weist auf Unterschiede zwischen den geschlüpften Daphnien und den Dauereiern im Sediment hin



(Abbildung 3.26). Tendenziell zeigen die geschlüpften Daphnien eine höhere Heterozygotität als die Dauereier im Sediment. Ebenso sind teilweise Unterschiede bei der Gendiversität zu beobachten. Während der Anstieg der Heterozygotität ähnlich dem Heterozygoten-Überschuß in der Population verläuft und vielleicht auf eine Überdominanz von Heterozygoten zurückzuführen ist, führt eine Abnahme der Gendiversität teilweise zum Verlust von genetischer Information. Jegliche Unterschiede in Heterozygotität oder Gendiversität entstehen zwangsläufig durch selektives Schlüpfen.

Der Vergleich der klonalen Zusammensetzung bei geschlüpften Daphnien und Dauereiern aus dem Sediment deckt ebenfalls genetische Unterschiede auf. Eine Analyse zur Populationsdifferenzierung zwischen allen geschlüpften Daphnien und Dauereiern aus dem Sediment weist auf deutlich unterschiedliche Allelfrequenzen bei *D. galeata* und *D. hyalina* hin (Tabelle 3.20). Je geringer die Klonfrequenz ist, um so größer ist der Einfluß des Zufalls beim Schlüpfen eines bestimmten Klons. Im Gegensatz dazu spielt bei Klonen, die mit größeren Frequenzen vorkommen, der Zufall eine zunehmend geringere Rolle. Schon bei der Betrachtung der häufigsten Klone fällt auf, daß die Zusammensetzung der Dauereier in den verschiedenen Sedimentabschnitten unterschiedlich ist (Abbildung 3.27). Weiterhin sind schon zwischen den häufigsten Klonen der geschlüpften Daphnien und den Dauereiern im Sediment Unterschiede zu erkennen. Diese wurden auch durch eine Analyse zur Populationsdifferenzierung bestätigt (Tabelle 3.20). Die Unterschiede sind darauf zurückzuführen, daß einige Klone erfolgreicher schlüpfen als andere (z.B. *D. galeata*-Klone 2 & 6). Daher kann auch nicht aus der Zusammensetzung der Dauereier im Sediment direkt auf den Einfluß der Klone auf die Daphnien-Population im Pelagial geschlossen werden. Weiterhin führt dies dazu, daß die Zusammensetzung der Dauereier im Sediment nicht dem entspricht, was an Dauereiern ins Sediment abgesunken ist. Besonders Klone, die sehr gut schlüpfen und damit einen größeren Einfluß auf die Population haben, sind im Sediment unterrepräsentiert. Daher ist das Sediment kein Spiegel der produzierten Dauereier mehr, sobald selektives Schlüpfen stattfindet.

#### 4.2.1.6 Bedeutung der Dauereier im Sediment - Synthese

Obwohl Daphnien mit zu den am besten untersuchten Zooplanktern gehören, gibt es bisher nur wenige Studien über die Auswirkung des *Time-Dispersals* auf die genetische Populationsstruktur bei *Daphnia* in Seen (Carvalho & Wolf, 1989; Hairston et al., 1999a; Weider et al., 1997; Wolf & Carvalho, 1989). Wolf & Carvalho (1989) vermuteten, daß an der Entstehung

der Dauereibank keine speziellen genetischen Gruppen beteiligt sind, sondern da potentiell alle Daphnien-Klone Dauereier produzieren können, daß die Dauereibank repräsentativ für die Daphnien-Population ist. Es ist bekannt, daß häufig nur ein geringer Anteil (< 5 %) einer Population Dauereier produziert (Belauer See, Spaak, 1995; Bodensee, Stich, 1989). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der Anteil der dauerei-produzierenden Daphnien nur von einer bestimmten, genetisch differenzierten Teilgruppe der Population gebildet wird. Nur diese Gruppe ist an der Bildung der Dauereibank im Belauer See beteiligt (Abschnitt 4.2.1.1). Andere Klone können zwar in hohen Frequenzen in der Population auftreten, sind aber nicht in der Dauereibank vertreten. Auch die Klone einer maternalen Linie von *D. cucullata* wurden bisher nicht bei den Dauereiern im Sediment gefunden (Abschnitt 4.2.1.2). Klone, die bei den treibenden Dauereiern in hohen Frequenzen auftraten, konnten ebenfalls nicht in der Dauereibank nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.1.3). Zudem gibt es Hinweise auf ein selektives Schlüpfen der Klone aus dem Sediment (Abschnitt 4.2.1.5). Das würde bedeuten, daß es durch das selektive Schlüpfen zu einer Verschiebung der Klon-Frequenzen und unter Umständen zu Verlusten von Klonen in der Dauereibank kommen kann. Die Dauereibank im Belauer See kann daher nicht als Spiegel der Population betrachtet werden. Höchstwahrscheinlich ist die Dauereibank auch in anderen Seen kein Spiegel der Vergangenheit, obwohl dies in manchen Studien vorausgesetzt wurde (Hairston et al., 1999a; Weider et al., 1997; Wolf & Carvalho, 1989).

Es ist bekannt, daß Dauereier für das Überleben von *Daphnia* in temporären Gewässern, wie z.B. in den Lebrader Fisch-Teichen (Schleswig-Holstein), die jährlich entwässert werden, essentiell sind. Der Einfluß einer Dauereibank in temporären Gewässern kann sogar ausreichen, um eine Verlangsamung der Evolutionsrate in der Population zu bewirken (Hairston, 1996; Hairston & De Stasio, 1988). In den Seen ist dieser Einfluß fraglich. Hairston et al. (1999a) untersuchten die ökologische Anpassung von *Daphnia* an die Eutrophierung im Bodensee. Sie ließen Daphnien aus Dauereiern schlüpfen, die vor, während und nach der Phase der Eutrophierung produziert wurden. Sie untersuchten die Resistenz gegen *Microcystis aeruginosa*, ein toxisches Cyanobakterium, daß während der Eutrophierung auftrat. Hairston et al. (1999a) zeigten, daß die Resistenz während der Eutrophierung hoch war und nach dem Ende der Eutrophierung die Varianz zunahm. Als mögliche Erklärung wird eine Reinvansion durch Daphnien, die aus älteren Dauereiern geschlüpft sind, angeführt. Die Ergebnisse aus dem Belauer See deuten jedoch darauf hin, daß die Dauereier eines Jahres aufgrund der hohen Sedimentationsrate und des ungestörten, geschichteten Sediments, nicht über mehrere Jahre

hinweg schlüpfen können. Auch für den Bodensee, der ebenfalls ein geschichtetes Sediment aufweist, kann angenommen werden, daß die Dauereier nicht über mehrere Jahre oder sogar Jahrzehnte hinweg schlüpfen. Daher ist es auch unwahrscheinlich, daß die Variation der Daphnien-Population im Pelagial durch das langjährige Schlüpfen von Dauereiern aus dem Sediment erklärt werden kann.

Weider et al. (1997) konnten für den Bodensee zeigen, daß die Allozym-Allelfrequenzen von Daphnien, die aus Dauereiern unterschiedlichen Alters (bis 35 Jahre) geschlüpft waren, sich analog zu einer Periode starker Eutrophierung (1960 - 1970), änderten. Sowohl Weider et al. (1997) als auch Hairston et al. (1999a) schlossen aus der Zusammensetzung der Dauereibank auf genetische Änderungen in der Zusammensetzung vergangener Daphnien-Populationen. Da die Dauereier von den vergangenen Population produziert wurden, ist dies grundsätzlich richtig. Dennoch muß eine Veränderung in der Zusammensetzung der Dauereibank nicht unbedingt auch eine genetische Änderung in der gesamten Population repräsentieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sowohl der Prozeß der Entstehung als auch das Schlüpfen der Dauereier selektiv sind. In beiden Arbeiten besteht das Problem, daß die Dauereier nicht direkt, sondern nur die daraus geschlüpften Daphnien, untersucht werden konnten. Der Schlüpfefolg der Dauereier nimmt mit zunehmendem Alter der Dauereier ab. Wenn das Schlüpfen selektiv ist, stellen die geschlüpften Daphnien keinen repräsentativen Teil der Dauereier dar. Ein weiteres Problem tritt durch die eigentliche Entstehung der Dauereier auf. Da Dauereier aus der sexuellen Reproduktion hervorgehen, müssen die entstandenen Klone nicht unbedingt vorher in der Population vorhanden gewesen sein. Sie entstanden erst durch die Rekombination. Daher können die Aussagen, die auf den geschlüpften Klonen basieren, nur bedingt zutreffen. Es stellt sich weiterhin die Frage, welcher Anteil der Population Dauereier produziert; der Teil der Population, der gut an die Umweltbedingungen adaptiert ist oder der Teil der Population, der weniger gut adaptiert und möglicherweise sogar vom Aussterben bedroht ist? Es kann nicht direkt entschieden werden, welcher Teil der Population die Dauereier produziert hat.

