



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Genetische Variabilität der mediterranen,
mesopsammalen Schnecke *Philinoglossa praelongata*
(Mollusca, Gastropoda, Euopisthobranchia)

verfasst von

Daniela Trpisovsky

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, im September 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 444

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ökologie

Betreut von:

a.o. Univ.-Prof. Dr. Gerhard Steiner

*Einen Tautropfen betrachtend,
entdeckte ich das Geheimnis des Meeres.*

Khalil Gibran

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung.....	1
II Abstract.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Systematik und Biologie	5
1.1.1 Gastropoda Cuvier, 1795	5
1.1.2 Heterobranchia J.E. Gray, 1840	5
1.1.3 Euopisthobranchia Jörger et al.,2010	6
1.1.4 Cephalaspidea P. Fischer, 1883.....	7
1.1.5 Philinoglossidae Hertling, 1932	8
1.1.6 <i>Philinoglossa praelongata</i> Salvini-Plawen, 1973.....	8
1.1.6.1 Morphologie	8
1.1.6.2 Reproduktion	9
1.1.6.3 Geographische Verbreitung	10
1.2 Der interstitielle Lebensraum	10
1.3 Populationsgenetik.....	11
1.4 Ziele dieser Studie.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Datensammlung	15
2.1.1 Probenahme.....	15
2.1.2 DNA Extraktion.....	17
2.1.3 PCR Amplifikation	18
2.1.4 Sequenzierung	20
2.1.5 Alignment	21
2.2 Genealogische Analysen	21
2.2.1 Daten-Sets und Partitionen.....	21
2.2.2 Distanzanalyse	22
2.2.3 Substitutions-Modelle	22
2.2.4 Maximum-Likelihood.....	22
2.2.5 Bayesian Inference.....	23
2.2.6 Netzwerk Analyse mit TCS – Statistische Parsimony	23
2.2.7 Arlequin – Standard AMOVA	24
2.2.8 BEAST – zeitliche Bestimmung des Divergenzalters	25

2.2.9 Visualisierung der Grafiken	26
3 Ergebnisse	29
3.1 Verwandtschaftsanalysen	31
3.1.1 16S rRNA.....	31
3.1.2 CO1	33
3.1.3 Combined (16S & CO1)	37
3.2 Statistische Ergebnisse.....	40
3.2.1 AMOVA.....	40
3.2.2 Distanzanalyse.....	41
3.3 BEAST - Koaleszenzanalyse	45
3.3.1 Substitutionssättigungsanalyse	45
3.3.2 Topologie der BEAST-Analyse.....	46
3.3.3 Zeitliche Bestimmung des Divergenzalters.....	47
4 Diskussion.....	51
4.1 Gegenüberstellung der verschiedenen Daten-Sets	51
4.1.1 Verwandtschaftsanalysen	51
4.1.1.1 Haplogruppen der Kroatien-Klade.....	51
4.1.1.2 Haplogruppen der Italien-Klade	52
4.1.2 Statistische Ergebnisse	53
4.1.3 Zeitliche Bestimmung des Divergenzalters.....	53
4.2 Genetische Differenzierung.....	54
4.2.1 Wie kommt Genfluss zwischen Populationen zustande?.....	54
4.2.2 Präsenz Kryptischer Arten?.....	55
4.2.3 Unterschiede in der Fortpflanzungsbiologie?.....	57
4.3 <i>Ph. praelongata</i> versus <i>Ph. helgolandica</i>	58
4.4 Conclusio	60
5 Literatur	61

I Zusammenfassung

Das marine Mesopsammal ist ein interstitieller Porenraum zwischen Sandkörnern, welcher von einer artenreichen Gemeinschaft von hochspezialisierten Tieren bewohnt wird. Die meisten mesopsammalen Gastropoden gehören der Gruppe der Euopisthobranchia und Acochlida an.

Das Ausbreitungspotential der mesopsammalen euopisthobranchen Gastropode *Philinoglossa praelongata* wird als sehr gering betrachtet, trotz ihrer weiten Verbreitung im Mittelmeer und darüber hinaus. Somit kann eine hohe genetische Variabilität zwischen geographisch getrennten Populationen angenommen werden. Dennoch kann eine früherer Studie der interstitiellen Gastropode *Pontoheyle milaschewitchii* eine hohe genetische Variabilität zwischen geographisch weit disjunkten Populationen im nördlichen Mittelmeer nicht bestätigen.

Das Ziel dieser phylogeographischen Studie ist die Untersuchung der genetischen Variabilität zweier geographisch getrennter interstitieller *Ph. praelongata* Populationen im Mittelmeer. Dazu wurden Individuen von *Ph. praelongata* in der nördlichen Adria (Kroatien), im Tyrrhenischen Meer (Südwest-Italien) und im Ligurischen Meer (Nordwest-Italien) gesammelt. Es soll unter anderem die Konspezifität in dieser Arbeit überprüft werden.

Ein Daten-Set der mitochondrialen Gene 16S rRNA und CO1 wurde gewonnen für phylogenetische und statistische Analysen. Zusätzlich wurde der Zeitpunkt der Koaleszenz der italienischen und kroatischen Population ermittelt.

Alle Analysen resultieren in zwei genetisch und geographisch deutlich voneinander getrennte Kladen. Die maximale genetische interspezifische Distanz reicht von 10.4 bis zu 14 % (CO1) und die F_{ST} -Werte reichen von 0.911 bis zu 0.962. Zusätzlich ergibt sich der Genfluss als extrem gering mit 0.04 Migranten pro Generation. Diese Ergebnisse weisen auf eine hohe genetische Differenzierung zwischen den „Populationen“ und auf die Präsenz zweier kryptischer Arten hin. Die Koaleszenz-Analyse schätzt das Divergenzalter beider Taxa auf 3, 8 Millionen Jahre, was auf eine Speziation im Mittelmeer nach der Messinianischen Salinitätskrise hindeutet.

Weitere Sequenz-Daten der morphologisch sehr ähnlichen *Ph. helgolandica*, und/oder zusätzliches Material derselben Standorte für eine morphologische Untersuchung der Radula, würde helfen, die Präsenz kryptischer Arten zu bestätigen.

II Abstract

The marine mesopsammal is an interstitial pore water-space between sand grains inhabited by a species-rich community of highly specialized animals. Most mesopsammal gastropods belong to the Euopisthobranchia and Acochlidia.

The dispersal potential of the mesopsammal euopisthobranch gastropod *Philinoglossa praelongata* is considered to be low, although it is widely distributed throughout the Mediterranean Sea and beyond. Therefore, genetic variation among separated populations is to be expected. However, a previous study on the interstitial gastropod *Pontohedyle milaschewitschii*, does not confirm high genetic variability of separated populations in the northern Mediterranean.

The aim of this phylogeographic study is to investigate the genetic variability of two widely geographically separated Mediterranean interstitial *Philinoglossa praelongata* populations and to test, if the genetic differentiation is as low as in *Pontohedyle milaschewitschii* populations. Therefore *Ph. praelongata* has been sampled in the northern Adriatic Sea (Croatia), Tyrrhenian Sea (Southwest-Italy) and Ligurian Sea (Northwest-Italy). In this investigation the conspecificity of these populations will be tested.

A dataset of the mitochondrial genes 16S rRNA and CO1 has been obtained for phylogenetic and statistical analysis. Additionally the Coalescent Event of the Italian and Croatian individuals was determined.

All analyses result in two genetically and geographically distinct clades. The maximal interspecific genetic distance ranges from 10.4 to 14.1% and F_{ST} values ranges from 0.911 to 0.962. Furthermore genflow is extremely low at 0.04 migrants per generation. These results indicate high differentiation between “populations” and the presence for two cryptic species. The coalescence-analyses estimate the divergence time between both taxa at 3.8 million years, which indicates a speciation in the Mediterranean Sea after the Messinian Salinity Crisis.

Additional sequence data on the morphologically similarly *Ph. helgolandica*, and/or additional morphological investigation on the radula of *Ph. praelongata* on both sampling sites (Croatia, West-Italy) will help to confirm the occurrence of cryptic species.

1 Einleitung

1.1 Systematik und Biologie

Tabelle 1. Systematik von *Philinoglossa praelongata*

Klasse	Gastropoda
Überordnung	Heterobranchia
Ordnung	Euopisthobranchia
Unterordnung	Cephalaspidea
Familie	Philinoglossidae

1.1.1 Gastropoda Cuvier, 1795

Die Klasse der Gastropoden ist eine sehr diverse Mollusken-Gruppe mit einer geschätzten Artenzahl von bis zu 150.000 Arten (Ponder & Lindberg, 1997). Gastropoden leben sowohl marin, limnisch, als auch terrestrisch. Alle schalentragenden Klassen der Mollusken gehören zu der Gruppe der Conchifera (Savini-Plawen, 1971). Die phylogenetische Verwandtschaft der Gastropoden mit anderen Conchifera (Scaphopoda, Cephalopoda, Bivalvia, etc.) Taxa sind noch nicht geklärt. Das bedeutendste Merkmal und die einzige allgemein akzeptierte Synapomorphie der Klasse der Gastropoda ist die Torsion. Bei der Torsion kommt es während der larvalen Entwicklung zu einer Bildung eines asymmetrischen Muskels. Die Kontraktion dieses Muskels, sowie das ungleiche Wachstum des Eingeweidesacks, sorgen für eine 180 Grad Drehung des Pallialkomplexes. Durch die Torsion werden auch die Hauptnervenstränge überkreuzt (Streptoneurie). Die Kalkschale (Concha) kann bei manchen Gruppen auch abgeflacht, längsgeteilt oder wieder rückgebildet sein (Salvini-Plawen, 1971). Ein Taxon innerhalb der Gastropoda stellen die Heterobranchia dar.

1.1.2 Heterobranchia J.E. Gray, 1840

In der Vergangenheit wurden die Heterobranchia-Familien sehr unterschiedlich klassifiziert. Haszprunar (1985) stellte das Heterobranchia-Konzept vor, worin die Heterobranchia den Prosobranchia gegenübergestellt wurden. Sie wurden unterteilt in die Pentaganglionata (Euthyneura) und die triganglionaten Allogastropoda (niedere Heterobranchia, Streptoneura). Die paraphyletische Gruppe der Opisthobranchia wurde, zusammen mit den Gymnomorpha und den Pulmonata, innerhalb der Pentaganglionata gestellt. Das wichtigste Merkmal der Pentaganglionata stellte dabei die Präsenz zweier zusätzlicher Ganglien (Parietalganglien) dar. Die Euthyneurie ist vermutlich nur eine

konvergente Entwicklung dieser Gruppe (Haszprunar, 1985). Die Monophylie der Euthyneura wird von vielen Studien unterstützt (z.B. Dayrat & Tillier, 2002). Vor kurzem wurden die Hauptgruppen innerhalb der Überordnung Heterobranchia in der molekularen Studie von Jörger et al. (2010) neu festgelegt. Während die niederen Heterobranchia keine Klade bilden, resultiert die Analyse in zwei neu definierte Kladen, die Euopisthobranchia und die Panpulmonata.

1.1.3 Euopisthobranchia Jörger et al., 2010

Die traditionelle Ordnung der „Opisthobranchia“ ist eine sehr diverse und große Gruppe von marinen Gastropoden. Sie enthalten nicht nur sehr große, bunte, schwimmende Formen, sondern auch winzige, sandbewohnende und unscheinbare Formen (Vonnemann, 2005). *Opisthobranch* bedeutet, dass die Kiemen hinter dem Herzen liegen. Die Schale dieser Gruppe ist meist reduziert, manchmal verinnerlicht, oder sogar nicht mehr vorhanden. Bei den „Opisthobranchia“ kommt es zu einem sekundären Zurückdrehen der Torsion während der embryonalen Entwicklung. Dabei wird auch die Überkreuzung der Hauptnervenstränge wieder aufgehoben (Euthyneurie) (Campbell & Reece, 2003). Die Monophylie der „Opisthobranchia“ wurde in fast allen bisherigen morphologischen und molekularen Studien abgelehnt (z.B. Dinapoli & Klussmann-Kolb, 2010; Klussmann-Kolb et al., 2008; Ponder & Lindberg, 1997). Eine der wenigen Apomorphien, die diese Gruppe zeigt, ist die Verzweigung des *Nervus labiotentacularis* (Salvini-Plawen & Steiner, 1996). Dieser Nerv wird allerdings wiederum als apomorphes Merkmal angezweifelt, aufgrund der Studien von Staubach (2008), welcher einen homologen Cerebralnerv (*Nervus tentacularis*) innerhalb der Pulmonaten entdeckte. Die von Jörger et al. (2010) neu definierte Gruppe der Euopisthobranchia sind der monophyletische Anteil der bisherigen „Opisthobranchia“, dazu zählen die Umbraculoidea, Anaspidea, Rucinace, Pteropoda, und Cephalaspidea. Die früheren „opisthobranchen“ Gruppen Sacoglossa, Glacidorboidea, Pyramidelloidea und Acochlidia werden nun zu den neuen Panpulmonata gestellt (Abbildung 1). Als morphologische Synapomorphie der Euopisthobranchia wird der Kaumagen vorgeschlagen (Jörger et al., 2010).

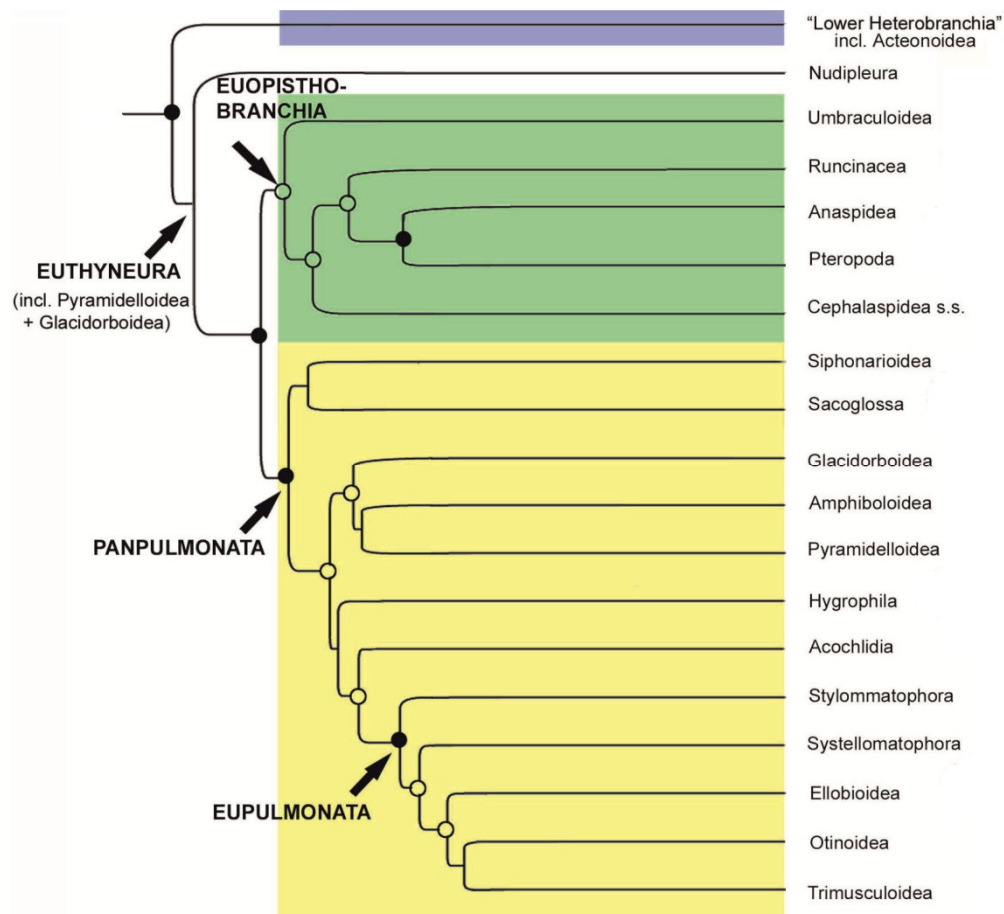


Abbildung 1. Reklassifizierung der Euthyneura (aus Jörger et al., 2010)

1.1.4 Cephalaspidea P. Fischer, 1883

Cephalaspidea besitzen meist eine reduzierte oder vom Mantel überwachsene Schale und einen charakteristischen Kopfschild, der ihnen das Graben im Sand erleichtert (Nahrungssuche). Das Leben im Sand ist für viele Vertreter dieser Gruppe charakteristisch. Die Cephalaspidea umfassen mindestens 840 rezente Arten weltweit (Wägele, 2004). Lange Zeit war unklar, welche Taxa nun in diese Gruppe inkludiert werden. Frühere Studien zogen sie als basale und konservative Opisthobranchia-Gruppe in Betracht (Schmekel, 1985; Mikkelsen, 1996). Nach Ponder & Lindberg (1997) beinhaltete die Unterordnung der Cephalaspidea folgende Überfamilien: Acteonoidea, Bulloidea, Diaphanoidea, Haminoeidea, Philinoidea, Ringiculoidea, Cylindrobulloidea. Nachdem die basalen Acteonoidea und Ringiculoidea, basierend auf morphologischen Studien, aus den Cephalaspidea ausgeschlossen wurden (und nun Überfamilien der niederen Heterobranchia darstellen), waren die Cephalaspidea als monophyletisch anzusehen (Haszprunar 1985; Mikkelsen, 1996; Bouchet & Rocroi, 2005). Drei gehärtete Kaumagen-Platten (zur Zerkleinerung der Nahrung) werden als Apomorphie der

Cephalaspidea angesehen (Mikkelsen, 1996). Die molekularen Studien von Maeda et al. (2010) und Neusser et al. (2011b) bestätigten die Platzierung von *Cylindrobulla* innerhalb der Sacoglossa (Panpulmonata). Letztlich wurden noch die Runcinacea von den Cephalaspidea ausgeschlossen (Malaquias et al.; 2009; Jörger et al., 2010). Die übrigen Cephalaspidea verbleiben nun innerhalb der neu definierten Euopisthobranchia (Jörger et al., 2010).