Die Bedeutung der *Daphnia*-Dauereibank und des *Time-Dispersals* für eine *Daphnia*-Population kann nur beurteilt werden, wenn auch die Prozesse verstanden werden, die zur Entstehung der Dauereibank geführt haben.

#### 4.2.2 Einfluß der *Daphnia*-Dauereier auf die genetische Struktur der Population im Pelagial

Das Habitat des Zooplanktons ist räumlich und zeitlich strukturiert (Dumont, 1967; Hutchinson, 1967; Ragotzkie & Bryson, 1953). Ebenso sind sowohl räumliche, d.h. vertikale sowie horizontale Abgrenzungen (Weider, 1984), als auch zeitliche Abgrenzungen von *Daphnia*-Genotypen (Carvalho, 1988; Spaak, 1996; Weider, 1985; Weider & Stich, 1992) bekannt.

Auch im Belauer See ist eine zeitliche Veränderung der genetischen Struktur der Daphnien-Population zu erkennen. Bei allen drei Taxa sind Phasen zu erkennen, in denen geringe genetische Distanzen auftreten, und Phasen, die von hohen genetischen Distanzen geprägt sind. Bei *D. hyalina* sind die genetischen Distanzen zum Zeitpunkt der sexuellen Reproduktion im Herbst gering. Im Gegensatz dazu sind die genetischen Distanzen im Frühling wesentlich höher (Abbildung 3.14). Die Population im Herbst und im Frühling ist nach den  $F_{ST}$ -Werten moderat differenziert (Tabelle 3.9). Begleitet wird diese Differenzierung durch einen Wechsel in den Allelfrequenzen (Abbildung 3.11). Die ausgeprägte Veränderung der genetischen Struktur im Frühling fällt zusammen mit dem erwarteten Schlüpfen der Dauereier aus dem Sediment. Ein weiterer Hinweis auf den Einfluß der Dauereier liegt in der Abnahme der Heterozygotität im Frühling (Abbildung 3.7). Da die Dauereier eine geringere Heterozygotität (Abbildung 3.17; Tabelle 3.14) besaßen als die Population im Herbst, könnte die Abnahme der Heterozygotität auf geschlüpfte Daphnien hinweisen. Dies würde bedeuten, daß, auch wenn die Dauereibank vermutlich keinen Einfluß auf die Evolutionsrate in der Population hat, die rezenten Dauereier, die schlüpfen, die Populationsstruktur der Daphnien im Pelagial dennoch beeinflussen können.

Auch bei *D. cucullata* sind die genetischen Distanzen im Herbst während der Phase der sexuellen Reproduktion geringer als im Frühling und Früh-Sommer (Abbildung 3.15). Der Herbst und Früh-Sommer sind nach den  $F_{ST}$ -Werten sehr stark differenziert (Tabelle 3.10). Diese Differenzierung ist wiederum durch einen Wechsel der Allelfrequenzen gekennzeichnet (Abbildung 3.12). Wie bei *D. hyalina* stimmt auch bei *D. cucullata* der Wandel in der genetischen Struktur mit dem erwarteten Schlüpfen der Dauereier aus dem Sediment überein. Die Heterozygotität der Population nimmt in diesem Zeitraum stark zu (Abbildung 3.7). Der Anstieg der Heterozygotität kann jedoch zunächst nicht auf den Einfluß der *D. cucullata*-Dauereier aus dem Sediment zurückgeführt werden, da die Heterozygotität der Dauereier nicht

wesentlich unterschiedlich (Abbildung 3.26) von der Heterozygotität in der Population war. Aber auch andere, unkontrollierbare Faktoren, wie z.B. die Abundanzen einzelner Klone, können von Bedeutung für die Entwicklung der Heterozygotität in einer Population sein. Daher kann die Änderung der Heterozygotität nur als Hinweis auf den Einfluß der Dauereier aus dem Sediment gewertet werden. Andererseits könnte der starke Anstieg der Heterozygotität bei *D. cucullata* auch auf das Auftreten von Hybriden zurückgeführt werden (Abschnitt 4.1.5).

Für *D. galeata* ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei *D. cucullata* und *D. hyalina*, allerdings sind die Phasen zeitlich verschoben. Bei *D. galeata* sind die genetischen Distanzen im Herbst am größten, nicht im Frühling (Abbildung 3.13). Die Daphnien vom Sommer und vom Herbst zeigen nach den  $F_{ST}$ -Werten eine größere Differenzierung (Tabelle 3.8). Diese Differenzierung wird von einem Wechsel der Allelfrequenzen begleitet (Abbildung 3.10). Unter der Voraussetzung, daß das Muster der genetischen Distanzen durch das Schlüpfen der Dauereier und die Phase der sexuellen Reproduktion bestimmt wird, ist zu erwarten, daß bei *D. galeata* im Sommer die sexuelle Reproduktion stattfindet, und daß im Herbst die Dauereier schlüpfen. Wie erwartet produzierte *D. galeata* im Sommer Dauereier und demzufolge müßte, gemäß dem Muster von *D. hyalina* und *D. cucullata*, das Schlüpfen der Daphnien aus dem Sediment im Herbst und nicht im Frühling zu erwarten sein. Da die Heterozygotität der Dauereier im Sommer niedriger war als die der Population (Abbildung 3.16; Tabelle 3.11), könnte die Abnahme der Heterozygotität zu Beginn des Herbstes (Abbildung 3.7) ein Anzeichen auf den Einfluß der Dauereier aus dem Sediment sein.

Für alle drei Taxa ist nachvollziehbar, daß die genetischen Distanzen während der Phase der sexuellen Reproduktion, weniger ausgeprägt sind als zu der Zeit, in der das Schlüpfen von Daphnien aus dem Sediment erwartet wird. Die zeitlich verschobenen Phasen der sexuellen Reproduktion, im Herbst bei *D. hyalina* und *D. cucullata* und im Sommer bei *D. galeata*, führen vermutlich auch zu einer unterschiedlichen Terminierung des Schlüpfens der Dauereier aus dem Sediment.

### 4.2.3 Auswirkung der sexuellen Reproduktion auf das HWE

Als diploider Organismus mit immenser Populationsgröße erfüllen Daphnien zunächst grundlegende Annahmen des Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE). Als zyklisch parthenogenetische Organismen hingegen widersprechen Daphnien zumindest teilweise einer Voraussetzung des HWE, der sexuellen Reproduktion. Daher wird nicht unbedingt von einer Übereinstimmung mit dem HWE, für den Teil einer Population, der sich asexuell fortpflanzt bzw. der asexuell entstanden ist, ausgegangen. Dauereier hingegen, als erste sexuell entstandene Generation, sollten Übereinstimmung mit dem HWE zeigen oder sich diesem annähern, sofern ihrer Entstehung die zufällige Paarung vorausgegangen ist. Da sich die Daphnien, die an der Produktion von Dauereiern beteiligt sind, genetisch von den Daphnien abgrenzen lassen, die während dieser Zeit Subitaneier produzieren (Abschnitt 4.2.1.1), wurden diese Gruppen getrennt analysiert.

Sowohl *D. hyalina*- als auch *D. galeata*-Dauereier nähern sich dem HWE an und entsprechen damit den Erwartungen (Tabelle 3.11; Tabelle 3.14). Bei *D. galeata*-Dauereiern wird dies durch eine Abnahme des Anteils heterozygoter Dauereier erreicht (Abbildung 3.16). Die Gendiversität, die der erwarteten Heterozygotität nach HWE entspricht, ist dagegen mit der Gendiversität der Weibchen mit Dauereiern vergleichbar. Dies bedeutet für die Dauereier im Sediment, daß diese zwar die Gendiversität eines Teils der Daphnien-Population, der Weibchen mit Dauereier und der Männchen, im Pelagial reflektieren, nicht aber, daß anhand der Dauereier im Sediment auch die Heterozygotität der Daphnien im Pelagial abgeleitet werden kann. Möglicherweise gibt es in der *D. galeata*-Population einen Selektionsvorteil der heterozygoten Daphnien. Dies kann mit den Mikrosatelliten-Markern, die als neutrale Marker gelten, jedoch nicht überprüft werden. Allerdings ist eigentlich von neutralen Markern zu erwarten, daß die Vererbung grundsätzlich dem HWE folgt. Wenn Mikrosatelliten-Loci aber in der unmittelbaren Nachbarschaft eines Gens liegen, sind sie mit diesen gekoppelt, und somit könnte ein Heterozygoten-Überschuß bei *D. galeata*-Weibchen als Hinweis auf einen Selektionsvorteil für heterozygote Daphnien gedeutet werden. Dieser Selektionsvorteil würde dann durch die sexuelle Reproduktion zu Gunsten des HWE, zumindest teilweise, eingebüßt. Im Gegensatz zu *D. galeata* befinden sich *D. hyalina*-Weibchen mit Dauereiern und *D. hyalina*-Männchen ebenso wie die *D. hyalina*-Dauereier nahezu im HWE. Bei den *D. hyalina*-Weibchen mit Subitaneiern kann dagegen ein Heterozygoten-Überschuß festgestellt werden. Die Annäherung der *D. hyalina*- und *D. galeata*-Dauereier an das HWE kann als Anzeichen einer

zufällige Paarung innerhalb der Gruppe der sich sexuell-reproduzierenden Daphnien gewertet werden.

#### 4.2.4 Bedeutung der Dauereier im Sediment als paläolimnologische Datenbank

Die molekulare Archäologie befaßt sich mit evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen und der Populationsgenetik ausgestorbener Arten anhand der Analyse der mtDNA. Das Gebiet der molekularen Archäologie gewinnt seit Mitte der 80ziger Jahre an Bedeutung. Zu den spektakulärsten Arbeiten zählen Untersuchungen an 140 Jahre alten Quaggas (Higuchi et al., 1984), 3300 Jahre alten Moas (Cooper et al., 1992), an einer 17 Millionen Jahre alten Magnolie (Golenberg et al., 1990), an einer 30 Millionen Jahre alten Termiten in Bernstein (DeSalle et al., 1993) oder an einem 120 - 135 Millionen Jahre alten Rüsselkäfer in Bernstein (Cano et al., 1993). Auch menschliche archäologische Funde wurden untersucht (z.B. Haas et al., 2000; Handt et al., 1996; Hänni et al., 1994; Krings et al., 1997; Ovchinnikov et al., 2000). Häufig wird jedoch die Authentizität der Ergebnisse kontrovers diskutiert, da die Gefahr der Kontamination durch rezente DNA hoch ist und die Ergebnisse teilweise in keinem anderen Labor reproduziert werden konnten. Die Authentizität der von Krings et al. (1997) analysierten mtDNA eines Neanderthalers wurde dagegen indirekt durch die DNA-Analyse eines zweiten Neanderthalers von Ovchinnikov et al. (2000) bestätigt. Die Analyse zeigte, daß beide Neanderthaler zwar nah verwandt, die DNA-Sequenzen jedoch nicht identisch sind. Diese und andere Studien zeigen, daß DNA bei entsprechenden Bedingungen (Abschnitt 4.1.6) auch über große Zeiträume hinweg stabil genug bleibt, um verlässliche genetische Informationen von zum Teil ausgestorbenen Lebewesen zu erhalten.

Im Gegensatz zu diesen Einzelfunden ist im Sediment eines Sees eine immense Anzahl von *Daphnia*-Dauereiern vorhanden. Die Varvenbildung im Sediment des Belauer Sees ermöglicht eine gute Datierung der Dauereier (Abschnitt 2.2.3.2) und die Untersuchung der Populationsentwicklung. Die *Daphnia*-Dauereier, die in größeren Tiefen im Sediment des Belauer Sees (bis 23 m) gefunden wurden, sind mehrere Jahrtausende alt (Abbildung 2.4). Mit der Methode der Allozym-Analyse konnten bislang nur Daphnien und keine Dauereier analysiert werden. Daher konnten nur Dauereier untersucht werden aus denen sich noch Daphnien entwickelten. Während es bei über 330 Jahre alten Copepoden-Dauereiern gelang, diese zum Schlüpfen zu induzieren (Hairston et al., 1995), war dies für *Daphnia*-Dauereier nur bis zu einem Alter von ca. 60 Jahren möglich (Hairston et al., 1999a; Weider et al., 1997). Mit Hilfe

der Mikrosatelliten-Analyse konnten die alten Dauereier im Sediment des Belauer Sees untersucht werden, die zwar nicht mehr schlüpfähig sind, aber noch Fragmente intakter DNA enthalten (Abschnitt 4.1.6). Da beim Sedimentkern nicht mehr alle Sedimenttiefen vorhanden waren, war eine systematische Analyse über einen großen Zeitrahmen nicht möglich. Trotzdem lassen sich einige interessante Aspekte exemplarisch darstellen.

Bei der Analyse der Sedimente wurde festgestellt, daß die Abundanzen der alten *Daphnia*-Dauereier in den einzelnen Sedimenttiefen stark variieren (Abbildung 3.29). Hinweise auf eine fortschreitende Eutrophierung des Belauer Sees bieten vor allem Diatomeen-Analysen (Håkansson, 1998). Bis vor ca. 2000 Jahren (9 m) wurde der Belauer See als mesotroph eingestuft. Danach wurde die zunehmende Eutrophierung des Belauer Sees mit dem Auftreten von *Stephanodiscus minutulus* und anderen alkaliphilen Arten angezeigt. Vor ca. 1060 Jahren (6 m) verschwanden die zuvor vorherrschenden *Cyclotella sp.*, die oligo- bis mesotrophe Gewässer bevorzugen. Seit wenigen Jahrzehnten wird der Belauer See als hypereutroph eingeschätzt. Die etwa 2000 Jahre lang dominierende Diatomee *Stephanodiscus minutulus* ist heute kaum mehr vorhanden. Besonders hohe Dauerei-Abundanzen werden bis zu einem Alter von ca. 900 Jahren festgestellt, also relativ kurz nach dem Verschwinden von *Cyclotella sp.* Die Fluktuationen bei den Abundanzen sind so ausgeprägt, daß nicht angenommen wird, daß dies auf Effekte der Probenahme, wie z.B. die fleckenartige (*Patchy*) Verteilung der Dauereier im Sediment oder geringe Probenvolumina, zurückgeführt werden kann. Möglicherweise spiegeln die variierenden Dauerei-Abundanzen auch zeitliche Unterschiede in den Populationsdichten der Daphnien. Die Skalierung sowohl der Diatomeen-Analyse als auch der Dauereier ist jedoch zu lückenhaft, um anhand der Umweltdaten die Dauerei-Abundanzen bestimmter Jahrzehnte oder Jahrhunderte nachzuvollziehen.

Der Vergleich der genetischen Variation von älteren Dauereiern (159-195 Jahre) mit der von heutigen Dauereiern zeigt keinen nennenswerten Unterschied (Abbildung 3.30). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Selektionsprozesse innerhalb von nicht ganz 200 Jahren zu einer deutlichen genetischen Distanzierung ( $D = 0,36$ ) und einer sehr großen Differenzierung ( $F_{ST} = 0,15$ ) zwischen älteren und heutigen Dauereiern geführt haben. Dies könnte als ein Hinweis auf die stattfindende Mikroevolution gesehen werden. Unterstützt wird dies dadurch, daß einige Allele bisher nur bei alten Dauereiern gefunden wurden und sich die Mikrosatelliten-Allelfrequenzen deutlich unterscheiden (Abbildung 3.31). Hinweise auf Veränderungen der klonalen Zusammensetzung durch Mikroevolution sind für Daphnien bekannt (Hairston et



al., 1999a; Weider et al., 1997). Obwohl es eine sehr große Differenzierung zwischen älteren und heutigen Dauereiern gibt, treten viele Allele bei beiden auf. Es wurde sogar unter den 111 analysierten alten Dauereiern ein „Klon“ identifiziert, der auch heute noch in der Population vertreten ist. Auf der anderen Seite wurden über einen Zeitraum von mehreren Jahrhunderten mehrere *D. pulex*-Dauereier, sowie ein 1750 Jahre altes *D. pulex*-Dauerei (Abbildung 3.28) gefunden. Diese Art die heute nicht im See vertreten. Es ist bekannt, daß sich ändernde Umweltbedingungen in einem Gewässer auf die Invasion und das Aussterben von *Daphnia*-Arten auswirken können (Duffy et al., 2000; Hairston et al., 1999b; Reid et al., 2000). *D. pulex* im Belauer See könnte ein weiteres Beispiel dafür sein, wie Veränderungen im See sich nicht nur auf der Ebene der Mikroevolution sondern auch auf der von Lebensgemeinschaften auswirken können, sofern das *D. pulex*-Dauerei nicht nur zufällig ins Sediment verdriftet wurde.