1.1.5 Philinoglossidae Hertling, 1932

Bouchet & Rocroi (2005) stellten die Familie der Philinoglossidae in die Überfamilie der Philinoidea. Jörger et al. (2010) wiesen aber in ihrer Studie darauf hin, dass überraschenderweise die beiden mesopsammalen *Philine exiqua* (Philinidae, Philinoidea) und *Philinoglossa praelongata* (Philinoglossidae, Philinoidea) einen voneinander unabhängigen Ursprung haben. Die Gruppe der Philinoidea ist damit als paraphyletisch anzusehen (Jörger et al., 2010). Die Familie der Philinoglossidae enthält 4 Gattungen und 8 Arten. Manche Mitglieder der Philinoglossidae haben reduzierte Ctenidien (Giere, 2009). Eine dieser Arten ist *Ph. praelongata*, welche von Salvini-Plawen (1973) beschrieben wurde.

1.1.6 *Philinoglossa praelongata* Salvini-Plawen, 1973

1.1.6.1 Morphologie

Der Körper ist wurmförmig gestreckt (bis ca. 3-4 mm Länge), hat einen rechteckigen Querschnitt und besitzt seitlich jeweils eine Furche. Die Tiere sind bräunlich-transparent und im hinteren Randbereich des Notums locker oliv-schwärzlich pigmentiert. Sehr auffällig ist die lichtorange Pallialdrüse zentral im hinteren Notumabschnitt zu erkennen, sowie die charakteristischen, am Körper verteilten Hautdrüsen. Der Kopf besitzt keine Anhänge, und zwei schwarze Augen sind deutlich sichtbar. Das Notum ist im vorderen Körperabschnitt verschmälert und Fuß tritt bei der Dorsalansicht an dieser Stelle zum Vorschein. Im terminalen Körperabschnitt ist das Notum überhängend verlängert und leicht gedreht und gekrümmt (Abbildung 2). Diese Einrichtung ist eine Anpassung an den mesopsammalen Lebensraum und ermöglicht es den Tieren, sich mit dem Hinterende an Sandkörner anzuheften, um bei aufgewirbeltem Sand rasch wieder zu Boden sinken zu können. Zusammen mit der Pallialdrüse und den Hautdrüsen, stellt die kaudale, gekrümmte Verlängerung einen Haftapparat dar. Es kommt zu keiner starken Kontraktion des Tieres bei Störung, die Tiere krümmen sich lediglich leicht sichelförmig nach ventral.

Die für diese Gruppe typische sechs-gliedrige Radula (3.0.3) zeigt keine Dentikel an den inneren Lateralzähnen, sondern einen glatten Rand (Salvini-Plawen, 1973).

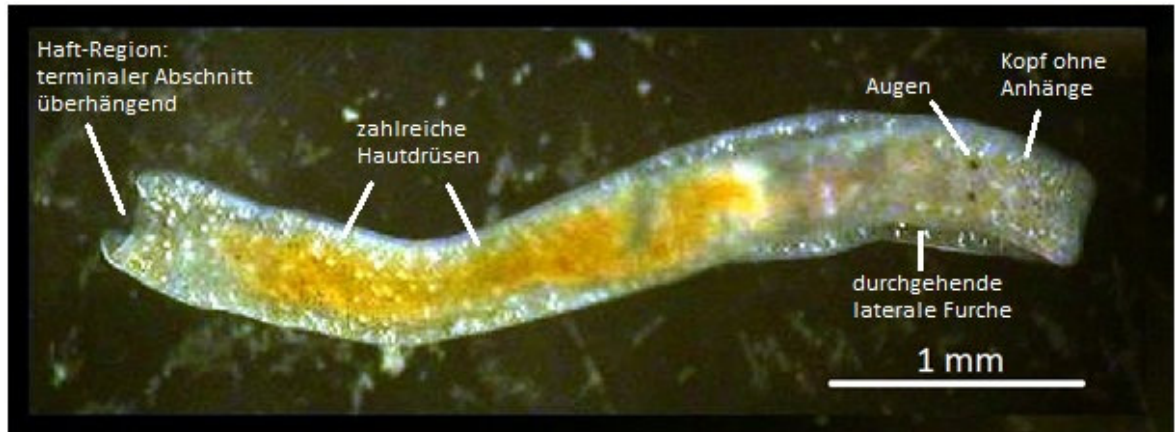


Abbildung 2. Habitus von *Philinoglossa praelongata*

1.1.6.2 Reproduktion

Als euthyneure Gastropode ist *Philinoglossa praelongata* hermaphroditisch. Salvini-Plawen (1973) stellte fest, dass die Gonaden im gesamten postoesophagealen Körper bis zum Nierenorgan vorzufinden sind, wobei links die Eifollikel und rechts die Samenfollikel vorzuliegen scheinen. Swedmark (1968) erwähnte, dass es noch weitgehend unklar ist, wie die Befruchtung bei den Philinoglossiden erfolgt. Sowohl Spermatophoren als auch Kopulation wurden bereits bei einigen interstitiellen Gastropoden-Arten beobachtet. Bei den Spermatophoren handelt es sich um Samenpakete, welche der Übertragung von Spermatozoen dienen. Sie werden an ein zu befruchtendes Individuum am Visceralsack angeheftet. Nach einigen Tagen entleeren sich die Spermatophoren und die Spermien dringen durch die Haut des zu befruchtenden Tieres. Bei Tieren mit einer geringen Produktion an Gameten sind Spermatophoren eine sichere Garantie zur Befruchtung (Swedmark 1968).

Einige Zeit nach der Befruchtung werden von den Philinoglossiden ca. 50 Eier in kreisförmige, transparente, gelatinöse Kokons gelegt, welche an Sandkörnern angeheftet werden. Die Eier weisen die typischen Furchungs-Stadien auf, und entwickeln sich letztlich jeweils in eine Veliger Larve (mit Schale). Die Larve ist denen anderer interstitieller Gastropoden sehr ähnlich, z.B. den Acochlidia, unterscheidet sich aber von ihnen durch die schwarze Larval-Niere (Swedmark 1968). Interstitielle Organismen besitzen eine kleine Anzahl an Zellen zur Produktion von Gameten, daher ist die Ei-Zahl

oft auch sehr gering. Die Larven interstitieller Organismen tendieren zu einem stationären Larvenstadium (geringe photische Reaktion, relativ geringe Entwicklung von larvalen Lokomotions-Organen, kurze oder keine frei-schwimmende Phase). Dies wirkt einer Verbreitung der Larve entgegen, und behält die meisten der Larven innerhalb des Areals der Population (Swedmark 1968). Swedmark (1968) wies auch darauf hin, dass die Reproduktionsbiologie der Philinoglossidae den Acochlidia in ihrer Charakteristik sehr ähnlich ist.

1.1.6.3 Geographische Verbreitung

Philinoglossa praelongata bewohnt vorwiegend detritusärmere Grobsande mit hohem Schellanteil. Weit verbreitet liegen solche Sande im Küstengebiet bei Livorno (Salvini-Plawen, 1973) sowie an der nordadriatischen Küste vor. Bisher beschriebene Fundorte waren an der italienischen Küste bei Livorno (Secche della Meloria, Bucht von LaSpezia) (Salvini-Plawen und Sterrer 1968), und an der kroatischen Küste bei Rovinj/Istrien (Punta Croce, Due Sorelle) (Salvini-Plawen, 1973). Weiters wurde *Ph. praelongata* im Mittelmeer bereits bei Süd-Spanien (la costa de Murcia y Almería; Salvini-Plawen & Templado, 1990) und in der Nord-See bei Schweden (Skagerrak, Poizat, 1991) gefunden. *Ph. praelongata* ist eine sowohl im Mittelmeer, als auch im Nordost-Atlantischen Ozean weit verbreitete Art (Gofas et al, 2001; Medin, 2011).

1.2 Der interstitielle Lebensraum

Marine litorale und sublitorale Sedimente bilden, entlang von Küstenlinien, wichtige Habitate für das oberflächlich lebende Epipsammon, das grabende Endopsammon, und auch für das meiobenthische Mesopsammon des feinen Lückenraumsystems (Ott, 1996). Das marine Mesopsammon ist ein interstitieller Porenraum zwischen Sandkörnern und repräsentiert den Lebensraum einer sehr diversen Lebensgemeinschaft hochspezialisierter Taxa. Beinahe alle Phyla sind im marinen Sandlückenraum vertreten, darunter u.a. Arthropoda (Copepoda, Ostracoda), Ciliata, Plathelminthes (Turbellaria), Nematoda, Annelida (Polychaeta), Gastrotricha, und Mollusca (Gastropoda). Unter den Gastropoden trifft man am häufigsten Arten der Gruppen Acochlidia und „Opisthobranchia“ an (Salvini-Plawen, 1973). Diese Artengemeinschaft wird als Mesopsammon bezeichnet und gehört zu der Größenklasse der Meiofauna (300µm bis 3mm) (Swedmark, 1964, 1968). Einige meiofaunale Organismen (Crustacea, Mollusca, Annelida etc.) fressen Mikroalgen und Bakterien indem sie die Oberfläche von

Sandkörnern abweiden (Swedmark, 1964; Veit-Köhler et al., 2010). Sie tragen durch den Abbau von organischen Substanzen zur Remineralisierung bei und setzen so wichtige Nährstoffe (z.B. Stickstoff, Spurenelemente) wieder frei (Veit-Köhler et al., 2010).

Aufgrund turbulenter Strömungen wie z.B. Wellenbewegungen, kommt es zur kontinuierlichen Modifikation der Sandoberfläche, und damit der Habitat-Struktur (Swedmark, 1964, 1968; Ott, 1996). Dies macht das interstitielle System zu einer sehr dynamischen Umgebung und führt zu mechanischem Stress (Swedmark, 1964). Korngröße, Form und Sortierungen bilden die wichtigsten Charakteristika dieses Habitats. Gut sortierte Sedimente sind sehr uniform in ihrer Korngröße. Von großer biologischer Bedeutung ist die Sediment-Permeabilität (Maß des Wasserdurchsatzes durch den Porenkörper bei Wirkung von hydrostatischem Druck). Die Permeabilität steigt mit dem Sortierungsgrad und dem Quadrat der Korngröße an und bestimmt den Transport von Nährstoffen, organischen Material und gelösten Gasen. Der Wasserdurchfluss bestimmt u.a. den Chemismus des Porenwassers und damit die Lebensbedingungen der Sediment-Bewohner (Ott, 1996). *Phoronoglossa praelongata* benötigt einen großen Porenraum und lebt daher vor allem in Grob-Sedimenten, welche eine Korngröße von 0,63 mm bis 2 mm aufweisen (Ott, 1996). Im Vergleich zu nah verwandter Taxa, deren Gestalt in anderen Lebensräumen keineswegs so ausgebildet ist, gibt es beim Mesopsammon oft starke Abwandlungen: Zwergformen (z.B. Gastropoden, Polychaeten), Maximierung der Körpergröße (z.B. Ciliata), langgestreckte Körperform (z.B. Gastropoden, Harpacticiden), Ortsbeweglichkeit bei sonst sedentären Gruppen (z.B. Hydropolypen, Bryozoen, Ascidien), starke Haftorgane zum Anheften an Sandkörner bei Sediment-Verfrachtung (Turbellarien, Gastropoden, Gastrotrichen), Tastborsten und Statocysten als Sinnesorgane (Ott, 1996). Eingelagerte Spikel, epidermale Drüsen, sowie die Fähigkeit zur starken Kontraktion sind Adaptationen an die mechanische Belastung in hochmobilen Sandlebensräumen (Swedmark, 1964). Als Folge der Verzweigung ist die Zahl der Gameten sehr gering. Als Anpassung an die geringe Zahl an Geschlechtszellen findet man verschiedenste Mechanismen zur Sicherung des Fortpflanzungserfolgs wie Hermaphroditismus, innere Befruchtung, Spermatophoren, Brutpflege und das Fehlen von pelagischen Stadien in der Reproduktionsbiologie mesopsammaler Organismen vor (Ott, 1996).

1.3 Populationsgenetik

Die Populationsgenetik untersucht Vererbungsvorgänge innerhalb biologischer Populationen (Campbell & Reece, 2003). Eine Population ist definiert als lokal begrenzte

Gruppe von Individuen, die derselben Art angehören. Eine Art wird definiert als Gruppe von Populationen, die sich in der Natur potentiell untereinander fortpflanzen können. Arten haben bestimmte geographische Verbreitungen. Innerhalb dieses Verbreitungsgebiets kommt es zu Konzentrationen lokal begrenzter Populationen. Oft kann ein dichtes Populationszentrum fließend in ein zweites übergehen, ohne scharfe Grenzen, wodurch es auch zu regelmäßigen Genaustausch kommen kann. Es ist aber auch möglich, dass es zu einer Isolation von zwei oder mehr Populationen kommt, womit fast kein Genaustausch mehr möglich ist (z.B. geographisch getrennte Populationen auf getrennten Inseln, Gebirgszügen, oder Seen). Solche geographische Barrieren können zur Entstehung neuer Arten führen (allopatrische Artbildung) (Campbell & Reece, 2003).

Der Begriff Genpool einer Population definiert den Gesamtbestand an Genen einer Population zu einem bestimmten Zeitpunkt. Ein Allel ist eine mögliche Ausprägung eines Gens an einem bestimmten Genort des Chromosoms. Häufig gibt es zwei oder mehrerer Allele für ein Gen, von denen jedes in einer relativen Häufigkeit (Allel-Frequenz) im Genpool vorkommt. Ein Genpool besteht aus allen Allelen aller Genorte aller Individuen einer Population (Campbell & Reece, 2003). Individuelle DNA Sequenzen werden in Haplotypen eingeteilt. Ein Haplotyp ist eine bestimmte Variante einer Nukleotidsequenz auf ein und demselben Chromosom im Genom eines Lebewesens. Jede Haplogruppe enthält ein Set von Haplotypen, welche vom selben gemeinsamen Ancestor abstammen (Hart, 2004; The International HapMap Consortium, 2003).

Zu Vergleichszwecken für Evolutionsstudien wurde das Hardy-Weinberg-Gesetz beschrieben, dass den Genpool einer nicht evolvierenden Population betrachtet (Campbell & Reece, 2003). Wenn die Allelfrequenz unverändert bleibt, ist die Population im Gleichgewicht, und evolviert nicht. Evolution ist eine Abweichung von diesem Gleichgewicht. Die sexuelle Vermischung der Allele bei der Meiose wirkt sich nicht auf den gesamten Genpool der Population aus. Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gesetz, und damit von der Stabilität eines Genpools, führt in der Regel zu Evolution. Evolution auf Populationsebene (Mikroevolution) wird definiert als der Wandel in den Allelfrequenzen von Generation zu Generation. Hauptursachen für Mikroevolution (also die Veränderung der Allelfrequenzen einer Population) sind genetische Drift, Selektion, Genfluss und Mutationen. Genfluss wird definiert als genetischer Austausch aufgrund von Wanderung fruchtbarer Individuen oder Gameten zwischen Populationen. Durch Genfluss kann eine Population Allele dazubekommen oder verlieren. Die Unterschiede zwischen Populationen werden durch Genfluss tendenziell verringert. Genetische Variabilität tritt sowohl innerhalb, als auch zwischen Populationen auf. Je geringer der Genfluss, desto höher die genetische Variabilität zwischen Populationen. In der Populationsgenetik wird

die genetische Variabilität unter anderem auf molekularer Ebene der DNA gemessen (Nukleotiddiversität). Dabei werden Nukleotidsequenzen von DNA-Proben mehrerer Individuen von einer oder mehreren Populationen miteinander verglichen und analysiert (Campbell & Reece, 2003).