### 4.3 Schlußbetrachtung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die genetische Populationsstruktur, d.h. die Untergliederung der Population in Klone, die Dauereier produzieren, und Klone, die keine Dauereier produzieren, entscheidend für die Entstehung der Dauereibank ist (Abschnitt 4.2.1.6). Die Zusammensetzung und die Entwicklung der Dauereibank im Laufe der Zeit kann nicht unabhängig von der Populationsstruktur bewertet werden. Daher setzen Untersuchungen, die die Dauereibank als Spiegel vergangener Populationen betrachten, Kenntnisse über die Populationsstruktur voraus. Dies betrifft auch die Kenntnisse der Faktoren, die zur Bildung der Dauereier beitragen. Von zentraler Bedeutung ist es, die Klone zu bestimmen, die an der Produktion der Dauereier beteiligt sind, und den genauen Ablauf der Paarung zu untersuchen. Bisher ist in der Literatur wenig über das Verhalten der Daphnien bei der sexuellen Reproduktion bekannt (s. Brewer, 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, daß die Paarung zufällig innerhalb der Gruppe der Klone geschieht, die an der Produktion von Dauereiern beteiligt sind (Abschnitt 4.2.3). Eine zufällige Paarung von sexuell aktiven Daphnien könnte auch ein Grund für das Auftreten von Hybriden sein (Abschnitt 4.1.5). Besonders die Entstehung sowie das Schlüpfen der Hybride sind dabei von besonderem Interesse. Hier könnten Gründe dafür liegen, daß trotz kontinuierlicher Hybridisierung, die Taxa eigenständig und genetisch differenziert sind. Bei der Entstehung der Dauereier kommt es darauf an, ob eine Paarung zwischen verschiedenen Taxa zufällig geschieht oder vielleicht sogar vermieden wird. Beim Schlüpfen stellt sich die Frage, ob die Hybride gleich gut oder vielleicht schlechter schlüpfen. Antworten auf diese Fragen könnten auch aus der

Dauereibank kommen. Jedoch wird es nötig sein, die eingesetzten Marker-Systeme weiterhin zu optimieren und neue diagnostische Marker zu entwickeln, mit denen es möglich ist Hybride eindeutig zu identifizieren.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Entstehung, die Entwicklung und der Einfluß einer *Daphnia*-Dauereibank auf eine *Daphnia*-Population im Belauer See (Schleswig-Holstein) mit molekularbiologischen Methoden untersucht.

Das Taxon und die maternalen Linien von Daphnien und Dauereiern wurden mit Hilfe der Analyse eines mitochondrialen rDNA-Fragmentes (12S rDNA) bestimmt. Die Sequenzunterschiede der amplifizierten mitochondrialen Fragmente wurden mit der Technik der *Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen* (SSCP)-Analyse ausgewertet. Im Laufe der Arbeit wurden unterschiedliche Nachweis-Methoden angewendet (radioaktive Markierung, Silberfärbung, Fluoreszenz-Markierung). Die besten Ergebnisse wurden mit den fluoreszenz-markierten PCR-Produkten erzielt, die durch eine Kapillarelektrophorese aufgetrennt wurden. Mit dieser Methode war es erstmalig möglich Dauereier, die nur geringe Mengen DNA enthalten, zu analysieren. Mit der SSCP-Analyse wurden bei der Daphnien-Population im Belauer See fünf maternale Linien festgestellt, jeweils eine bei *D. galeata* und *D. hyalina* und drei bei *D. cucullata*.

Die genetische Variation innerhalb der Daphnien-Population wurde mittels der Mikrosatelliten-Analyse untersucht. Dazu war es erforderlich die PCR-Primer, die ursprünglich für die Arten *D. pulex* (Subgenus *Daphnia*) und *D. magna* (Subgenus *Ctenodaphnia*) entwickelt worden waren, für Taxa des *D. longispina*-Komplexes (Subgenus *Hyalodaphnia*) auszuwählen und die Bedingungen für die Amplifikation zu optimieren. Von über 30 getesteten Mikrosatelliten-Primern blieben 4, mit denen polymorphe Mikrosatelliten-Sequenzen für alle drei Taxa im Belauer See amplifiziert werden konnten. Die Primer wurden insgesamt an 15 *Daphnia*-Arten getestet, um eine *Cross*-Arten Amplifikation heterologer Mikrosatelliten-Loci zu überprüfen. Die Mikrosatelliten-Analyse wurde verglichen mit der Allozym-Analyse, die schon oft bei der genetischen Analyse von Zooplanktern durchgeführt wurde. Dabei konnte gezeigt werden, daß die verwendeten Mikrosatelliten-Loci eine höhere genetische Variation besitzen als die Allozym-Loci.

Eine Besonderheit des Belauer Sees ist, daß das Sediment nicht durch Bioturbation vermischt, sondern stratifiziert ist und daher datiert werden kann. Dies bedeutet, daß die chronologische Abfolge von Dauereiern im Sediment erhalten geblieben ist. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurden exemplarisch paläolimnologische Studien anhand älterer Dauereier (ca.

200 Jahre) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß rezente und ältere Dauereier einerseits viele identische Allele aufweisen, sich andererseits aber auch in vielen Allelen und in den Allelfrequenzen unterscheiden.

Die Bedeutung von *Daphnia*-Dauereiern im Sediment wurde anhand zweier Hypothesen diskutiert. Hypothese 1 postuliert, daß die Dauereier im Sediment ein Spiegel vergangener Populationen sind. Hypothese 2 nimmt an, daß die aus den Dauereiern schlüpfenden Daphnien die Evolutionsrate der Population verlangsamen.

Die Voraussetzungen der Hypothese 1 sind, daß alle Klone im Pelagial Dauereier produzieren, die Dauereier ins Sediment absinken, und, daß die Dauereier im Sediment weder alle noch selektiv schlüpfen. Die Untersuchungen zeigten jedoch, daß die Dauereier nicht von allen Klonen gebildet wurden. Während der Phase der sexuellen Reproduktion konnten sowohl bei *D. galeata* als auch bei *D. hyalina* die dauereier-produzierenden Daphnien genetisch von der übrigen Population unterschieden werden. Bestimmte Klone in der Population waren nicht an der Produktion von Dauereiern beteiligt und konnten nicht im Sediment nachgewiesen werden. Bei *D. cucullata* gab es Hinweise, daß nicht alle maternalen Linien Dauereier produzierten. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß von den produzierten Dauereier nicht alle ins Sediment absinken, ca. 5 % trieben an die Wasseroberfläche. Die treibenden Dauereier unterschieden sich in der genetischen Zusammensetzung von den Dauereiern, die ins Sediment absinken. Einige Klone, die häufig bei den treibenden Dauereiern vertreten waren, konnten bisher nicht im Sediment nachgewiesen werden. Weiterhin ist zwar davon auszugehen, daß nur ein geringer Anteil (1 - 2 %) der Dauereier aus dem Sediment schlüpft, d.h. die meisten Dauereier im Sediment verbleiben werden, es schlüpfen jedoch nicht alle Klone mit dem gleichen Erfolg. Durch dieses selektive Schlüpfen können Klone, die besonders gut schlüpfen, für die Dauereibank verloren gehen. Daher folgt die genetische Zusammensetzung der Dauereibank nicht den genetischen Veränderungen der Population. Die Dauereibank im Belauer See kann nicht, wie in Hypothese 1 angenommen, als Spiegel vergangener Population betrachtet werden.

Die wesentliche Voraussetzung der Hypothese 2 ist, daß Dauereier, die während eines Jahres produziert wurden, über mehrere Jahre hinweg schlüpfen können. Je mehr Dauereier schlüpfen und je länger der Zeitraum ist über den die Dauereier schlüpfen können, desto größer ist auch der Einfluß auf die Evolutionsrate der Daphnien-Population im Pelagial. Die hohe Sedi-

mentationsrate im Belauer See ( $2 \text{ cm Jahr}^{-1}$ ) führt jedoch dazu, daß Dauereier, die nicht innerhalb eines Jahres schlüpfen, wahrscheinlich nie schlüpfen werden. Für den Belauer See wird deshalb angenommen, daß die Dauereibank die Rate der Evolution in der Population nicht verlangsamen kann. Die Hypothese 2 trifft nicht zu.

Bei allen drei Taxa ist eine zeitliche Veränderung in der genetischen Zusammensetzung der Population zu erkennen. Diese Muster fallen zusammen mit der Entstehung der Dauereier und dem erwarteten Schlüpfen der Dauereier aus dem Sediment. Da *D. galeata* im Sommer Dauereier produziert, während *D. hyalina* und *D. cucullata* im Herbst Dauereier produzieren, sind die Muster zeitlich nicht synchron. Ein jahreszeitlicher Effekt als Erklärung für diese Muster ist daher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse zeigen, daß ein Einfluß von der Dauereibank ausgeht. Die hohen Abundanzen könnten den niedrigen Schlüpfefolg kompensieren. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß nur Dauereier aus der obersten Schicht, also bis zu einem Jahr alte Dauereier, noch schlüpfen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Arbaciauskas, K. & Gasiunaite, Z.R. 1996. Growth and fecundity of *Daphnia* after diapause and their impact on the development of a population. *Hydrobiologia*, **320**, 209-222.
- Awadalla, P., Eyre-Walker, A. & Smith, J.M. 1999. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science*, **286**, 2524-2525.
- Bacci, G., Cognetti, G. & Vaccari, A.M. 1961. Endomeiosis and sex determination in *Daphnia pulex*. *Experientia*, **17**, 505-506.
- Bagshaw, J.C. & Buckholt, M.A. 1997. A novel satellite/microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. *Gene*, **184**, 211-214.
- Banta, A.M. & Brown, L.A. 1929. Control of sex in Cladocera. *Physiol. Zool.*, **2**, 80-92.
- Begon, M., Harper, J.L. & Townsend, C.R. 1986. *Ecology*. Oxford: Blackwell Science.
- Boersma, M. 1994. On the seasonal dynamics of *Daphnia* species in a shallow eutrophic lake.: University of Amsterdam.
- Brewer, M.C. 1998. Mating behaviours of *Daphnia pulicaria*, a cyclic parthenogen: Comparisons with copepods. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **353**, 805-815.
- Brohede, J. & Ellegren, H. 1999. Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **1999**, 825-833.
- Brown, J.S. & Venable, D.L. 1986. Evolutionary ecology of seed-bank annuals in temporally varying environments. *Am. Nat.*, **127**, 31-47.
- Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: *Molecular evolutionary genetics* (Ed. by MacIntyre, R. J.), pp. 99-130. New York: Plenum.
- Bruford, M.W. & Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Cur. Op. Gen. Dev.*, **3**, 939-943.
- Bullini, L. 1994. Origin and evolution of animal hybrid species. *Trends Ecol. Evol.*, **9**, 422-426.
- Cáceres, C.E. 1998. Interspecific variation in the abundance, production, and emerge of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology*, **79**, 1699-1710.
- Cano, R.J., Poinar, H.N., Pieniazek, N.J., Acra, A. & Poinar, G.O., Jr. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*, **363**, 536-538.
- Carvalho, G.R. 1988. Differences in frequency and fecundity of PGI-marked genotypes in a natural population of *Daphnia magna* straus (Crustacea: Cladocera). *Func. Ecol.*, **2**, 453-462.
- Carvalho, G.R. & Wolf, H.G. 1989. Resting eggs of lake *Daphnia* i. distribution abundance and hatching of eggs collected from various depths in lake sediments. *Freshw. Biol.*, **22**, 459-470.
- Cerný, M. & Hebert, P. 1999. Intercontinental allozyme differentiation among four holarctic *Daphnia* species. *Limnol. Oceanogr.*, **44**, 1381-1387.
- Clauss, M.J. & Venable, D.L. 2000. Seed germination in desert annuals: an empirical test of adaptive bet hedging. *Am. Nat.*, **155**, 168-186.

- Colbourne, J.K., Hebert, P.D.N. & Taylor, D.J. 1997. Evolutionary origins of phenotypic diversity in *Daphnia*. In: *Molecular Evolution and Adaptive Radiation* (Ed. by Givnish, T. J. & Sytsma, K. J.), pp. 163-188: Cambridge University Press.
- Cooper, A., Mourer-Chauvire, C., Chambers, G.K., von Haeseler, A., Wilson, A.C. & Pääbo, S. 1992. Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA*, **89**, 8741-8744.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle of life*. London: John Murray.
- Dempster, A., Laird, N. & Rubin, D. 1977. Maximum likelihood estimation from incomplete data via the EM algorithm. *J. Roy. Statist. Soc.*, **39**, 1-38.
- Denk, A. 1998. Populationsgenetische Untersuchungen an *Daphnia*-Arten und ihren Hybriden im Plußsee. In: *Naturwissenschaftliche Fakultät III*, pp. 112. Regensburg: Universität Regensburg.
- DeSalle, R., Barcia, M. & Wray, C. 1993. PCR jumping in clones of 30-million-year-old DNA fragments from amber preserved termites (*Mastotermes Electrodanicus*). *Experientia*, **49**, 906-909.
- Dodson, S.I. & Frey, D.G. 1991. Cladocera and other Branchiopoda. In: *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates* (Ed. by Thorp, J. H. & Covich, A. P.), pp. 723-786. New York: Academic Press.
- Duffy, M.A., Perry, L.J., Kearns, C.M., Weider, L.J. & Hairston, N.G. 2000. Paleogenetic evidence for past invasion of Onondaga Lake, New York, by exotic *Daphnia curvirostris* using mtDNA from dormant eggs. *Limnol. & Oceanogr.*, **45**, 1409-1414.
- Dumont, H.J. 1967. A five day study of patchiness of *Bosmina coregoni* Baird in a shallow eutrophic lake. *Mem. Ist. Ital. Idiobiol.*, **22**, 81-103.
- Edmondson, W.T. & Litt, M. 1982. *Daphnia* in Lake Washington. *Limnol. & Oceanogr.*, **27**, 272-293.
- Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T. & Chakraborty, R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, **12**, 241-253.
- Ellegren, H. 1993. Genome analysis with microsatellite markers. In: *Genome analysis with microsatellite markers*. (Ed. by Ellegren, H.). Uppsala, sweden: Pagination varies Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Animal Breeding and Genetics: Uppsala, Sweden.
- Ender, A., Schwenk, K., Staedler, T., Streit, B. & Schierwater, B. 1996. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. *Mol. Ecol.*, **5**, 437-441.
- Epplen, J.T. 1988. On simple repeated GA-C-T-A sequences in animal genomes - a critical reappraisal. *J. Heredity*, **79**, 409-417.
- Eyre-Walker, A., Smith, N.H. & Smith, J.M. 1999. How clonal are human mitochondria. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **266**, 477-483.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Fisher, R.A. 1954. *Statistical methods for research workers*. Edingburgh: Oliver and Boyd.

- FitzSimmons, N.N., Moritz, C. & Moore, S.S. 1995. Conservation and Dynamics of Microsatellite Loci over 300 Million Years of Marine Turtle Evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 432-440.
- Frey, D.G. 1958. The late glacial cladoceran fauna of a small lake. *Arch. Hydrobiol.*, **54**, 209-275.
- Freyer, G. 1972. Observations on the ephippia of certain macrothricid cladocerans. *Zoo. J. Lin. Soc.*, **51**, 79-96.
- Gießler, S. 1987. Mikroevolution und Populationsgenetik im *Daphnia galeata/hyalina/cucullata*-Komplex (Crustacea: Cladocera). Eine Freilandanalyse. München: Universität München.
- Gießler, S. 1997. Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology. *J. Evol. Biol.*, **10**, 87-105.
- Gilbert, J.J. 1974. Dormancy in rotifers. *Trans. Am. Micro. Soc.*, **93**, 490-513.
- Golenberg, E.M., Giannasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D. & Zurawski, G. 1990. Chloroplast DNA sequence from a miocene magnolia species. *Nature*, **344**, 656-658.
- Gómez, A. & Carvalho, G.R. 2000. Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Mol. Ecol.*, **9**, 203-214.
- Goudet, J. 1999. PCA-Gen. Lausanne.
- Grant, P.R. & Grant, B.R. 1992. Hybridization of bird species. *Science*, **256**, 193-197.
- Guo, S.W. & Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Haas, C.J., Zink, A., Pálfi, G., Szeimies, U. & Nerlich, A.G. 2000. Detection of leprosy in ancient human skeletal remains by molecular identification of *Mycobacterium leprae*. *Am. J. Clin. Path.*, **114**, 428-436.
- Hagelberg, E., Goldman, N., Lió, P., Whelan, S., Schiefenhövel, W., Clegg, J.B. & Bowden, D.K. 1999. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **266**, 485-492.
- Hagelberg, E., Gray, I.C. & Jeffreys, A.J. 1991. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature*, **352**, 427-9.
- Hairston, N.G., Jr. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology & Oceanography*, **41**, 1087-1092.
- Hairston, N.G., Jr. & De Stasio, B.T., Jr. 1988. Rate of evolution slowed by a dormant propagule pool. *Nature*, **336**, 239-242.
- Hairston, N.G., Jr., Van Brunt, R.A., Kearns, C.M. & Engstrom, D.R. 1995. Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology*, **76**, 1706-1711.
- Hairston, N.G.j., Lampert, W., Cáceres, C.E., Holtmeier, C.L., Weider, L.J., Gaedke, U., Fischer, J.M., Fox, J.A. & Post, D.M. 1999a. Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature*, **401**, 446.
- Hairston, N.G.j., Perry, L.J., Bohonak, A.J., Fellows, M.Q. & Kearns, C.M. 1999b. Population biology of a failed invasion: paleolimnology of *Daphnia exilis* in upstate New York. *Limnol. & Oceanogr.*, **44**, 477-486.