1.4 Ziele dieser Studie

In dieser Studie wird die genetische Variabilität geographisch weit getrennter Populationen der interstitiellen *Philinoglossa praelongata* untersucht. Dazu wurden Individuen dieser Art an vier Standorten an der nordadriatischen Küste und an der Nord-, sowie Südwestküste Italiens gesammelt. Anschließend wurden molekular phylogenetische und statistische Analysen und Koaleszenzanalysen basierend auf zwei mitochondrialen Genen (16S rRNA und CO1) durchgeführt. Aufgrund des geringen Ausbreitungspotentials dieser weit verbreiteten Schnecke, kann angenommen werden, dass die genetische Differenzierung zwischen weit distanzierten Populationen sehr hoch ist. Dennoch ergab eine vorhergehende Studie der interstitiellen Gastropode *Pontohedyle milaschewitchii* (Kowalevsky, 1901) (Acochlidia) keine Bestätigung für eine hohe genetische Variabilität von weit getrennten Populationen im nördlichen Mittelmeer (Werth, 2008). Sollten andere Meiofaunataxa ähnliche Muster der genetischen Differenzierung zeigen, wie *P. milaschewitchii* (Werth, 2008), könnte dies das Ergebnis eines gemeinsamen zugrundeliegenden Prozesses sein. Sollte die genetische Variabilität größer sein, als bei *P. milaschewitchii*, stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse dieser Studie einen Hinweis auf die Präsenz zweier kryptischen Arten geben.

2 Material und Methoden

2.1 Datensammlung

2.1.1 Probenahme

Insgesamt wurden 186 Individuen an vier verschiedenen Standorten gesammelt: An der italienischen Küste (Tyrrhenisches und Ligurisches Meer) und an der kroatischen Küste (Adriatisches Meer) (Abbildung 3). An der gesamten Ostküste Italiens, sowie an vielen Standorten nahe Neapel, konnten keine Individuen gefunden werden. Genauere Angaben zu Standort, Anzahl und Kodierung der gefundenen Tiere werden in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2. Anzahl der gesammelten Individuen pro Standort, Koordinaten und Namen der Standorte, Tiefe der Probenahmen und Kodierung der Proben.

Land	Meer	Ort	Standort	Tiefe	Anzahl	Kodierung
Italien	Ligurisches Meer	Livorno/Pisa	Marina di Pisa: 43°66'74.99"N,10°27'54.1"O	2-4 m	37	L3, L8
	Tyrrhenisches Meer	Neapel	Agnone: 40°21'56.85"N,14°99'38.88"O	2-4 m	3	N37, N40
			Meta (Strada Statale Della Penisola sorrentina) 40°64'74.99" N 14°40'56.06" O	3-4 m	0	
			Marina del Cantone 40°58'33.06" N 14°35'79.26" O	4-8 m	0	
			40°46'41.89" N 14°91'45.13" O	3 m	0	
			Viale mare cristallo 40°66'05.22" N 14°41'60.29" O	3-5 m	0	
			Marina diaequa 40°39'34" N 14°24'54" O	3-4 m	0	
	Adria	Peschici	41°94'62.29" N 16°00'16.69" O	2-3 m	0	
			Vico del Gargano 41°94'07.23" N 15°94'14.77" O	1-2 m	0	
			Lungo-mare Lido del sole 41°96'66.38" N 15°85'71.62" O	1-2 m	0	
			San Nicandro Garganico 41°92'57.81" N 15°55'30.93" O	2-3 m	0	
			Vieste 41°86'72" N 16°18'45.21" O	2-3 m	0	
			Giovinazzo 41°19'59.65" N 16°65'00" O	1-3 m	0	

		Lungomare marina Italiana; Giovanazzo	41°19'10.89" N 16°66'94.71" O	6 m	0	
		Margherita di Savoia	41°39'19.42" N 16°12'28.51" O	3-4 m	0	
Kroatien	Adria	Insel Pag	Lun: 44°69'32.24"N,14°73'30.57"O	1-4 m	31	P14, P35, P44, P54, P64
	Adria	Rovinj	Vestar: 45°04'70.26"N,13°68'08.29"O	2-4 m	} 115	ROV
			Punta Croce: 45°11'14.52"N,13°60'99.86"O	6-10 m		

Der Sand wurde mittels Schnorcheln in Kübeln gesammelt. Die Kübel wurden über Nacht stehen gelassen, sodass die Tiere, aufgrund von Sauerstoffzehrung, hinauf in die oberen Schichten des Sediments migrieren konnten. Danach konnte der Oberflächen-Sand mit einem Löffel abgeschöpft werden und mit seewasser-isotonischem Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) behandelt werden. Die Sand- $MgCl_2$ Mischung musste 10-20 min in einem Kolben einwirken, um die interstitielle Fauna zu betäuben. Durch kräftiges Schütteln des Kolbeninhaltes lösten sich die Tiere von den Sandkörnern. Schließlich musste die Flüssigkeit nun rasch durch Netze (150-250 μm Maschenweite) gesiebt werden, um dabei die Meiofauna zurückzubehalten. Mit Meerwasser gefüllten Spritzflaschen konnten die Tiere aus den Sieben in Petri-Schalen und kleinen Schüsseln gewaschen werden. Individuen von *Philineglossa praelongata* wurden mittels Binokular und Bestimmungsliteratur (Salvini-Plawen, 1973; Riedl, 1983) identifiziert und unter der Verwendung von Glaspipetten mit Gummisauger aussortiert. Konserviert wurden die Tiere in RNAlater® und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Konservierung wurde optimiert indem die RNAlater® Flüssigkeit ein- bis dreimal nach einer Einwirkungszeit von etwa 10-25 Minuten gewechselt wurde.



Abbildung 3. Beprobungs-Standorte von *Philinoglossa praelongata* im Mittelmeer. Die rot-strichlierte Linie stellt die Küstenlinien-Distanz von etwa 2260 km zwischen Kroatien und Nordwest-Italien dar. Graue Punkte stellen positive Funde dar, an den weißen Punkten wurden keine Individuen gefunden.

2.1.2 DNA Extraktion

Die Individuen wurden vor der Extraktion in destilliertem Wasser gewaschen und auf einem Papiertuch getrocknet. Aufgrund der geringen Größe der Individuen (2-4 mm), musste der gesamte Körper eines Individuums für die DNA-Extraktion eingesetzt werden. Ausgeführt wurde die Extraktion mit dem peqGOLD Tissue DNA Mini Kit (PEQLAB), nach einem modifizierten Kurzprotokoll des Herstellers. Statt dem mitgelieferten Elutionspuffer, verwendete ich doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O), um die DNA aus der Matrix der Säulen-Membran zu eluieren. Um eine höhere DNA-Konzentration zu erzielen, habe ich beim Elutions-Schritt die Proben mit höchster Geschwindigkeit (16.000xg) zweimal zentrifugiert (das erste Mal mit 70µl, das zweite Mal mit 30µl ddH₂O). Zusätzlich wurde

der QIAamp DNA Investigator Kit (QUIAGEN) ausgetestet, um eine höhere Elutions-Konzentration zu erzielen. Nach der Extraktion konnte die DNA-Konzentration mittels BioPhotometer (EPPENDORF) gemessen werden. Dabei schwankte die gemessene Konzentration zwischen 10 und 200 ng/µl.

2.1.3 PCR Amplifikation

Als molekulare Marker wurden die mitochondrialen Gene Cytochrom Oxydase Untereinheit 1 (CO1) und 16S ribosomale RNA (16S rRNA) verwendet. Die Primer für die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und für die Sequenzier-Reaktion, die in dieser Studie verwendet wurden, werden in Tabelle 3 aufgelistet. Für das CO1 Gen von *Philinolossa praelongata* wurden spezifische Primer konstruiert (CO1_new).

Tabelle 3. Verwendete Primer für die Amplifikation und Sequenzierung.

Gen-Region	Primer	Sequenz (von 5' zu 3'):
16S	16S2_F	CCG GTC TGA CTC ARA TCA TGT A
	16S2_R	CGC CTG TTT AHC AAA AAC AT
CO1	LCO	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G
	HCO	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA
	CO1_new_F	GAA TGT GAT GTG GAT TAG TCG G
	CO1_new_R	CCA GCA GGR TCA AAA AAT CTT G

Tabelle 4. Verwendete PCR Reagenzien.

	16S	CO1 new	LCO/HCO
PCR Komponenten	Volumen (µl)		
ddH ₂ O	7.7 - 17.2	7 - 17	6.5 - 15.5
5x MangoTaq™ Reaktions-Puffer	2.5	2.5	2.5
dntp's (bioline)	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂ Lösung	1	1,2	1,2
Primer F (0.1nmol/µl)	0.5 - 1	0.5	1
Primer R (0.1nmol/µl)	0.5 - 1	0.5	1
BSA (BioLabs)	0 - 1	0 - 1	-
MangoTaq™ Polymerase	0.3	0.3	0.3
extrahierte DNA	5 - 15	5 - 15	5 - 15

Die PCR wurde in 30 µl Volumina angesetzt und setzte sich zusammen aus 15-25 µl „Master-Mix“ (Komponenten werden in Tabelle 4 aufgelistet) und 5-15 µl extrahierte DNA (abhängig von der DNA-Konzentration). Zur Optimierung der PCR wurde BSA (Bovine Serum Albumin/100X) verwendet um Huminsäuren zu blockieren.

Die PCR-Protokolle werden in Tabelle 5 gezeigt. Ausgeführt wurde die PCR-Reaktion mittels folgender Thermocycler: „Mastercycler“ (Eppendorf), „T Professional Standard Thermocycler“ (Biometra) und „Primus 96 advanced“ (PEQLAB).

Tabelle 5. PCR und Sequenzierungs-Protokolle.

16S rRNA			
Stufe		Temperatur	Zeit
Einleitende Denaturierung		94°C	2 Min.
10 Zyklen	Denaturierung	94°C	45 Sek.
	Annealing	40°C	30 Sek.
	Extension	72°C	1 Min.
20 - 22 Zyklen	Denaturierung	94°C	45 Sek.
	Annealing	47°C	30 Sek.
	Extension	72°C	1 Min.
Finale Extension		72°C	7 Min.
CO1 new			
Stufe		Temperatur	Zeit
Einleitende Denaturierung		94°C	2 Min.
37 Zyklen	Denaturierung	94°C	30 Sek.
	Annealing	44.7°C	30 Sek.
	Extension	72°C	1 Min.
Finale Extension		72°C	7 Min.
LCO/HCO			
Stufe		Temperatur	Zeit
Einleitende Denaturierung		94°C	2 Min.
37 Zyklen	Denaturierung	94°C	30 Sek.
	Annealing	43.3°C	30 Sek.
	Extension		1 Min.
Finale Extension		72°C	7 Min.
Sequenzierung			
Stufe		Temperatur	Zeit
25 Zyklen	Denaturierung	96°C	20 Sek.
	Annealing	48°C	10 Sek.
	Extension	60°C	4 Min.

Mittels Gel-Elektrophorese wurde der Erfolg der PCR-Reaktion überprüft. Dafür wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit TAE-Puffer und Agarose- Pulver (PeqGOLD) hergestellt. Das flüssige Gel wurde mit 2µl Ethydiumbromid vermischt und in eine Gel-Wanne eingefüllt. 5µl der Proben wurden mit 1µl DNA Loading Dye (6XMassRuler, Thermo Science) vermischt und in die Gel-Taschen des abgekühlten Gels geladen. Zusätzlich wurden 3 µl des Markers (Thermo-Science, FastRuler Low Range DNA Ladder ,80-1031 Basen; MassRuler DNA Ladder, Low Range, 50-1500 Basen) neben den Proben geladen, um die Fragment-Länge zu kontrollieren. Das fertige Agarose-Gel wurde mit dem Transilluminator (UV-Dokumentations-System, PEQLAB) überprüft.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem peqGOLD Cycle-Pure Kit (PEQLAB). Dabei wurde genau nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Um jedoch eine höhere DNA-Konzentration zu erreichen, habe ich die Proben beim Elutionsschritt zweimal (70µl, 30µl) mit höchster Geschwindigkeit (16.000xg) zentrifugiert. Ebenso wie bei der Extraktion verwendete ich statt dem mitgelieferten Elutionspuffer, ddH₂O für die Elution der DNA-Fragmente aus der Säulenmatrix.

2.1.4 Sequenzierung

Für die Sequenzier-Reaktion wurde ein Gesamtvolumen von 10 µl pro Reaktion benötigt. Die Bestandteile und deren entsprechenden Volumina für die Reaktion sind in Tabelle 6 aufgelistet. Das eingesetzte Volumen des PCR-Produktes wurde abhängig von der Konzentration gewählt. Diese wurde entweder photometrisch bestimmt oder von der Leuchtstärke der Banden am Elektrophorese-Gel abhängig gemacht. Die für das Sequenzier-Programm verwendeten Konditionen werden in Tabelle 5 aufgelistet. Die Sequenzier-Reaktionen wurden mit dem ABI 3130x1 Kapillar-Sequenzierer analysiert.

Tabelle 6. Sequenzierungs-Reagenzien.

Komponenten	Volumen (µl)
Big Dye (v.3.1)	1
Primer F/R	1
PCR-Produkt	1 - 8
ddH ₂ O	0-7

2.1.5 Alignment

Die Sequenzen wurden mittels Blast-Suche am „NCBI Nucleotid BLAST search“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf ihre Ähnlichkeiten überprüft. Anschließend wurde das Chromatogramm der Sequenzen in Chromas Lite v. 2.01 (Technelysium Pty Ltd, 1998-2005) und Chromas Pro v.1.5 (Technelysium Pty Ltd, 2003-2009) überprüft und händisch im Alignierungs-Programm GeneDoc v.2.7 (Nicholas & Nicholas, 1997) editiert. Dazu wurden auch der Forward und Reverse Strang jeweils aligniert um dadurch einen Contig zu erhalten. Nachdem das komplette multiple Sequenz-Alignment im GeneDoc zusammengestellt worden war, konnte es mit der Software ClustalX v. 2.0.11 (Thompson et al., 1997) aligniert werden. Zusätzlich konnte eine 16S Sequenz von *Philinoglossa praelongata* von GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; gi_310751693; Jörger et al., 2010) verwendet werden. Dieses eine Individuum wurde im Zuge der Studie von Jörger et al. in Istrien (Kroatien, Adria) aufgesammelt. Für weitere Analysen wurden Dateien im Nexus-Format kreiert mit Hilfe der Konvertier-Software ForCon v. 1.0 (Raes J. & Van de Peer Y., 1999).

2.2 Genealogische Analysen

2.2.1 Daten-Sets und Partitionen

Es wurden insgesamt drei Nukleotid-Daten-Sets kreiert. Für die Single-Gene Analyse wurden ein „16S_rRNA“ Daten-Set und ein „CO1“ Daten-Set erstellt. Für das Daten-Set „Combined“ wurden beide Gene kombiniert.

Für CO1 wurde die 1., 2., und 3. Codon-Position partitioniert. Für Combined ergeben sich 4 Partitionen, welche die 3 Codon-Positionen und den nicht-kodierenden 16S Bereich umfassen. Außerdem wurde Combined auch mit 2 Partitionen durchgeführt, welche nur den nicht-kodierenden und den kodierenden Bereich umfassen. Um den offenen Leserahmen auszumachen, wurde das CO1 Alignment im Programm GeneDoc übersetzt in ein Protein-Alignment und entsprechende Trinukleotide der ersten Aminosäuren im Alignment wurden überprüft auf der „NCBI Taxonomy Homepage“ mit dem Invertebraten mitochondrialen Code (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/index.cgi?chapter=tgencode> s).

2.2.2 Distanzanalyse

Bei der Distanzanalyse wird die Anzahl an Nukleotid-Differenzen zwischen Sequenz-Paaren gezählt. Die paarweisen Differenzen (p-Distanzen) wurden mit PAUP* v.4.0b10 (Swofford, 2003) errechnet. Die resultierende p-Distanzmatrix jedes Daten-Sets wurde in SPSS v. 15.0 (SPSS Inc., 1989-2006) importiert und die Häufigkeitsverteilung der Distanzen graphisch in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Distanzanalyse wurde an allen vorhandenen Daten-Sets durchgeführt. Die Haplotypen wurden aus einem Neighbour-Joining Distanzbaum ermittelt, welcher mit PAUP* v.4.0b10 erstellt wurde. Identische Sequenzen wurden auch mit den paarweisen Distanzen der Taxa eruiert. Zusätzlich wurde ein Mann-Whitney U-Test mit SPSS durchgeführt, um die Signifikanz der Korrelation zwischen den genetischen p-Distanzen zu testen.

2.2.3 Substitutions-Modelle

Zur Bestimmung des jeweiligen Substitutions-Modells für Likelihood-Analysen, kam Modeltest v.3.7 (Posada & Crandall, 1998) zur Anwendung. Diese Software inkludiert den "Hierarchische Likelihood Ratio Test" (hLRT) und das "Akaike Information Criterion" (AIC), um das am besten passendste Evolutionsmodell zu ermitteln. Ausgewählt wurde für alle Analysen das Modell des Hierarchischen Likelihood Ratio Tests. Weiters konnten die Modelle noch zusätzlich mit Mr.Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) bestätigt werden. Alle Evolutionsmodelle für jedes Daten-Set und Partition werden in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7. Evolutionsmodelle für jedes Gen-Daten-Set und Daten-Partition.

Daten-Set (od. Partition)	Evolutionsmodell
16S / nicht-kodierend	HKY+G/ K81uf+G
CO1 / kodierend	HKY+G
Position 1	TrNef+G
Position 2	F81
Position 3	HKY+G
Combined	HKY+G

2.2.4 Maximum-Likelihood

Phylogenetische Analysen wurden mit der Software PAUP* v.4.0b10 durchgeführt an den Single-Gene Daten-Sets (16S rRNA und CO1) und am kombinierten Daten-Set

„Combined“ von beiden Genen. Für diese Analyse wurden nur einzigartige Haplotyp-Sequenzen verwendet (Tabelle 10). Für die Maximum Likelihood Analyse wurde ein vorher erstellter Parsimony Baum als Startbaum verwendet. Dabei wurden die Gaps als „missing“ (fehlend) in allen Daten-Sets behandelt. Die entsprechenden Evolutionsmodelle sind in Tabelle 7 aufgelistet.

2.2.5 Bayesian Inference

Die Bayesian Inference Methode wurde in dieser Studie angewandt, um daraus einen genealogischen Baum zu errechnen und um die Robustheit der Maximum-Likelihood Analyse zu testen. Die Analysen wurden mit dem Programm Mr.Bayes v.3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) durchgeführt. Dabei wurden sowohl die Einzel-Gen Daten-Sets 16S rRNA und CO1, als auch das Kombinierte Daten-Set „Combined“ beider Gene mit dieser Methode analysiert. Für das Kombinierte Daten-Set ergaben sich 2 Partitionen (kodierend und nicht-kodierend). Zusätzlich wurde das CO1 Daten-Set in 1., 2., und 3. Codon-Position (3 Partitionen) partitioniert und das kombinierte Daten-Set in 1., 2., 3. Codon-Position und der nicht-kodierende Bereich (4 Partitionen) (Siehe 3.2.1.). Entsprechende Evolutionsmodelle für jedes Daten-Set und für jede Partition werden in Tabelle 7 gezeigt. Die „Run“-Parameter aller Analysen waren 2 x 4 „chains“ für 5×10^6 Generationen. „Sample frequencies“ wurde bei 100 festgelegt. Das Burn-in wurde abhängig von der Ausgabe von Mr.Bayes gesetzt. Die resultierenden log Likelihood (lnL) Werte der Bäume wurden im Vergleich zu der Anzahl der Generationen in dieser Ausgabe-Datei dargestellt. Alle Bäume vor dem Erreichen des Plateaus der log Likelihoods wurden mit dem Burn-in Befehl verworfen und alle danach wurden zu einem Consensus Baum zusammengefasst. In der aktuellen Studie wurde das Burn-in bei den „Single-Genes“ 16SrRNA und CO1 auf 100 gesetzt und auf 540 beim kombinierten und bei den partitionierten Daten-Sets.

2.2.6 Netzwerk Analyse mit TCS – Statistische Parsimony

Die Software TCS v.1.21 (Clement et al., 2000) führt eine Schätzung von Gen-Genealogien von DNA-Sequenzen aus. Dafür wurde eine, in dieses Programm implementierte, statistische Parsimony Methode angewandt. Alle Netzwerk-Analysen dieser Studie wurden durchgeführt mit dem 16S rRNA-, dem CO1- und dem Combined-Daten-Set. Der Cutoff wurde auf der Grundeinstellung von 95% eingestellt. Gaps wurden

als „missing“ behandelt. Aufgrund der resultierenden nicht verbundenen Netzwerke des italienischen und kroatischen Daten-Sets, kam es zu einer Überlappung. Daher musste das italienische und kroatische Daten-Set jeweils getrennt analysiert werden. Außerdem wurden im 16S rRNA Daten-Set aufgrund zu großer fehlender Daten-Bereiche im Alignment die ersten 60 Basen und die letzten 9 Basen exkludiert. Im CO1 und Combined Daten-Set mussten folgende Sequenzen aus demselben Grund exkludiert werden: CO1: ROV_30, ROV_7, ROV_8, ROV_17 und P54_3; Combined: ROV_7, ROV_9 und P54_3.

2.2.7 Arlequin – Standard AMOVA

Arlequin v 3.11 (Excoffier et al., 2005) ist ein kombiniertes Software-Paket für populationsgenetische Daten-Analysen. Die Standard AMOVA (Analysis of Molecular Variance) schätzt Populationsindizes genetischer Strukturen, indem Informationen aus den Haplotypen, sowie auch deren Frequenzen verwendet werden (Excoffier et al., 1992).

Der „Minimum Spanning Tree“ (MST) wurde zwischen allen Haplotypen errechnet. Die genetische Struktur dieser Studie wurde ausgetestet, indem pro Daten-Set zwei Populations-Gruppen definiert wurden, die „Kroatien“-Gruppe und die „Italien“-Gruppe. Die Anzahl an hierarchischen Levels der Varianz-Analysen und die Art von Permutationen, hängen vom Daten-Typ, der genetischen Struktur, und der gewählten Einstellungsoptionen ab (Excoffier et al., 2005). Populationsspezifische F_{ST} Indices werden für die Populations-Summen errechnet, sowie auch für den paarweisen Populations-Vergleich. Die Anzahl der Permutationen wurde in dieser Studie auf 1000 eingestellt. Die errechnete Distanzmatrix basiert auf paarweise Distanzen. Zusätzlich werden die in der Population vorhandenen Haplotyp-Frequenzen geschätzt und es wurde nach gemeinsamen Haplotypen gesucht.

Mit dem „Fixation Index“ (F_{ST}) kann bestimmt werden, wie unterschiedlich Populationen zueinander sind, und in welchem Maß Genfluss zwischen den Populationen stattfindet (Wright, 1978). Je höher die F_{ST} -Indices, desto weniger Migranten pro Generation treten auf und desto eingeschränkter ist somit der Genfluss. Wenig genetische Differenzierung liegt nur dann vor, wenn die F_{ST} -Indices sehr niedrig sind. Mit steigendem F_{ST} Index, steigt auch der Grad der Differenzierung zwischen zwei Populationen an. Abhängig vom Betrag des Fixation Index, wird die Differenz von Populationen definiert von „very strong“ (sehr stark) bis „non“ (kein Unterschied) (Tabelle 8). Das Verhältnis zwischen der Anzahl der Migranten pro Generation (N_m) (in Bezug auf den Genfluss zwischen Kroatien und

Italien) und der molekulare Varianz zwischen Populationen wird mithilfe des F_{ST} -Index berechnet: $(N_m)_F = 0.5 * (1/F_{ST} - 1)$ (Wright, 1978).

Tabelle 8. Differenzierung von Populationen basierend auf dem F_{ST} -Wert (Wright, 1978)

Fixation-Index (F_{ST} -Wert)	Stufe der Populations- Differenzierung
0	keine
0 - 0.05	wenig
0.05 - 0.15	mäßig
0.15 - 0.25	stark
> 0.25	sehr stark

2.2.8 BEAST – zeitliche Bestimmung des Divergenzalters

Aufgrund des Fehlens von Fossil-Befunden von *Philinoglossa praelongata* wird versucht, mithilfe einer molekularen Uhr Das Divergenzalter der beiden „Populationen“ zu ermitteln.

Vorerst wurde eine Substitutionssättigungsanalyse durchgeführt, um zu testen, ob das CO1 Daten-Set eine signifikante Sättigung zeigt und ob es geeignet ist, um Molecular Clock Analysen durchzuführen. Die Berechnung der patristischen und der absoluten Distanzen wurde mit der Software PAUP* v.4.0b10 durchgeführt. Die Grafik wurde mit Excel erstellt. Die Berechnung und Erstellung der Grafik der Transitions- und Transversionsraten versus der Felsenstein 1984 (F84) Distanzen wurde mit dem Software Paket DAMBE 5.3.46 (Xia and Xie 2001) durchgeführt. Die lineare Regression wurde mit SPSS v. 15.0 berechnet.

Als molekulare Uhr wurde die Lognormal Relaxed Clock verwendet. Die Analysen wurden mit der Software BEAST 1.7.4 (Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees) (Drummond & Rambaut, 2007) mit einem partitionierten CO1-Daten-Set (1., 2., 3. Position) durchgeführt. Die Divergenz-Zeiten wurden von BEAST unter der Verwendung des HKY+G Modells geschätzt. Um die Speziation zu beschreiben wurde der Yule Process verwendet. Als Startbaum wurde ein UPGMA Baum gewählt. Idente Haplotypen Sequenzen wurden aus dem Daten-Set exkludiert. Ebenso wurden die Sequenzen ROV_7 und ROV_30 exkludiert.

Die Divergenz zweier unabhängig voneinander evolvierender Sequenzen, welche von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen, wird durch die Substitutionsrate r beschrieben, die sich an das Level der Aufspaltung annähert (Kondrashov et al., 2010). In dieser Studie wurden zwei verschiedene Koaleszenz-Analysen durchgeführt.

Um die zeitliche Einordnung des Divergenzereignisses zwischen den Taxa zu veranschaulichen, wurden für die erste Analyse die durchschnittlichen Sequenz-Divergenz-Raten von Marko (2002) herangezogen. Für jede Codon-Position wurde eine eigene Rate gesetzt (1. Position: 0,45%/Myr, 2. Position: 0,18%/Myr, 3. Position: 6,5%/Myr). Es handelt sich dabei um die gemittelten Substitutionsraten der drei Codon-Positionen aus Marko (2002). Die Länge der MCMC Kette wurde auf 20 Millionen Generationen gesetzt und alle 5000 Generationen gesampelt. Vier unabhängig voneinander generierte Bäume wurden mit dem LogCombiner v 1.7.4 (Rambaut & Drummond, 2002-2012b) kombiniert, um den effektiven Probenumfang zu erhöhen. Der LogCombiner war im Softwarepaket BEAST enthalten.

Für die zweite der beiden durchgeführten Analysen wurden als Kalibrationspunkte die vorgeschlagenen Divergenz-Zeiten von Jörger et al. (2010) gesetzt. Jörger et al. kalibrierten eine molekulare Uhr, welche die Divergenz-Zeiten für schalenlose Heterobranchia ohne fossile Überlieferung schätzte. Die Studie schlägt den Ursprung der Cephalaspidea im Mesozoikum vor ca. 105,16 Mya vor, wobei sich *Philinoglossa praelongata* vor ca. 53,82 Mya von *Scaphander lignarius* abgespalten haben müsste. Weiters wird der gemeinsame Ursprung der Euopisthobranchia und Panpulmonata auf 237,03 Mya geschätzt. Es wurden drei mesopsammale Schnecken als Außengruppen gewählt (NCBI - Genbank: *Philine exigua* (Cephalaspidea, Euopisthobranchia) (HQ168450; Jörger et al., 2010), *Scaphander sp.* (Cephalaspidea, Euopisthobranchia) (KC351573.1; Eilertsen & Malaquias, 2013), *Pontohedyle milaschewitchii* (Acochlida, Panpulmonata) (HQ168459.1, Jörger et al., 2010). Die Länge der MCMC Kette wurde auf 30 Millionen Generationen gesetzt und alle 1000 Generationen gesampelt.

Die Ergebnisse wurden mit Tracer v.1.5.0 (Rambaut & Drummond, 2003-2009) analysiert, und die von BEAST produzierten Samples von plausiblen Bäumen wurden mit dem Programm TreeAnnotator (Rambaut & Drummond, 2002-2012a) zusammengefasst (1. Analyse: burnin=40, 2. Analyse: burnin=80), um den am besten unterstützten Konsensus-Baum zu finden. Beide Programme waren im Softwarepaket BEAST inkludiert.

2.2.9 Visualisierung der Grafiken

Die sich aus den Analysen ergebenden Stammbäume und Netzwerke wurden mit der Software Treeview v.1.6.6 (Page R.D.M., 1996) visualisiert. Die Netzwerke der TCS-Analyse wurden als PostScript Dateien (.ps) gespeichert und in pdf-Dateien konvertiert. Dazu wurde der Neevia Dokument-Konverter verwendet (<http://docupub.com/pdfconvert/>).

Die BEAST-Bäume wurden mit der Software FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2006-2012) visualisiert.

Alle Bäume und Netzwerke wurden mit CorelDRAW X5 v.15.0.0.486 (Corel Corporation 2010) bearbeitet und als jpg-Datei gespeichert.

3 Ergebnisse

Die in dieser Studie gewonnenen mitochondrialen CO1-Sequenzen haben eine Länge von 560 Bp (Basenpaaren), und die 16S rRNA-Sequenzen sind 412 Bp lang. Somit ergibt sich für das kombinierte Daten-Set „Combined“ beider Gene eine Gesamtlänge von 972 Bp (Tabelle 9).

Für das 16S rRNA Daten-Set standen 62 Sequenzen zur Verfügung, wobei 36 davon die kroatische Population umfassten, und 26 die italienische. Für die CO1 Analyse konnten 57 Sequenzen gewonnen werden, 41 davon stammen von kroatischen Individuen, 16 von italienischen. Das Combined Daten-Set umfasste insgesamt 50 Sequenzen, davon waren 34 von kroatischen und 16 von italienischen Tieren gewonnen worden (Tabelle 9). Die Anzahl der Haplotypen pro Population und Daten-Set wird in Tabelle 9 gelistet.

Tabelle 9. Allgemeine Daten-Set Informationen über die Anzahl an Basenpaaren pro Sequenz-Daten-Set und Anzahl der Haplotypen pro Population. Abkürzungen der Standorte: Rovinj (=Rov), Istrien (=Ist), Pag, Livorno (=Liv), Neapel (N).

	16S rRNA					CO1			Combined		
Anzahl der Sequenzen	62					57			50		
Länge des Daten-Sets	412 Bp					560 Bp			972 Bp		
Population	Kroatien			Italien		Kroatien		Italien	Kroatien		Italien
Anzahl der Sequenzen	36			26		41		16	34		16
Haplotypen	15			13		39		15	33		15
Standorte	Rov	Ist	Pag	Liv	N	Rov	Pag	Liv	Rov	Pag	Liv
Sequenzen	31	1	4	23	3	37	4	16	30	4	16

Für die Phylogenetischen Analysen wurden nur einzigartige Haplotyp-Sequenzen verwendet, während idente Sequenzen ausgeschlossen wurden (Tabelle 10). Es konnten keine gemeinsamen Haplotypen zwischen den Populationen ermittelt werden.

Tabelle 10. Inkludierte und idente exkludierte Sequenzen für die phylogenetische Analyse.