- Håkansson, H. 1998. Diatom succession in the sediment core Q300, Belauer See, northern Germany. *J. Paleolim.*, **in press**
- Haldane, J.B.S. 1954. An exact test for randomness of mating. *J. Genetics*, **52**, 631-635.
- Hamada, H., Petrino, M. & Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **79**, 6465-6469.
- Hanazato, T. & Yasuno, M. 1989. Influence of overwintering *Daphnia* on spring zooplankton communities: an experimental study. *Ecol. Res.*, **4**, 323-338.
- Handt, O., Krings, M., Ward, R.H. & Pääbo, S. 1996. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Amer. J. Hum. Genet.*, **59**, 368-376.
- Hänni, C., Laudet, V., Coll, J. & Stehelin, D. 1994. An unusual mitochondrial DNA sequence variant from an egyptian mummy. *Genomics*, **22**, 487-489.
- Harrison, R.G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.*, **7**, 69-128.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth. Appl.*, **1**, 34-38.
- Hayashi, K. & Yandell, D.W. 1993. How sensitive is PCR-SSCP. *Human mutation*, **2**, 338-346.
- Hebert, P.D. & Ward, R.D. 1972. Inheritance during parthenogenesis in *Daphnia magna*. *Genetics*, **71**, 639-642.
- Hebert, P.D.N. 1978. The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biol. Rev.*, **53**, 387-426.
- Hebert, P.D.N. 1981. Obligate asexuality in *Daphnia*. *Am. Nat.*, **117**, 784-789.
- Hebert, P.D.N. 1987. Genetics of *Daphnia*. In: *Daphnia* (Ed. by Peters, R. H. & de Bernardi, R.), pp. 439-460. Pallanza: Mem. Ist. Ital. Idrobiol.
- Hebert, P.D.N. & Beaton, M.J. 1989. *Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis.*: Helena Laboratories.
- Hebert, P.D.N. & Finston, T.L. 1996. Genetic differentiation in *Daphnia obtusa*: a continental perspective. *Freshw. Biol.*, **35**, 311-321.
- Hebert, P.D.N., Schwartz, S.S. & Hrbáček, J. 1989. Patterns of genotypic diversity in Czechoslovakian *Daphnia*. *Heredity*, **62**, 207-216.
- Herzig, A. 1985. Resting eggs - a significant stage in the life cycle of the crustaceans *Leptodora kindti* and *Bythotrephes longimanus*. *Verh. Int. Ver. Theo. Ang. Limnol.*, **22**, 3088-3098.
- Hey, J. 2000. Human mitochondrial DNA recombination: can it be true? *Trends Ecol. Evol.*, **15**, 181-182.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O.A. & Wilson, A.C. 1984. Dna sequences from the quagga equus-quagga an extinct member of the horse family. *Nature*, **312**, 282-284.
- Hobaek, A. & Larsson, P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. *Ecology*, **71**, 2255-2268.
- Hoeh, W.R., Blakley, K.H. & Brown, W.M. 1991. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science*, **251**, 1488-1490.

- Hofmann, W. 1998. Cladocerans and chironomids as indicators of lake level changes in north temperate lakes. *J. Palaeolim.*, **19**, 55-62.
- Hofmann, W. 1999. Holocene succession and morphological variation of the *Bosmina* (*Eubosmina*) taxa of the Plußsee (northern Germany). *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.*, **54**, 359-372.
- Höss, M. 1995. Ancient DNA. *Horm. Res.*, **43**, 118-120.
- Höss, M. 2000. Neanderthal population genetics. *Nature*, **404**, 453-454.
- Hotelling, H. 1933. *Principal Components Analysis*. Newbury Park, California: Sage Publications.
- Hudson, R.R., Boos, D.D. & Kaplan, N.L. 1992. A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol. Biol. Evol.*, **9**, 138-151.
- Hutchinson, G.E. 1967. *A treatise on Limnology*. New York, USA: Wiley.
- Jarne, P. & Lagoda, P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, **11**, 424-429.
- Kaestner, A. 1967. *Lehrbuch der speziellen Zoologie*. Jena: Fischer Verlag.
- Kerfoot, W.C. 1974. Net accumulation rates and the history of cladoceran communities. *Ecology*, **55**, 51-61.
- Kivisild, T., Villems, R., Jorde, L.B., Bamshad, M., Kumar, S., Hedrick, P., Dowling, T., Stoneking, M., Parsons, T.J., Irwin, J.A., Awadalla, P., Eyre-Walker, A. & Smith, J.M. 2000. Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*, **288**, 1931-1931.
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E.T., Ishiwa, H., Takahato, N. & Chigusa, S.I. 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics*, **126**, 657-663.
- Kreis-Plön. 1998. *Seen-Beobachtung - 50 Gewässer aus dem Kreis Plön im Vergleich*. Eutin, Germany: struve-druck.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M. & Paabo, S. 1997. Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**, 19-30.
- Lampert, W. 1993. Ultimate causes of diel vertical migration of zooplankton: new evidence for the predator avoidance hypothesis. *Arch. Hydrobiol. B. Ergeb. Limnol.*, **39**, 79-88.
- Lampert, W., Fleckner, W., Rai, H. & Taylor, B.E. 1986. Phytoplankton control by grazing zooplankton: a study on the clear water phase. *Limnol. & Oceanogr.*, **31**, 478-490.
- Lampert, W. & Rothhaupt, K.O. 1991. Alternating dynamics of rotifers and *Daphnia magna* in a shallow lake. *Arch. Hydrobiol.*, **120**, 447-456.
- Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **4**, 397-401.
- Lynch, M., Pfrender, M., Spitze, K., Lehman, N., Hicks, J., Allen, D., Latta, L., Ottene, M., Bogue, F. & Colbourne, J.K. 1999. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution*, **53**, 100-110.
- Magurran, A.E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. New York: Chapman and Hall.
- Manly, B.F.J. 1993. *Multivariate Statistical Methods*. London: Chapman & Hall.

- May, R.M. 1975. Patterns of species abundance and diversity. In: *Ecology and Evolution of Communities* (Ed. by Cody, M. L. D.). Cambridge, Mass.: Harvard University Press.
- McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E. & Kornfeld, I. 1991. The Restriction Enzyme Analysis Package (REAP).
- Mellors, W.K. 1975. Selective predation of ephippial *Daphnia* and the resistance of ephippial eggs to digestion. *Ecology*, **56**, 974-980.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses. Flagstaff.
- Mogensen, H.L. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am. J. Bot.*, **83**, 383-404.
- Moghraby, A.E. 1977. A study on diapause of zooplankton in a tropical river - the Blue Nile. *Freshw. Biol*, **7**, 207-212.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, **106**, 283-291.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**, 874-879.
- Ovchinnikov, I.V., Götherström, A., Romanova, G.P., Kharitonov, V.M., Lidén, K. & Goodwin, W. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, **404**, 490-493.
- Pääbo, S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Nat. Ac. Sci. U.S.A.*, **86**, 1939-1943.
- Pääbo, S., Higuchi, R.G. & Wilson, A.C. 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction the emerging field of molecular archaeology. *J. Biol. Chem.*, **264**, 9709-9712.
- Pålsson, S. 2000. Microsatellite variation in *Daphnia pulex* from both sides of the Baltic Sea. *Mol. Ecol.*, **9**, 1075-1088.
- Pearson, K. 1901. On lines and planes of closest fit to a system of points in space. *Phil. Mag.*, **2**, 557-572.
- Poinar, H.N., Höss, M., Bada, J.L. & Pääbo, S. 1996. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science*, **272**, 864-866.
- Primmer, C.R., Moller, A.P. & Ellegren, H. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol.*, **5**, 365-378.
- Ragotzkie, R.A. & Bryson, R.A. 1953. Correlation of currents with the distribution of adult *Daphnia* in Lake Mendota. *J. Mar. Res.*, **12**, 157-172.
- Raymond, M.L. & Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280-1283.
- Reid, V.A., Carvalho, G.R. & George, D.G. 2000. Molecular genetic analysis of *Daphnia* in the English Lake District: species identity, hybridisation and resting egg banks. *Freshw. Biol*, **44**, 247-253.
- Rhodes, O.E.J., R.K. Chesser & Smith, M.H. 1996. *Population dynamics in ecological space and time.*: University of Chicago Press.

- Richardson, B.J., Baverstock, P.R. & Adams, M. 1986. *Allozyme electrophoresis a handbook for animal systematics and population studies*. London: Academic Press.
- Rico, C., Rico, I. & Hewitt, G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **263**, 549-557.
- Roff, D.A. & Bentzen, P. 1989. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms-chi2 and the problems of small samples. *Mol. Biol. Evol.*, **6**, 539-545.
- Schernewski, G. 1992. Raumzeitliche Prozesse und Strukturen im Wasserkörper des Belauer Sees. *Ecosys. Suppl.*, **Bd. 1**.
- Schlötterer, C., Amos, B. & Tautz, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, **354**, 63-5.
- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. Arlequin. Geneva: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Schwartz, S.S. & Hebert, P.D.N. 1987. Methods for the activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Freshw. Biol.*, **17**, 373-380.
- Schwenk, K. 1993. Interspecific hybridization in *Daphnia*: Distinction and origin of hybrid matriline. *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 1289-1302.
- Simpson, E.H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*, **163**, 688.
- Slatkin, M. & Excoffier, L. 1996. Testing the linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, **76**, 377-383.
- Smith, J.M. 1998. *Evolutionary genetics*. New York: Oxford University Press.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: W.H. Freeman and Co.
- Solignac, M., Monnerot, M. & Mounolou, J.C. 1983. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 6942-6946.
- Sommer, U., Gliwicz, Z.M., Lampert, W. & Duncan, A. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. Hydrobiol.*, **106**, 433-471.
- Spaak, P. 1994. Genetical ecology of a coexisting *Daphnia* hybrid species complex.: University of Utrecht.
- Spaak, P. 1995. Sexual reproduction in *Daphnia*: interspecific differences in a hybrid species complex. *Oecologia*, **104**, 501-507.
- 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. & Hoekstra, J.R. 1993. Clonal structure of the *Daphnia* population in Lake Maarsseveen: its implications for diel vertical migration. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **39**, 157-165.
- Stace, C.A. 1987. Hybridization and the plant species. In: *Differentiation patterns in higher plants* (Ed. by Urbanska, K. M.). New York: Academic Press.
- Stich, H.B. 1989. Seasonal changes of diel vertical migrations of crustacean plankton in Lake Constance. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, **83**, 355-405.
- Stross, R.G. 1966. Light and temperature requirements for diapause development and release in *Daphnia*. *Ecology*, **47**, 368-374.