16S rRNA	
Inkludierte Sequenz	Idente exkludierte Sequenzen
ROV_1	ROV_4, ROV_8, ROV_23, ROV_28, ROV_35
ROV_9	P44_1, P54_2, P54_3, ROV_2, ROV_6, ROV_14, ROV_16, ROV_18, ROV_24, ROV_25, ROV_26, ROV_36, ROV_31, ROV_33, GI310751693
ROV_17	ROV_20
L3_3	L3_10, L8_7
L3_14	L3_16
L8_3	L3_7, L3_8, L3_9, L3_11, L3_15, L3_17
L8_6	L3_4, L3_5, L8_5, N37_2
CO1	
Inkludierte Sequenz	Idente exkludierte Sequenzen
ROV_1	ROV_35
ROV_9	ROV_15
L8_6	L3_5
Combined	
Inkludierte Sequenz	Idente exkludierte Sequenzen
ROV_1	ROV_35
L8_6	L3_5

Das **Combined Daten-Set** besteht aus folgenden Haplotypen: Kroatien: P44_1, P62_2, P54_2, P54_3 und ROV_1 bis ROV_36. Italien: L3_2 bis L3_17 und L8_3, L8_5, L8_6. ROV_35 und L3_5 sind idente Sequenzen und wurden ausgeschlossen (Tabelle 10). Aufgrund des Fehlens der 16S rRNA oder CO1 Sequenz, mussten auch ROV_X, 12, 13, 19, 21, 37, und 38, sowie ROV_10 exkludiert werden.

Im **CO1 Daten-Set** ist zusätzlich zu den Haplotypen des kombinierten Daten-Sets noch ROV_X, 12, 13, 19, 21, 37, und 38 vorhanden. Exkludiert wurden die identen Sequenzen ROV15, 35 und L3_5 (Tabelle 10).

Im **16S Daten-Set** ist zusätzlich zu den Sequenzen des kombinierten Daten-Sets noch ROV_10 vorhanden. Außerdem enthält das 16S Daten-Set eine Sequenz aus der GeneBank (Jörger et al. 2010, gesammelt in Istrien) mit der Kodierung GI310751693. Zahlreiche idente Sequenzen wurden bei 16S exkludiert (Tabelle 10).

3.1 Verwandtschaftsanalysen

3.1.1 16S rRNA

Insgesamt bestand das 16S rRNA Alignment aus 62 Sequenzen mit einer Länge von 412 Bp, wovon 44 Positionen variabel waren, und 26 Positionen parsimony-uninformativ. Es gab 28 Haplotypen, 15 aus Kroatien und 13 aus Italien (Tabelle 9). Haplotypen, die mehr als einmal vertreten waren, werden in Tabelle 10 gelistet.

Alle Analysen des 16S rRNA Datensets zeigen zwei deutlich geographisch getrennte Kladen (Bayesian Analyse: PP=1.00 (Kroatien-Klade), PP=0.54 (Italien-Klade)) (Abbildungen 4A, 4C). Auch die TCS Netzwerk Analyse zeigt zwei nicht miteinander verbundene Haplogruppen-Netzwerke (die strichlierte Linie stellt dabei eine gedachte Verbindung zwischen den beiden ancestralen Haplotypen dar) (Abbildung 5).

Aufgrund der Konservativität des 16S Gens, resultieren die meisten Analysen in nur wenig aufgelöste Bäume innerhalb der Kladen (Abbildungen 4A, 4C). Vor allem der Bayesian Baum resultiert in einer Polytomie. Daher wurden in den 16S Bäumen auch keine Haplogruppen eingezeichnet.

Innerhalb der Kroatien-Klade zeigt die Maximum Likelihood (ML) Analyse (Abbildung 4A), die TCS Analyse (Abbildung 5) und der Minimum Spanning (MS) Baum (Abbildung 4C) die Gruppierung ROV_15 mit ROV_17. Ebenfalls clustert ROV_7 mit ROV_30 im ML-Baum (Abbildung 4A). Basal zur Kroatien-Klade befindet sich im ML-Baum sowie im MS-Baum (Abbildungen 4A, 4C) ROV_1. Nur die Netzwerk Analyse zeigt ROV_9 als ancestralen Haplotypen, während ROV_1 der Basis trotzdem sehr nahe steht (Abbildung 5).

Die Italien-Klade enthält eine häufig vorkommende Haplotypen-Gruppierung von N37_1 mit L3_3, L8_2, L8_1, L3_6 und L3_12 (Abbildungen 4A, 5), wobei letzteres auch oft mit L3_14 (Abbildungen 4A, 4C) clustert. Die einzelnen Haplotypen der TCS Analyse des 16S Daten-Sets unterscheiden sich nur in wenigen Nukleotidpositionen. Darum gibt es auch nur wenige unbeobachtete Haplotypen (Abbildung 5). Die basale Position innerhalb der Italien-Klade ist in den verschiedenen Analysen sehr unterschiedlich. Während L8_4 die basale Position im ML-Baum einnimmt, und N37_1 im MS-Baum (MS=Minimum Spanning) (Abbildungen 4A, 4C), gilt L8_6 in der Netzwerk-Analyse als ancestraler Haplotyp (Abbildung 5). L8_6 zeigt aber in allen Analysen eine sehr kurze Distanz zur Basis.

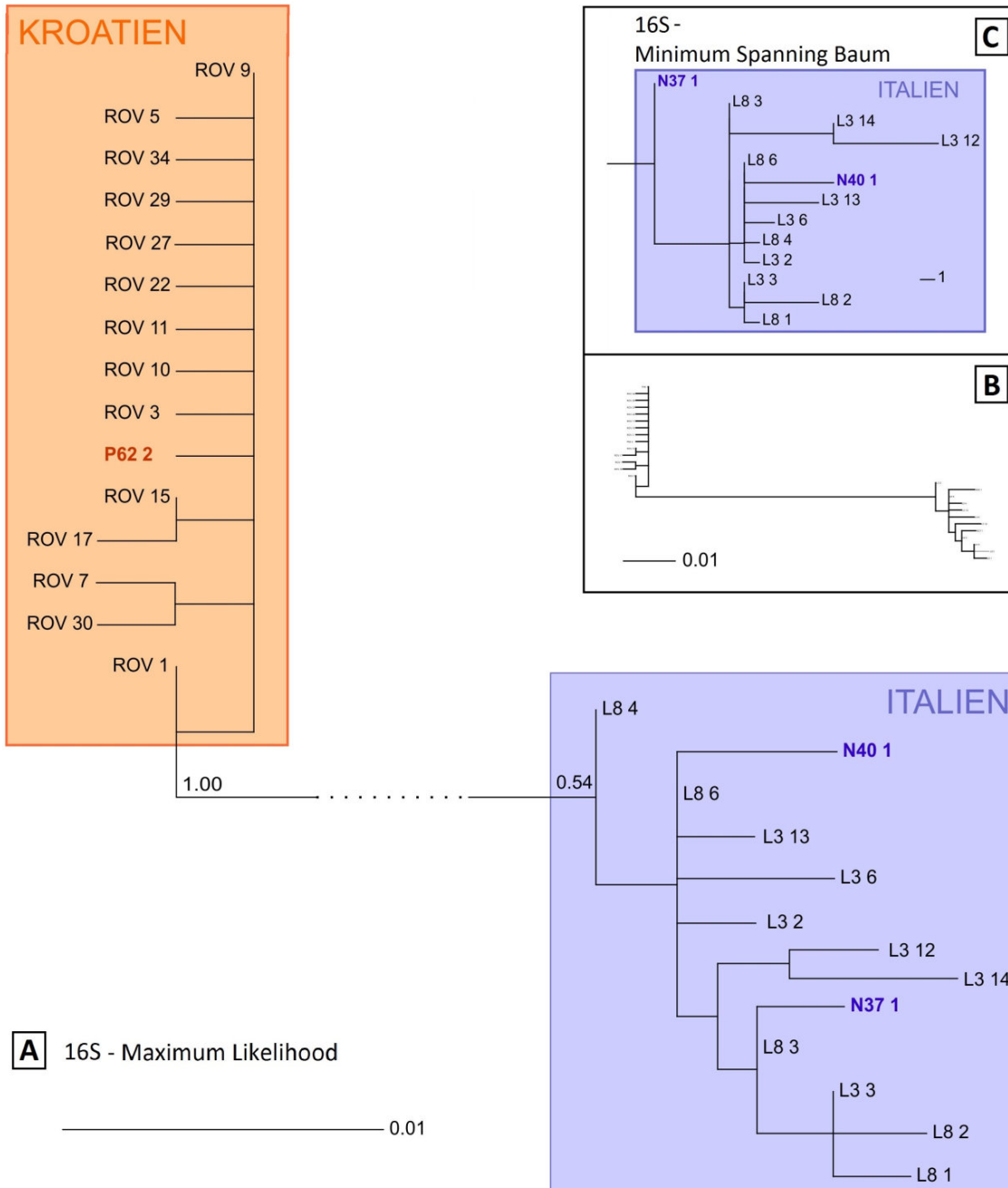


Abbildung 4. (A) 16S rRNA Maximum Likelihood Baum - mit Posterior probability (PP) Werten der Bayesian Analyse, Evolutionsmodell: HKY+G **(B) Übersicht des ML-Baumes** und **(C) 16S rRNA Minimum Spanning Baum** (Ausschnitt). Die orange unterlegte Klade bezieht sich auf die kroatische Population, die blaue Klade repräsentiert die italienische Klade. Alle Pag (P) und Neapel (N) gesammelten Individuen wurden farbig hervorgehoben. Idente Haplotypen Sequenzen wurden exkludiert (Tab.10).

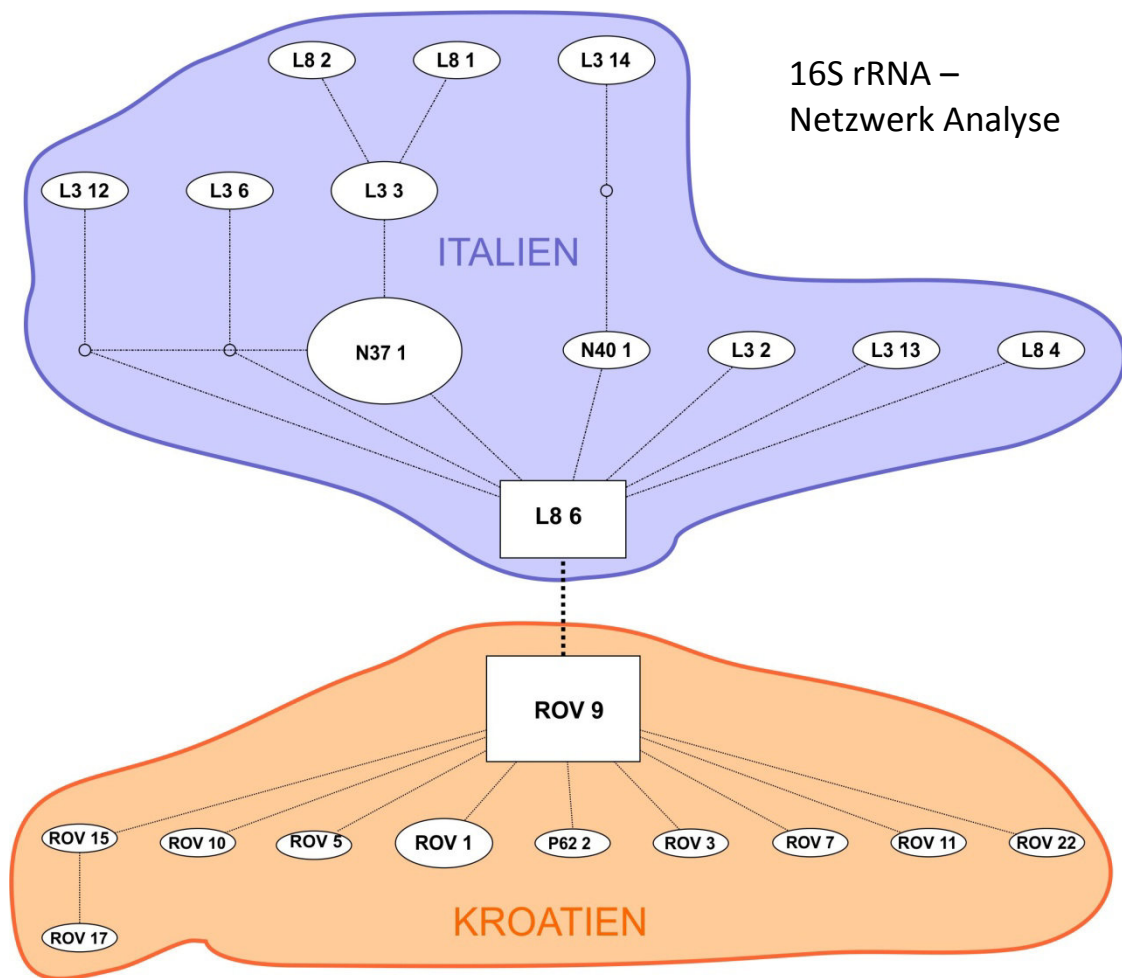


Abbildung 5. 16S rRNA TCS Analyse Netzwerk. Die orange unterlegte Klade bezieht sich auf die kroatische Population, die blaue Klade repräsentiert die italienische Klade. Die Analyse resultierte in zwei nicht miteinander verbundenen Haplogruppen-Netzwerken, die nachträglich mit einer strichlierten Linie an den ancestralen Haplotypen miteinander verbunden wurden. Ancestrale Haplotypen stehen innerhalb von Rechtecken. Knoten zwischen den Haplotypen repräsentieren unbeobachtete Haplotypen. Der Cutoff wurde auf 95% gesetzt.

3.1.2 CO1

Im Zuge dieser Studie konnten zum ersten Mal CO1 Sequenzen von *Philinoglossa praelongata* generiert werden.

Das CO1 Alignment bestand aus 57 Sequenzen mit einer Länge von 560 Bp, wovon 127 Positionen variabel waren, und 93 Positionen parsimony-uniformativ. Es gab 54 Haplotypen, davon waren 39 Haplotypen aus Kroatien und 15 aus Italien (Tabelle 9). Haplotypen, die mehr als einmal vertreten waren im Daten-Set, werden in Tabelle 10 gelistet.

Alle Analysen des CO1 Datensets zeigen zwei deutlich geographisch getrennte Kladen (Bayesian Analyse: PP=1.00 (Kroatien-Klade), PP= 0.68 (Italien-Klade)) (Abbildungen 6A,

6C). Die TCS Netzwerk Analyse resultiert ebenfalls in zwei unverbundene Haplogruppen Netzwerke (die strichlierte Linie stellt dabei eine gedachte Verbindung zwischen den beiden ancestralen Haplotypen dar) (Abbildung 7)

Aufgrund der Variabilität des CO1 Gens, resultieren einige Analysen in gut aufgelösten Bäumen (Abbildungen 6A, 6C). Die Bayesian Analyse zeigt eine Polytomie.

Zwischen den Aminosäure-Sequenzen gibt es so gut wie keine Unterschiede. Daher sind im CO1-Gen alles stille Substitutionen, die nicht in Änderungen der Aminosäure-Sequenz resultieren.

Die Kroatien-Klade zeigt in allen Analysen drei verschiedene Haplogruppen, sie wurden mit Kr1, Kr2 und Kr3 bezeichnet. Kr1 enthält P54_2, P54_3, P62_2, ROV_3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 19, 21, 38, X, Kr2 enthält ROV_2, 16, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 31 33, 34, 36, P44_1, und Kr3 enthält ROV_1, 4, 6, 8, 12, 13, 18, 20, 23, 24, 28, 37 (Abbildung 6A). Der Unterschied zwischen ML-Baum und TCS-Netzwerk ist, dass ROV_20 im TCS Netzwerk statt in Kr3 in Kr1 enthalten ist (Abbildung 7). Im Ausschnitt der ML-Analyse wurden die Gruppen nicht eingezeichnet, da es zu einigen Abweichungen kommt. Dabei stehen ROV_6, 18, 12 weit abseits vom Rest der Gruppe Kr3, die Gruppe Kr3 hingegen ergibt sich inmitten der Gruppe Kr2 (Abbildung 6C). Die am nächsten verwandte Sequenz zu Italien scheint noch unklar zu sein. An der Basis der ML-Analyse steht P44_1, während ROV_30 basal zur Kroatien-Klade der MS-Analyse steht (Abbildungen 6A, 6C). Das Netzwerk zeigt wiederum, dass ROV_9 den ancestralen Haplotypen darstellt (Abbildung 7). Die basale Haplogruppe ist in der ML-Analyse Kr2 und im Netzwerk Kr1 (Abbildungen 6A, 7).