- Sunnuks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.*, **15**, 199-203.
- Tam, Y.K. & Kornfield, I. 1996. Characterization of microsatellite markers in *Homarus* (Crustacea, Decapoda). *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, **5**, 230-238.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nuc. Acids Res.*, **17**, 6463-6472.
- Tautz, D., Trick, M. & Dover, G.A. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, **322**, 652-656.
- Taylor, D.J. & Hebert, P.D.N. 1992. *Daphnia galeata mendotae* as a cryptic species complex with interspecific hybrids. *Limnol. & Oceanogr.*, **37**, 658-665.
- Voelker, R.A., Schaffer, H.E. & Muai, T. 1980. Spontaneous allozyme mutation in *Drosophila melanogaster*: rate of occurrence and nature of the mutations. *Genetics*, **94**, 961-968.
- Vollmer, C. 1912. Über die Entwicklung der Dauereier der Cladoceren. *Biologisches Centralblatt*, **32**, 105-124.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, **10**, 506-513.
- Weber, J.L. & May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 388-396.
- Weber, J.L. & Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 1123-1128.
- Weider, L.J. 1984. Spatial heterogeneity of *Daphnia* genotypes: vertical migration and habitat partitioning. *Limnol. & Oceanogr.*, **29**, 225-235.
- Weider, L.J. 1985. Spatial and temporal genetic heterogeneity in a natural *Daphnia* population. *J. Plankt. Res.*, **7**, 101-123.
- Weider, L.J. 1993. Niche breadth and life history variation in a hybrid *Daphnia* complex. *Ecology*, **74**, 935-943.
- Weider, L.J. & Hebert, P.D.N. 1987. Ecological and physiological differentiation among low-arctic clones of *Daphnia pulex*. *Ecology*, **68**, 188-198.
- Weider, L.J., Hobaek, A., Crease, T.J. & Stibor, H. 1996. Molecular characterization of clonal population structure and biogeography of arctic apomictic *Daphnia* from Greenland and Iceland. *Mol. Ecol.*, **5**, 107-118.
- Weider, L.J., Hobaek, A., Hebert, P.D.N. & Crease, T.J. 1999. Holarctic phylogeography of an asexual species complex - II. Allozymic variation and clonal structure in Arctic *Daphnia*. *Mol. Ecol.*, **8**, 1-13.
- Weider, L.J., Lampert, W., Wessels, M., Colbourne, J.K. & Limburg, P. 1997. Long-term genetic shifts in a microcrustacean egg bank associated with anthropogenic changes in the Lake Constance ecosystem. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **264**, 1613-1618.
- Weider, L.J. & Stich, H.B. 1992. Spatial and temporal heterogeneity of *Daphnia* in Lake Constance; intra- and interspecific comparisons. *Limnol. & Oceanogr.*, **37**, 1327-1334.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.

- Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G. & Lathrop, M. 1992. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, **359**, 794-801.
- Wesenberg-Lund, C. 1910. Grundzüge der Biologie und Geographie des Süßwasser-Zooplanktons. *Int. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr.* **3**, *Biol. Suppl.*, **1**, 1-44.
- Wessels, M., Lenhard, A., Giovanoli, F. & Bollhoefer, A. 1995. High resolution time series of lead and zinc in sediments of Lake Constance. *Aquatic Sci.*, **57**, 291-304.
- Wiethold, J. 1996. Late Celtic and early Roman plant remains from the oppidum of Bibracte, Mont Beuvray (Burgundy, France). *Veg. Hist. Archaeobot.*, **5**, 105-116.
- Wiethold, J. 1998. Studien zur jüngeren postglazialen Vegetations- und Siedlungsgeschichte im östlichen Schleswig-Holstein. In: *Insitut für Ur- und Frühgeschichte*, pp. 363. Kiel: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Wolf, H.G. & Carvalho, G.R. 1989. Resting eggs of lake *Daphnia* II. *In situ* observations on the hatching of eggs and their contribution to population and community structure. *Freshw. Biol.*, **22**, 471-478.
- Wolf, H.G. & Mort, M.A. 1986. Inter-specific hybridization underlies phenotypic variability in *Daphnia* populations. *Oecologia*, **68**, 507-511.
- Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. In: *Mitochondrial genomes* (Ed. by Jeon, K. & Wolstenholme, D. R.), pp. 173-216: *Int. Rev. Cytol.*
- Workman, P.L. & Niswander, J.D. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *Am. J. Hum. Gen.*, **22**, 24-49.
- Wright, S. 1921. Systematics of mating. *Genetics*, **6**, 111-178.
- Wright, s. 1943. An analysis of local variability of flower color in *Linanthus parryae*. *Genetics*, **28**, 139-156.
- Wright, S. 1978. Speciation. In: *Evolution and the Genetics of Populations*, pp. 1-17. Chicago: University of Chicago Press.
- Yang, X. & Griffiths, A.J. 1993. Male transmission of linear plasmids and mitochondrial DNA in the fungus *Neurospora*. *Genetics*, **134**, 1055-1062.
- Zaffagnini, F. 1987. Reproduction in *Daphnia*. In: *Daphnia* (Ed. by Peters, R. H. & de Bernardi, R.), pp. 245-284. Pallanza: Mem. Ist. Ital. Idrobiol.
- Zardoya, R., Vollmer, D.M., Craddock, C., Streelman, J.T., Karl, S. & Meyer, A. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **263**, 1589-1598.
- Zouros, E. 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*, **359**, 412-414.