Die Italien-Klade besteht aus zwei Gruppierungen, welche It1 und It2 benannt wurden. Eine davon umfasst L8_3, 5, 6, L3_2, 6, 13, 14 (It1), und die andere umfasst L3_7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17 (It2) (Abbildungen 6A und 7). Die Bayesian Analyse unterstützte die Gruppierung zwischen L3_15 und L3_17 mit PP=0.58. Basal zur Kroatien-Klade findet sich sowohl im ML-Baum, als auch im MS-Baum L3_16 wieder (Abbildungen 6A, 6C), während die TCS-Netzwerkanalyse L8_6 als ancestralen Haplotypen unterstützt (Abbildung 7). Die basale Haplogruppe ist in der ML-Analyse It2, und im Netzwerk It1 (Abbildungen 6A, 7).

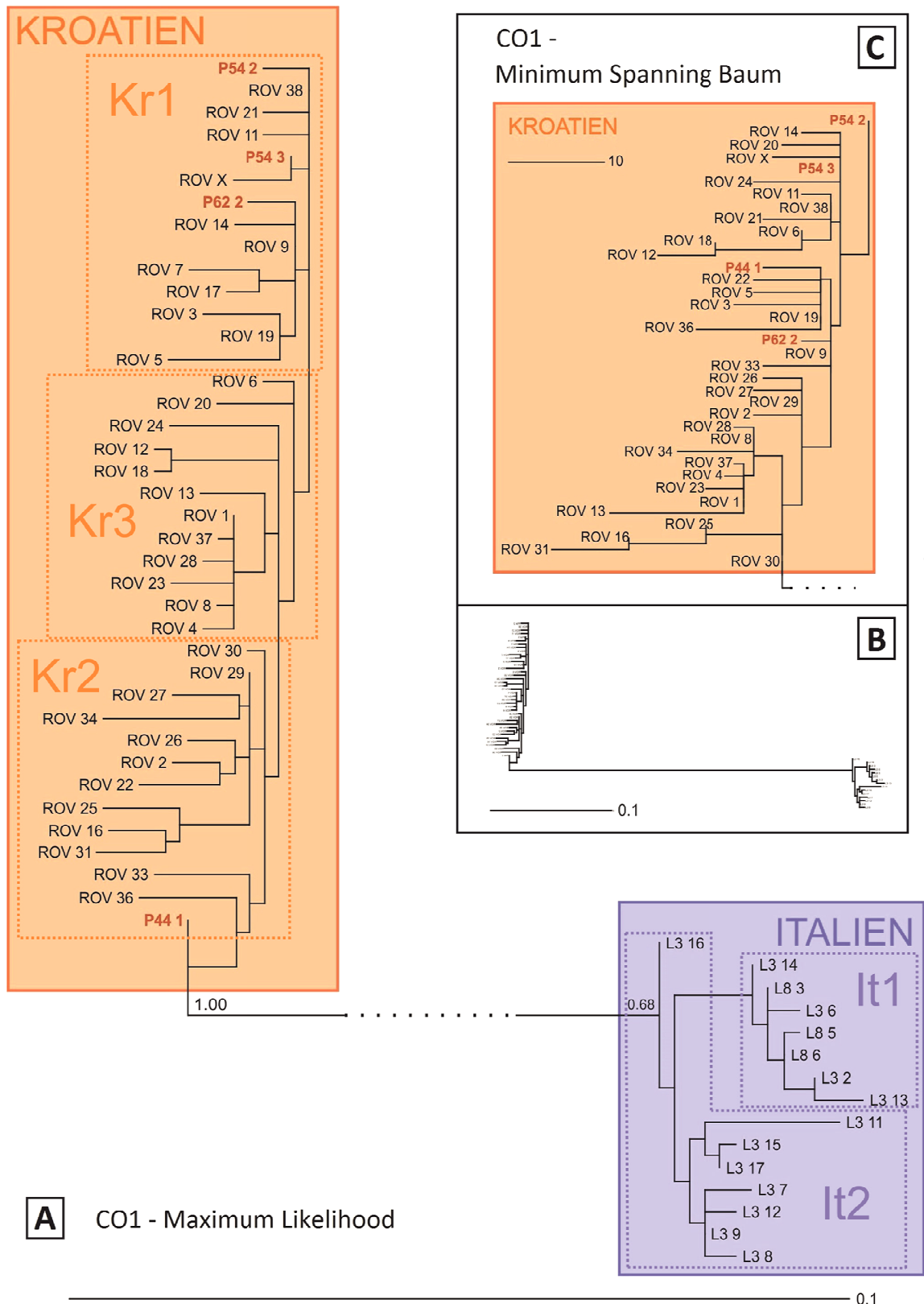


Abbildung 6. (A) CO1 Maximum Likelihood Baum - mit Posterior probability (PP) Werten der Bayesian Analyse, Evolutionsmodell: HKY+G **(B) Übersicht des ML-Baum** und **(C) CO1 Minimum Spanning Baum** (Ausschnitt). Die orange unterlegte Klade bezieht sich auf die kroatische Population, die blaue Klade repräsentiert die italienische Klade. Strichlierte farbige Linien umfassen mögliche Haplogruppen (Kr1, 2, 3, It 1, 2). Alle Pag (P) und Neapel (N) gesammelten Individuen wurden farblich hervorgehoben. Idente Haplotypen Sequenzen wurden exkludiert (Tab.10).

CO1 – Netzwerk Analyse

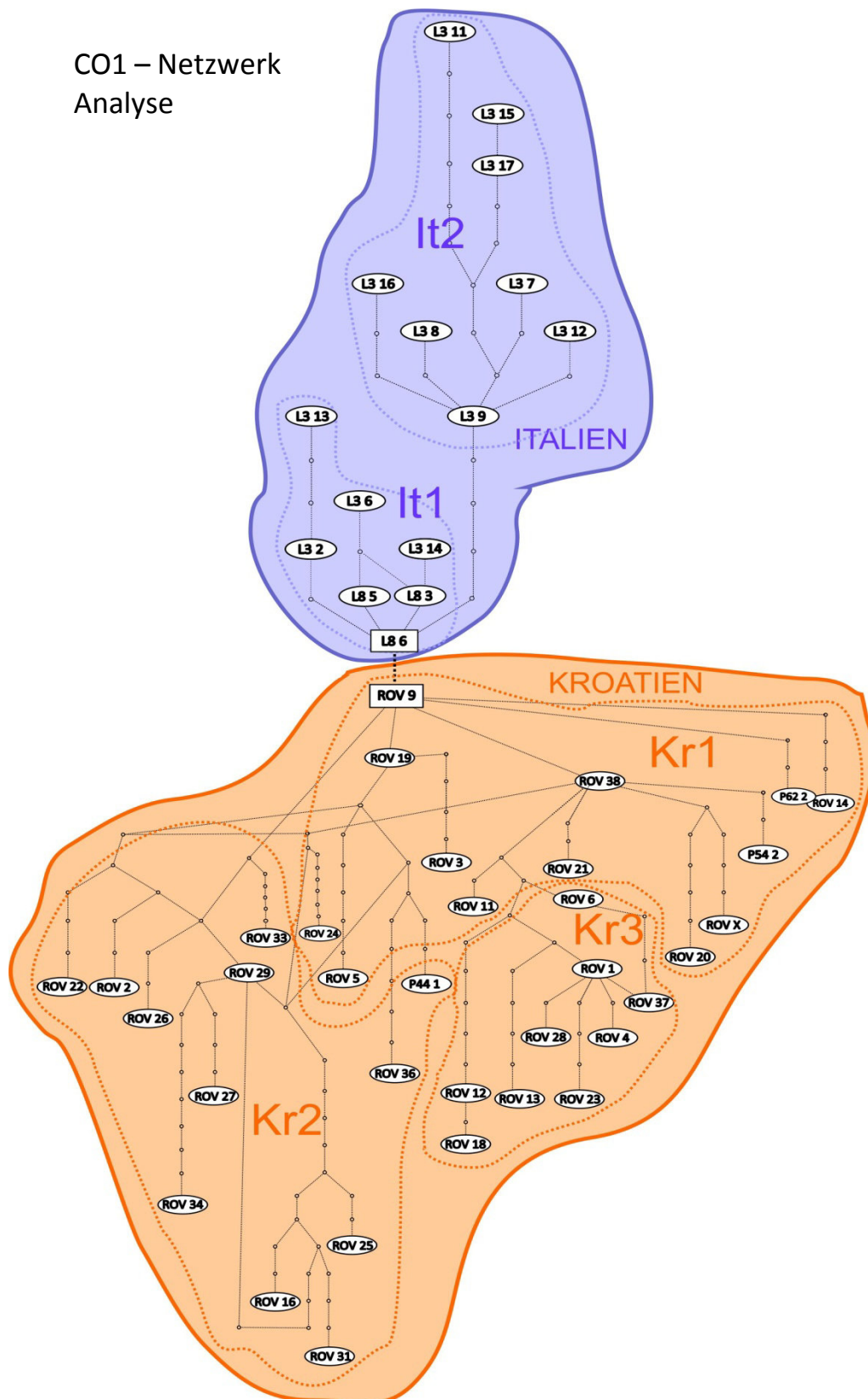


Abbildung 7. CO1 TCS Analyse Netzwerk. Die orange unterlegte Klade bezieht sich auf die kroatische Population, die blaue Klade repräsentiert die italienische Klade. Die Analyse resultierte in zwei nicht miteinander verbundenen Haplogruppen-Netzwerken, die nachträglich mit einer strichlierten Linie an den ancestralen Haplotypen miteinander verbunden wurden. Ancestrale Haplotypen stehen innerhalb von Rechtecken. Strichlierte farbige Linien umfassen mögliche Haplogruppen (Kr1, 2, 3, It 1, 2). Knoten zwischen den Haplotypen repräsentieren unbeobachtete Haplotypen. Der Cutoff wurde auf 95% gesetzt.

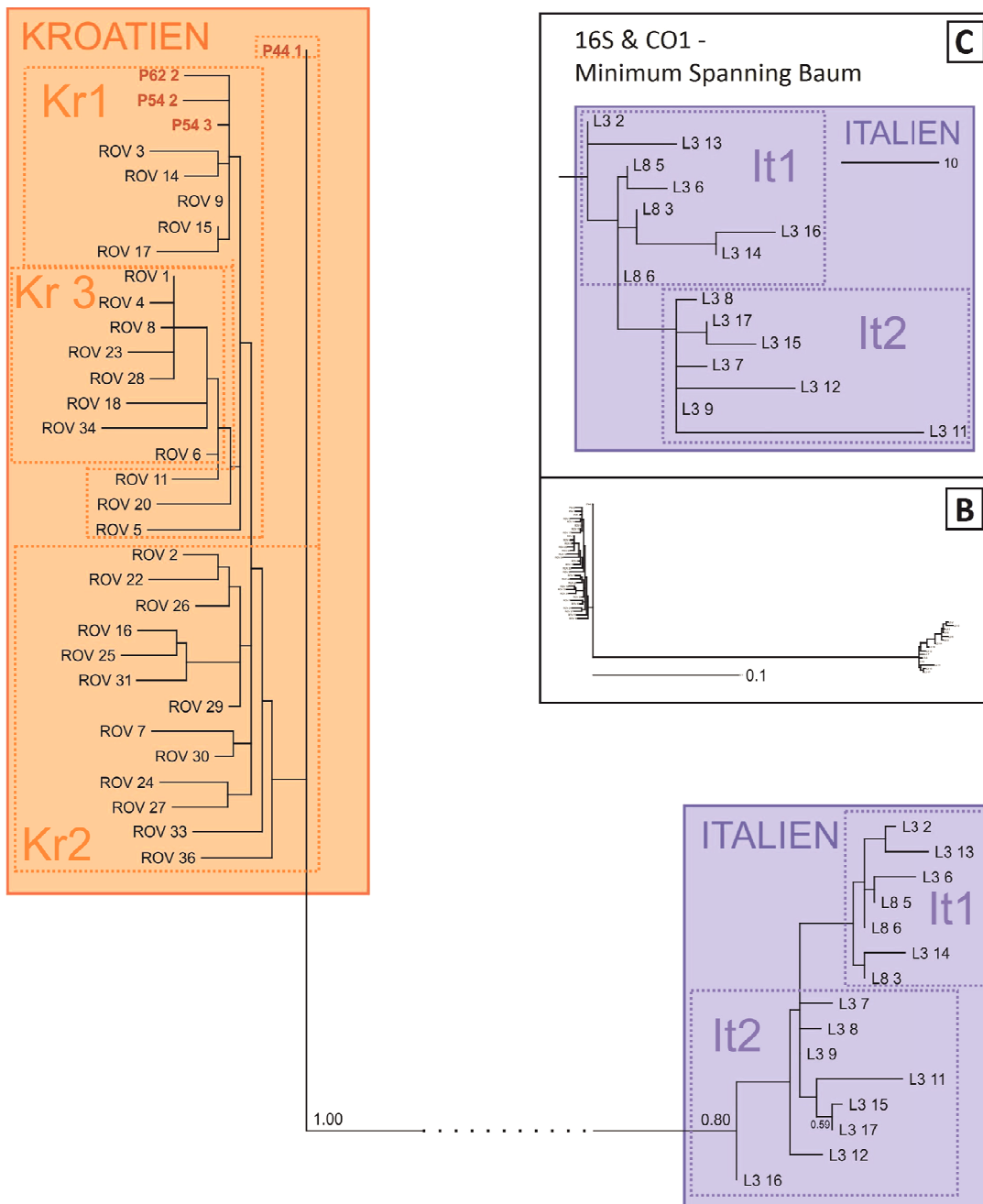
3.1.3 Combined (16S & CO1)

Das kombinierte Alignment beider Gene bestand aus 50 Sequenzen mit einer Länge von 972 Bp, wovon 161 Positionen variabel waren, und 114 Positionen parsimony-uniformativ. Es gab 48 Haplotypen. Aus Kroatien waren 33 Haplotypen und aus Italien 15 (Tabelle 9). Haplotypen, die mehr als einmal vertreten waren im Daten-Set, werden in Tabelle 10 gelistet.

Alle Analysen des kombinierten Datensets zeigen zwei deutlich geographisch getrennte Kladen (Bayesian Analyse: PP=1.00 (Kroatien-Klade), PP=0.80 (Italien-Klade)) (Abbildungen 8A, 8C). Außerdem besteht auch das TCS Netzwerk aus zwei nicht verbundenen Haplogruppen Netzwerken (die strichlierte Linie stellt dabei eine gedachte Verbindung zwischen den beiden ancestralen Haplotypen dar) (Abbildung 9). Die Bäume sind meist sehr gut aufgelöst bis auf die Bayesian Analyse welche eine Polytomie zeigt.

Die Kroatien-Klade zeigt drei verschiedene Haplogruppen in allen Analysen, die mit Kr1, Kr2, und Kr3 bezeichnet wurden. Kr1 enthält P54_2, P54_3, P62_2, ROV_3, 5, 9, 11, 14, 15, 17, 20, Kr2 enthält ROV_2, 7, 16, 22, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 36, P44_1, und Kr3 enthält ROV_1, 4, 6, 8, 18, 20, 23, 28 (Abbildung 8A). Basal zur Kroatien-Klade befindet sich in der ML-Analyse P44_1 (Abbildung 8A), und in der Netzwerk-Analyse ROV_1 (Abbildung 9). Die MS-Analyse zeigt wiederum ROV_20 als ursprünglichstes Individuum an in dieser Klade. Die basale Haplogruppe ist in der ML-Analyse Kr2 und im Netzwerk Kr3 (Abbildungen 8A, 9).

Innerhalb der Italien-Klade gehen in allen Analysen zwei Haplogruppen hervor, It1 und It2. It1 umfasst die Individuen L3_2, 6, 13, 14 und L8_3, 5, 6. Die zweite Gruppierung It2 besteht aus L3_7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17 (Abbildungen 8A, 8C, 9). In der Bayesian Analyse wird die nähere Verwandtschaft zwischen L3_15 und L3_17 mit einer PP von 0.59 unterstützt. Die Basis ist wiederum sehr unterschiedlich in den Analysen. Während L3_16 die Basis im ML-Baum ausmacht, steht basal der kroatischen Klade im MS-Baum L3_2 (Abbildungen 8A, 8C). Die Netzwerkanalyse zeigt wiederum L8_6 als ancestralen Haplotypen (Abbildung 9). Die basale Haplogruppe in der TCS- und MS-Analyse ist It1, und in der ML-Analyse It2 (Abbildungen 8A, 8C, 9).