## 7 Anhang

Anhang 1: mt12S rDNA-Sequenzen (280 Bp) von *Daphnia* im Belauer See

	10	20	30	40	50
<i>cu</i> (ht205/220)	CGACNGTTTA	CCCTGTCTAA	GAATAACTGA	GAATAACAGG	GTATCTAATC
<i>cu</i> (ht230/230)	-CTTTTACTA	CCCTATCTAA	GAATAACTGA	GAATAACAGG	GTATCTAATC
<i>cu</i> (ht227/224)	-GT--TACTA	CCCTATCTAA	GAATAACTGA	GAATAACAGG	GTATCTAATC
<i>cu</i> (ht207/211)	-CTTTTACTA	CCCTGTCTAA	ATATAACTCA	GAATAACAGG	GTATCTAATC
<i>hy</i> (ht197/199)	ACNGT TACTA	CCCTGTCTAA	ATATAACTCA	GAATAACAGG	GTATCTAATC
<i>hy</i> (ht197/199)	-----TACTA	CCCTGTCTAA	ATATAACTCA	GAATAACAGG	GTATCTAATC
<i>ga</i> (ht194/199)	----TTACTA	CCCTGTTTAA	GAATAACTGA	GAATAACAGG	GTATCTAATC
	60	70	80	90	100
<i>cu</i> (ht205/220)	CTGGTTTTAA	ATCAAAGTTT	TTTAGTCCCT	AGTAATTTTTA	AAAGAAGAAA
<i>cu</i> (ht230/230)	CTGGTTTTAA	ATCAAAGTTT	TTTAGTCCCT	AGTAATTTTTA	AAAGAAGAAA
<i>cu</i> (ht227/224)	CTGGTTTTAA	ATCAAAGTTT	TTTAGTCCCT	AGTAATTTTTA	AAAGAAGAAA
<i>cu</i> (ht207/211)	CTGGTTTTAA	ATCAGAATTT	TTTAATTCCT	ATTAATTTTTT	AAAGAAGGAA
<i>hy</i> (ht197/199)	CTGGTTTTAA	ATCAGAGTTT	TTTAATTCCT	ATTAATTTTTT	AAAGAAGGAA
<i>hy</i> (ht197/199)	CTGGTTTTAA	ATCAGAGTTT	TTTAATTCCT	ATTAATTTTTT	AAAGAAGGAA
<i>ga</i> (ht194/199)	CTGGTTTTAA	ATCAAAGTTT	TTTAGTTCCT	ACTAATTTTTT	AAAGAAGAAA
	110	120	130	140	150
<i>cu</i> (ht205/220)	GGACTTTTTTA	TATTGATTTT	ACCCACCAAA	AAAGCCAAAG	AAACTTCAAA
<i>cu</i> (ht230/230)	GGACTTTTTTA	TATTGATTTT	ACCCACCAAA	AAAGCCAAAG	AAACTTCAAA
<i>cu</i> (ht227/224)	GGACTTTTTTA	TATTGATTTT	ACCCACCAAA	AAAGCCAAAG	AAACTTCAAA
<i>cu</i> (ht207/211)	AAACTCTTTA	TACTGATTTT	ACCCAACAAA	AAAGCTAAAA	TAACTTCAAA
<i>hy</i> (ht197/199)	AAACTCTTTA	TACTGATTTT	ACCCAACAAA	AAAGCTAAAA	TAACTTCAAA
<i>hy</i> (ht197/199)	AAACTCTTTA	TACTGATTTT	ACCCAACAAA	AAAGCTAAAA	TAACTTCAAA
<i>ga</i> (ht194/199)	GAGCTTCTTA	TACTGATTTT	ACCCAACAAA	AAAGCTAGAG	AAACTTCAAA
	160	170	180	190	200
<i>cu</i> (ht205/220)	AATTAAACAC	GTTAACTAAT	ATAAACACTC	ATTCCATATG	GATTCTTCGT
<i>cu</i> (ht230/230)	AATTAAACAC	GTTAACTAAT	ATAAACACTC	ATTCCATATG	GATTCTTCGT
<i>cu</i> (ht227/224)	AATTAAACAC	GTTAACTAAT	ATAAACACTC	ATTCCATATG	GATTCTTCGT
<i>cu</i> (ht207/211)	AATTTAAC--	GTTAACTAAA	ATTAACACTC	ATTCTATACG	GATTCTTCGT
<i>hy</i> (ht197/199)	AATTTAACGT	TAACTAAAAT	TAACACTCAT	TCTATACGGA	TTCTTCGTCT
<i>hy</i> (ht197/199)	AATTTAACGT	TAACTAAAAG	TAACACTCAT	TCTATACGGA	TTCTTCGTCT
<i>ga</i> (ht194/199)	AATTGAACGT	TAACTAATGT	AAACATT CAT	TCTATATGGA	TTCTTCGTCT
	210	220	230	240	250
<i>cu</i> (ht205/220)	CTAACCGCGA	CGGCTGGCAC	GATTTGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGNNNNNNNN
<i>cu</i> (ht230/230)	CTAACCGCGA	CGGCTGGCAC	GATTTGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGNNNNNNNN
<i>cu</i> (ht227/224)	CTAACCGCGA	CGGCTGGCAC	GATTTGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGNNNNNNNN
<i>cu</i> (ht207/211)	CTAACCGCGA	CGGCTGGCAC	GATTTGGTCA	TAGCTGTTTC	CTGNNNNNNNN
<i>hy</i> (ht197/199)	AACCGCGACG	GCTGGCACGA	TTTGGTCATA	GCTGTTTCCT	GNNNNNNNNNN
<i>hy</i> (ht197/199)	AACCGCGACG	GCTGGCACGA	TTTGGTCATA	GCTGTTTCCT	GNNNNNNNNNN
<i>ga</i> (ht194/199)	AACCGCGACG	GCTGGCACGA	TTTGGTCATA	GCTGTTTCCT	GNNNNNNNNNN
	260	270	280	290	300
<i>cu</i> (ht205/220)	NNNNNNNNNN	----			
<i>cu</i> (ht230/230)	NNNNNNNNNN	---			
<i>cu</i> (ht227/224)	NNNNNNNNNN	N			
<i>cu</i> (ht207/211)	NNNNNNNNNN	NNN			
<i>hy</i> (ht197/199)	NNNNNN	----	--		
<i>hy</i> (ht197/199)	NNNNNNNNNN	NNNN			
<i>ga</i> (ht194/199)	NNNNNNNNNN	NN			

*cu*: *D. cucullata*  
*hy*: *D. hyalina*  
*ga*: *D. galeata*

## Anhang 2: Mikrosatelliten-Allel-Bezeichnung nach der Größe der PCR-Produkte

Locus	Allel- Bezeichnung [Bp]	<i>D. galeata</i>	<i>D. hyalina</i>	<i>D. cucullata</i>
Dpu 6	121	✓	✓	—
	123	✓	✓	✓
	125	✓	✓	✓
	127	✓	✓	✓
	129	✓	✓	✓
	131	✓	✓	✓
	133	✓	✓	✓
	135	✓	✓	✓
	137	✓	✓	✓
	139	✓	✓	✓
	141	✓	✓	—
Dpu 30	141	—	—	✓
	143	✓	✓	✓
	145	✓	✓	✓
	147	✓	✓	✓
	149	✓	✓	✓
	151	✓	✓	—
	153	✓	✓	✓
	155	✓	✓	✓
	157	✓	✓	—
Dpu 45	125	✓	✓	✓
	127	✓	✓	✓
	129	✓	✓	✓
	131	✓	✓	✓
	133	✓	✓	✓
	135	✓	✓	✓
	137	✓	✓	—
	139	—	✓	—
Dpu 122	95	—	✓	✓
	98	✓	✓	✓
	101	✓	✓	✓
	104	✓	✓	—



Anhang 3: Mikrosatelliten-Allel-Bezeichnungen der saisonal am häufigsten auftretenden Allele (Abschnitt 3.2.3)

Taxon	Allel- Bezeichnung	Mikrosatelliten-Locus			
		Dpu 6	Dpu 30	Dpu 45	Dpu 122
<i>D. galeata</i>	1	135	147	133	101
	2	137	153	131	98
	3	131	155	—	—
	4	127	149	—	—
<i>D. hyalina</i>	1	137	153	133	101
	2	135	149	131	98
	3	133	155	129	—
	4	131	147	—	—
<i>D. cucullata</i>	1	129	143	129	101
	2	125	149	125	98
	3	—	147	133	—
	4	—	—	—	—

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. W. Lampert nicht nur dafür danken, daß er mir diese Arbeit ermöglichte, sondern auch für die Freiheit bei der Gestaltung der Arbeit. Durch seine Unterstützung konnte ich internationale Institute und Arbeitsgruppen besuchen und so wichtige Erfahrungen sammeln, die sich auch in meiner Arbeit widerspiegeln.

Herrn Prof. Dr. L.J. Weider möchte ich besonders dafür danken, daß er mir den Einstieg in die *Daphnia genetics* erleichterte. Seine fachlichen Anregungen haben dieser Arbeit wichtige Impulse und Ideen gegeben, nicht nur in der Zeit als er noch in Plön war (*thank you for the frisbee games as well !*). Die beiden Jahre im Team „Dr. Weiderstein“ möchte ich nicht missen.

Zum Gelingen dieser Arbeit haben die Wissenschaftler, die Mitarbeiter und die internationalen Gäste Wesentliches beigetragen, dafür allen herzlichen Dank!

Ich möchte mich bei Dr. K. Plath für sein Programm *GeDC*, ohne daß die Datenzusammenstellung ein Alptraum geworden wäre, und für die fachliche Kritik bei der Fertigstellung dieser Arbeit, die nicht nur die schlimmsten Schachtelsätze verhindert hat, bedanken. Danke an Dr. T.U. Berendonk für die vielen konstruktiven Diskussionen (*...und Köln ist doch nicht Ruhrgebiet !*) und kritischen Anmerkungen. An dieser Stelle sei auch herzlichst Frau Geißler für ihre kompetente Unterstützung gedankt. Dr. J. K. Colbourne sei dafür gedankt, daß er die genetischen Marker zur Verfügung stellte. Meiner ehemaligen Zimmergenossin Dr. S.E. Mitchell möchte ich für Ihre Hilfe bei statistischen Problemen danken. Bei Ch. Kreuzer, Dr. M. Boersma und Dr. K. Wilshire möchte ich mich für die vielen anregenden Diskussionen und den ebenso anregenden Kaffee- (und Milch-) Austausch bedanken.

Der Ökosystemforschung der Christian-Albrechts-Universität (Kiel), insbesondere Dr. W. Schäfer, möchte ich für das Entgegenkommen danken, das es mir ermöglichte den Belauer See zu befahren. In diesem Sinne auch Danke nicht nur für die engagierte Mithilfe, den unfreiwilligen Rudersport und die kalten Füße an K. Wiedenhöft, J. Weissmann, B. Maehler und G. Augustin, ohne die eine Probenahme nicht durchführbar gewesen wäre. Vielen Dank an Prof. Dr. Usinger und Dr. J. Wiethold, die mir den Zugang zu dem 30-m-langen Sedimentkern verschafften.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. P.D.N. Hebert (University of Guelph, Canada) bedanken. Herrn Prof. Dr. N.G. Hairston (Cornell University, USA) sei ebenso gedankt. Während meiner Aufenthalte dort konnte ich wertvolle Erfahrungen sammeln.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in der Zeit meiner Promotion immer unterstützt haben. Danke.

Referentin: .....

Korreferent: .....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

Der Dekan