A 16S & CO1 - Maximum Likelihood

Abbildung 8. (A) Kombierter 16S & CO1 („Combined“) Maximum Likelihood Baum - mit Posterior probability (PP) Werten der Bayesian Analyse, Evolutionsmodell: HKY+G. **(B) Übersicht des ML-Baum** und **(C) 16S & CO1 Minimum Spanning Baum** (Ausschnitt). Die orange unterlegte Klade bezieht sich auf die kroatische Population, die blaue Klade repräsentiert die italienische Klade. Strichlierte farbige Linien umfassen mögliche Haplogruppen (Kr1, 2, 3, It 1, 2). Alle Pag (P) und Neapel (N) gesammelten Individuen wurden farbig hervorgehoben. Idente Haplotypen Sequenzen wurden exkludiert (Tab.10).

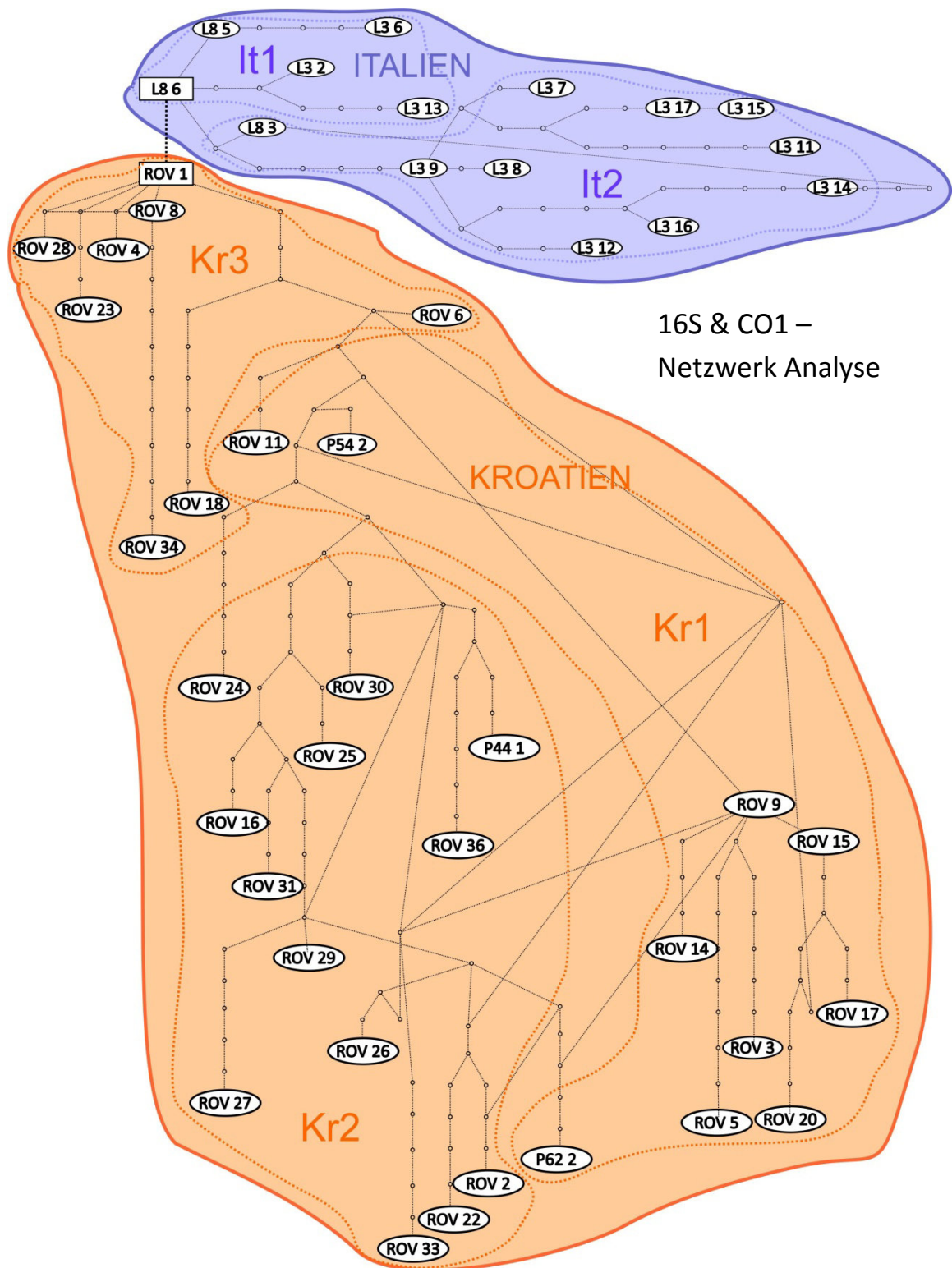


Abbildung 9. Kombiniertes 16S & CO1 („Combined“) TCS Analyse Netzwerk. Die orange unterlegte Klade bezieht sich auf die kroatische Population, die blaue Klade repräsentiert die italienische Klade. Die Analyse resultierte in zwei nicht miteinander verbundenen Haplogruppen-Netzwerken, die nachträglich mit einer strichlierten Linie an den ancestralen Haplotypen miteinander verbunden wurden. Ancestrale Haplotypen stehen innerhalb von Rechtecken. Strichlierte farbige Linien umfassen mögliche Haplogruppen (Kr1, 2, 3, It 1, 2). Knoten zwischen den Haplotypen repräsentieren unbeobachtete Haplotypen. Der Cutoff wurde auf 95% gesetzt.

3.2 Statistische Ergebnisse

3.2.1 AMOVA

Die in der AMOVA resultierenden populations-spezifischen F_{ST} Werte jedes Gen-Datensets werden in Tabelle 11 gelistet. Dabei wurden auch die durchschnittliche F_{ST} Indices der gesamten polymorphischen Loci jedes Datensets berechnet.

Tabelle 11 F_{ST} Indices jedes entsprechenden Datensets und Population. Die Analysen wurden durchgeführt mit Arlequin 3.1.

	16S rRNA	CO1	Combined
F_{ST} Kroatien	0,96208	0,91143	0,93455
F_{ST} Italien	0,96054	0,91217	0,93416
Durchschnitt	0,96168	0,91111	0,93430

Alle resultierenden F_{ST} -Indices liegen im Bereich von 0,911 bis 0,962 und deuten daher auf eine sehr hohe genetische Differenzierung hin. Die Anzahl der Migranten pro Generation beträgt 0,04 Migranten, errechnet nach Wright (1978) mit dem durchschnittlichen F_{ST} des kombinierten Daten-Sets.

Tabelle 12 SSD (Sum of Squares), Varianz-Komponenten und prozentueller Anteil der Variation, für jedes Daten-Set innerhalb und zwischen den Populationen.

16S rRNA			
	Zwischen Populationen	Innerhalb Populationen	Total
SSD	971.023	77.299	1048.323
Varianz Komponenten	32.11730	1.28832	33.40561
% von Variation	96.14	3.86	100
CO1			
	Zwischen Populationen	Innerhalb Populationen	Total
SSD	1267.167	285.633	1552.800
Varianz Komponenten	55.60719	5.38930	60.99649
% von Variation	91.16	8.84	100
Combined			
	Zwischen Populationen	Innerhalb Populationen	Total
SSD	1875.552	282.906	2158.458
Varianz Komponenten	87.62822	6.15014	93.77835
% von Variation	93.44	6.56	100

Mit der AMOVA Analyse konnte der prozentuale Anteil der Variation, bezogen auf die totale Varianz aller Daten-Sets, sowohl zwischen, als auch innerhalb der Populationen je Gen-Daten-Set bestimmt werden. Bei allen Datensets wird über 90% der totalen Varianz gebildet durch den Vergleich zwischen den Populationen, während weniger als 10% durch den Vergleich innerhalb der Populationen gebildet wird. Die genetische Variation

zwischen den beiden disjunkten Populationen ist somit sehr hoch, während innerhalb der Populationen nur wenig Variabilität vorherrscht (Tabelle 12).

3.2.2 Distanzanalyse

Die resultierenden paarweisen Distanzen wurden für jedes Gen-Daten-Set errechnet und die Häufigkeitsverteilung der Distanzen in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt. Bei allen drei Daten-Sets kommt es zu keiner Überlappung der beiden Bereiche (zwischen und innerhalb der Populationen) (Abbildung 10). Die paarweisen Distanzen des CO1 und kombinierten Daten-Sets wurden auch tabellarisch dargestellt (Tabellen 13, 14). Die 16S Distanzen liegen zwischen den beiden Populationen bei 5% bis 6,9%. Beim CO1 Gen liegen die prozentuellen Distanzen zwischen den Populationen bei 10,4% bis 14,1%. Und schließlich bei der kombinierten Analyse beider Gene liegen die Distanzen zwischen den Populationen bei 8,6% bis 10,1%. Die große Kluft zwischen intra- und inter-Populationen in allen drei Grafiken weist auf eine hohe genetische Variabilität zwischen den beiden Populationen hin, während innerhalb der Populationen eine sehr geringe Variation angezeigt wird (16S: 0 - 1,5%; CO1: 0 - 3,9%; kombiniert: 0 - 2%). Wie erwartet zeigt auch der Mann Whitney U-Test, dass die genetischen Distanzen innerhalb der Populationen hoch signifikant unterschiedlich sind, zu denen zwischen den Populationen ($p=0.000$).

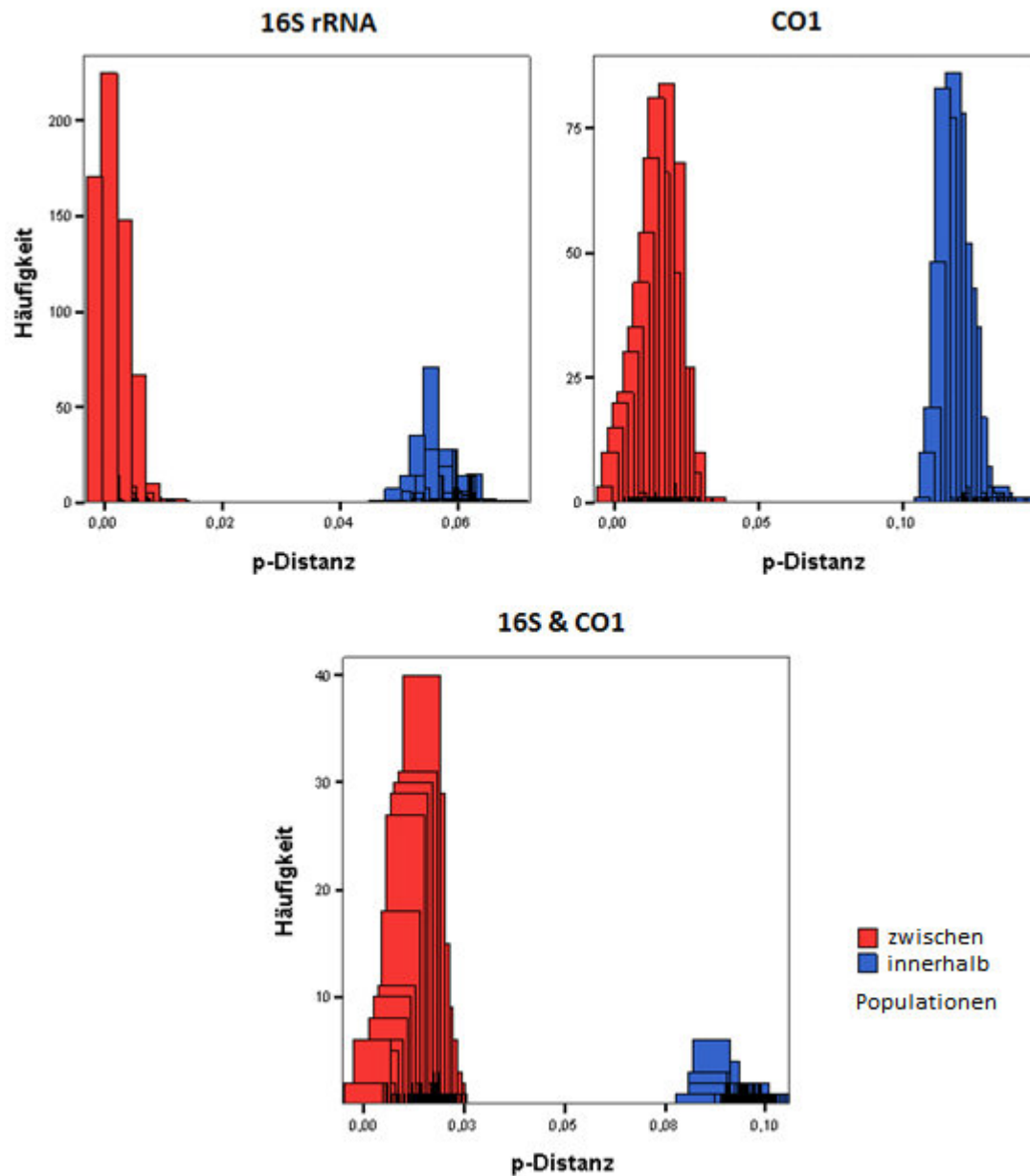


Abbildung 10. Prozentuale paarweise Distanzen aller Daten-Sets innerhalb der Populationen (rot) und zwischen den Populationen (blau).

[illegible]

Tabelle 13. Paarweise Distanzen des CO1 Daten-Sets

[illegible]

Tabelle 14. Paarweise Distanzen des 16S & CO1 Daten-Sets

3.3 BEAST - Koaleszenzanalyse

3.3.1 Substitutionssättigungsanalyse

In der Substitutionssättigungsanalyse werden unterschiedlich berechnete paarweise Distanzen miteinander verglichen. Es werden die absoluten Distanzen (Transitionen und Transversionen) und die patristischen Distanzen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 11). Patristische Distanzen sind ein Maß für die Zahl an evolutionären Schritten zwischen zwei Taxa. Abbildung 11 zeigt die mit PAUP* v.4.0b10 durchgeführte Sättigungsanalyse. Es ist eine deutliche Kluft zwischen den Paaren innerhalb der Populationen (links) und zwischen den Populationen (rechts) zu erkennen. Das Ergebnis der Analyse zeigt keinen signifikanten Grad der Sättigung, da die Datenpunkte (rot) deutlich entlang der Winkelhalbierung gruppiert sind.

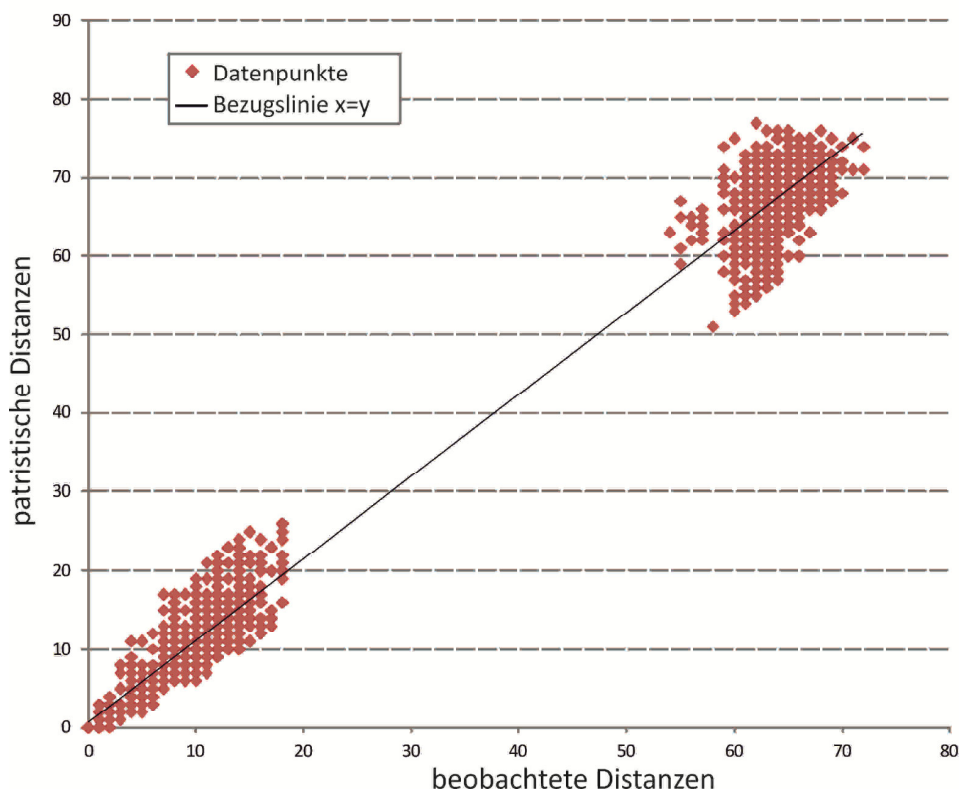


Abbildung 11. Substitutionssättigungsanalyse: Grafische Darstellung der Unterschiede zwischen den patristischen und beobachteten (absoluten) Distanzen des CO1 Daten-Sets.

Einen weiteren Hinweis für das Fehlen einer Substitutionssättigung gibt die lineare Regression der Transitionen- und Transversionsraten versus der modellberechneten F84 Distanzen (Abbildung 12). Je stärker die Korrelation, desto niedriger die Sättigung. Die Korrelation beträgt annähernd 1 (Transition: $R^2=0.997$, Transversion: $R^2=0.977$) und

weist daher auf das Fehlen von Sättigung im phylogenetischen Signal hin. Da die Anzahl der beobachteten Transitionen relativ zu der der Transversionen stets höher ist und kontinuierlich ansteigt, kann eine Substitutionssättigung ausgeschlossen werden.

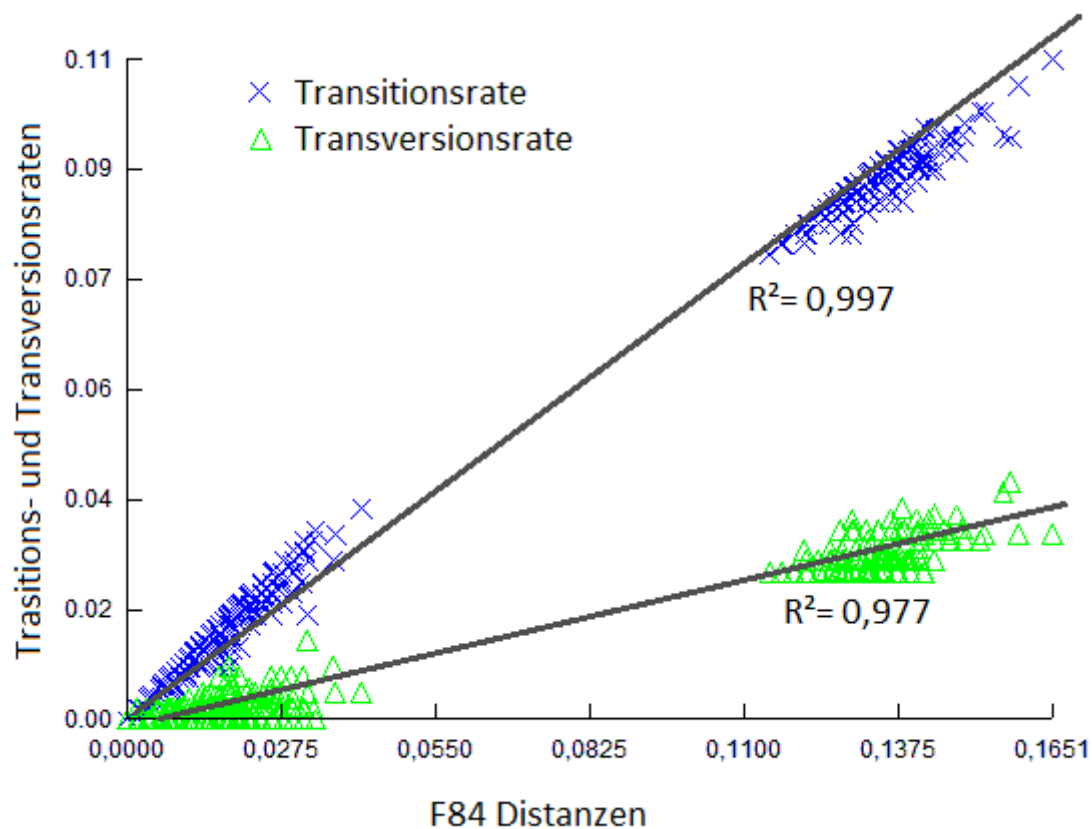


Abbildung 12. Darstellung der Transitionsrate (X, blau) und Transversionsrate (Δ, grün) versus der Felsenstein 1984 (F84) Distanzen des CO1 Daten-Sets.

Aufgrund dessen dass beide Analysen keinen wesentlichen Grad der Sättigung ergeben, kann das CO1 Daten-Set für Molecular Clock Analysen herangezogen werden.

3.3.2 Topologie der BEAST-Analyse

Die beiden rekonstruierten CO1 BEAST-Bäume (Abbildungen 13, 14) zeigen eine sehr ähnliche Anordnung der Taxa im Vergleich zu den bisherigen Analysen (Abbildungen 4, 5, 6, 7, 8, 9). Genauso wie beim Maximum Likelihood Baum, beim Minimum Spanning Baum und bei der TCS-Netzwerk-Analyse resultieren beide BEAST Bäume wiederum in zwei geographisch getrennte Kladen und in die Haplogruppen Kr1, Kr2, Kr3 (Kroatien-Klade), sowie in It1 und It2 (Italien-Klade). Dabei bildet in beiden Bäumen It2 die

ancestrale Haplogruppe Italiens (Abbildungen 13, 14), und Kr2 (Abbildung 13) und Kr3 (Abbildung 14) die basalen Haplogruppen Kroatiens. Es gibt nur wenig Unterschiede, wobei einige Individuen in anderen Haplogruppen auftauchen. Beispielsweise ist die Gruppierung ROV_16, 25, 31 im Vergleich zu allen bisherigen Analysen (Abbildungen 6, 7, 8, 9) in Kr3 statt in Kr2 enthalten und die Gruppierung ROV_18, 12 steht außerhalb Kr3. Außerdem ist ROV_5 nicht in Kr1 enthalten und ROV_6 statt in Kr3 in Kr1 (Abbildung 13). ROV_24 und ROV_34 variieren in ihren Positionen zwischen den verschiedenen Haplogruppen (Abbildungen 13, 14), genauso wie in den bisherigen Analysen (Abbildungen 6-9).

3.3.3 Zeitliche Bestimmung des Divergenzalters

Die beiden resultierenden BEAST-Bäume des CO1 Gens (Abbildungen 13, 14) repräsentieren zwei unterschiedlich durchgeführte Analysen zur Ermittlung der Divergenz-Zeit der kroatischen und italienischen Klade. Für die erste Analyse wurden durchschnittliche Sequenz-Divergenz-Raten (1. Pos.: 0,45%/Myr, 2. Pos.: 0,18%/Myr, 3. Pos.: 6,5%/Myr) von Marko (2002) herangezogen (Abbildung 13), während die zweite Analyse Außengruppen enthält, und Kalibrationspunkte nach dem Ergebnis von Jörger et al. (2010) gesetzt wurden (Abbildung 14).

In der ersten Analyse (Abbildung 13) wird die Aufspaltung der kroatischen und italienischen Taxa auf etwa 3,8 Millionen Jahren geschätzt. Der Fehlerbalken reicht von vor ca. 5,7 bis hin zu 2,17 Millionen Jahren. Die Radiation in der nördlichen Adria erfolgte vor circa 1,4 Millionen Jahren, während die italienische Seite vor circa 1,3 Millionen Jahren im Ligurischen Meer radiierte.

Die zweite Analyse (Abbildung 14) zeigt eine Auftrennung der italienischen und kroatischen Taxa vor 38,78 Mya, wobei Radiation der italienischen Taxa auf circa 25,98 Mya geschätzt wird, und die der kroatischen Taxa auf etwa 31,63 Mya.

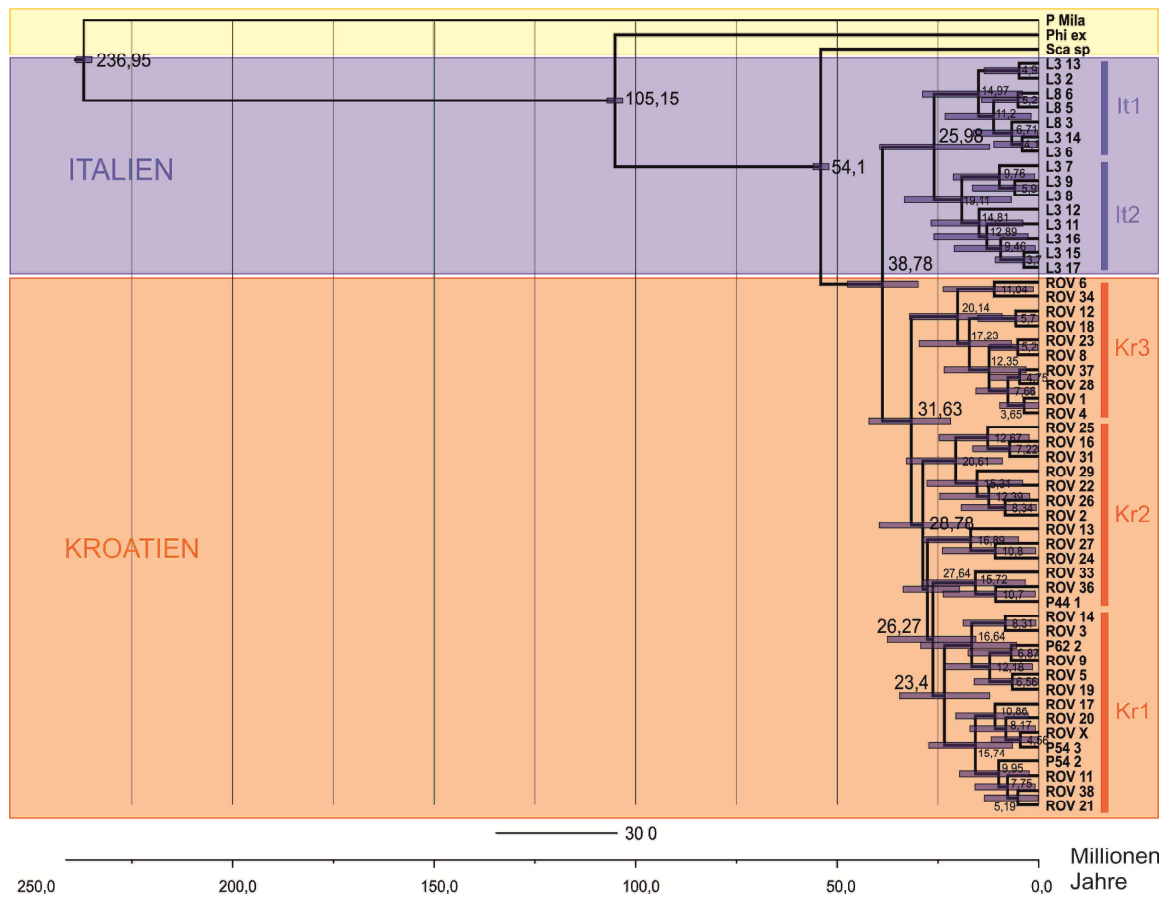


Abbildung 14. BEAST Analyse der CO1 Daten – mit Kalibrationspunkten nach Jörger et al. (2010). Zeitpunkte der Aufspaltungen an den Knotenpunkten. Die orange unterlegte Klade bezieht sich auf die kroatische Population, die blaue Farbe repräsentiert die italienische Klade, die gelbe Klade enthält die drei Außengruppen: *Philine exigua* (Phi ex), *Pontohedyle milaschewitchii* (P mila) und *Scaphander sp.* (Sca sp). Evolutionsmodell: HKY+G. Kalibrationspunkte an drei Knoten gesetzt nach Jörger et al. (2010). Fehlerbalken (violett) an den Knoten. Identische Haplotypen Sequenzen wurden exkludiert (Tab.10). Einheit der Zeitskala in Millionen Jahren.

4 Diskussion

4.1 Gegenüberstellung der verschiedenen Daten-Sets

4.1.1 Verwandtschaftsanalysen

Alle Analysen zeigen zwei deutlich geographisch getrennte Klade (Abbildungen 4-9, 13-14), mit einer maximalen Posterior probability (PP) von 1.00 für die Kroatien-Klade und einer PP von bis zu 0.80 für die Italien-Klade (16S&CO1; Abbildung 8A). Dies ist ein deutliches Anzeichen für eine hohe genetische Differenzierung zwischen den beiden Mittelmeer-„Populationen“. Alle drei bei Neapel gesammelten Individuen clustern in der Italien-Klade (16S; Abbildung 4) und alle vier bei Pag gesammelten Individuen innerhalb der Kroatien-Klade (16S, CO1, kombiniert; Abbildungen 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12). Alle CO1 und kombinierten Analysen resultieren in drei kroatischen Haplogruppen (Kr1, Kr2, Kr3) und zwei italienischen Haplogruppen (It1, It2) (Abbildungen 6, 7, 8, 9, 11, 12).

4.1.1.1 Haplogruppen der Kroatien-Klade

Die Kroatien-Klade zeigt in allen CO1 und kombinierten Analysen 3 verschiedene Haplogruppen (Kr1, Kr2, Kr3) (Abbildungen 6, 7, 8, 9, 13, 14). Kr1 enthält im kombinierten Baum P54_2, P54_3, P62_2, ROV_3, 5, 9, 11, 14, 15, 17, 20, Kr2 enthält ROV_2, 7, 16, 22, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 36, P44_1, und Kr3 enthält ROV_1, 4, 6, 8, 18, 20, 23, 28 (Abbildungen 8A, 9). Der Unterschied in der CO1 ML Analyse ist, dass ROV_20 in Kr3 enthalten ist, und nicht in Kr1 wie bei allen anderen Analysen (Abbildung 6A). Weiters variieren die Taxa ROV_7, 24, und 34 in den unterschiedlichen Analysen. Zum Beispiel ist ROV_34 in allen CO1 Analysen und in einer der BEAST Analysen in der Haplogruppe Kr2 enthalten (Abbildungen 6, 7, 13), während es in allen kombinierten Analysen und in der zweiten CO1 BEAST Analyse in Kr3 enthalten ist (Abbildungen 8, 9, 14). ROV_24 hingegen taucht in jeder Haplogruppe zumindest einmal auf (Abbildungen 6A, 7, 8A, 9, 13, 14), vor allem in der Haplogruppe Kr2 (Abbildungen 8, 9, 14). ROV_7 ist eine unvollständige Sequenz und variiert vermutlich deshalb in den unterschiedlichen Analysen so stark. Aus dem Grund wurde ROV_7 sowie ROV_30 aus der BEAST-Analyse exkludiert. Die erste BEAST Analyse weist wenige Unterschiede zu den anderen Analysen (Abbildungen 6, 7, 8, 9) auf. Die Gruppierung ROV_16, 25, 31 ist in Kr3 statt in Kr2 enthalten und die Gruppierung ROV_18, 12 steht außerhalb von Kr3. Außerdem ist ROV_5 nicht in Kr1 enthalten und ROV_6 statt in Kr3 in Kr1 (Abbildung 13). Die Analysen des 16S rRNA Daten-Set zeigen

noch kleine Gruppierungen von ROV_15 und 17, (ML, MS, TCS; Abbildungen 4A, 4C, 5) sowie ROV_7 und 30 (ML; Abbildung 4A), welche in den restlichen Analysen nur selten gestützt werden können (ML CO1 und kombiniert; Abbildungen 6A, 8A).

Durch die stärkere Konserviertheit des 16S Gens, gibt es viele identische Sequenzen, das heißt wenige Haplotypen, die mit höherer Häufigkeit auftreten. Daher ist 16S auch gut geeignet, um Unterschiede zwischen Populationen zu messen. Phylogenetisch sind 16S-Bäume jedoch schlechter aufgelöst (Abbildungen 4A, 4C). Das Protein-kodierende Gen-Fragment CO1 besitzt in dieser Studie hingegen eine höhere Auflösung (Abbildungen 6A, 6C).

Sowohl ROV_1, (16S ML, MS, kombiniert TCS; Abbildungen 4A, 4C, 9) als auch ROV_9 (16S TCS, CO1 TCS; Abbildungen 5, 7) und P44_1 (CO1 ML, kombinierte ML; Abbildungen 6A, 8A) werden häufig als ancestraler Haplotyp vorgeschlagen. ROV_9 befindet sich auch im 16S ML-Baum, CO1 ML- und MS-Baum und kombinierten ML-Baum in der Nähe der Basis (Abbildungen 4A, 6A, 6C, 8A). Seltener stehen ROV_30 (CO1 MS; Abbildung 6C) und ROV_20 (kombiniert MS; Abbildung 8C) an der Basis der Kroatien-Klade. Die verschiedenen Analysen zeigen unterschiedliche ancestrale Haplogruppen, wobei beide ML-Bäume (CO1 und kombiniert, Abbildungen 6, 8) die Kr2 Haplogruppe als Ancestrum vorschlagen. Diese enthält die basal stehende P44_1.

4.1.1.2 Haplogruppen der Italien-Klade

Alle CO1- und kombinierten Analysen, sowie die CO1 BEAST-Analysen resultieren einheitlich in 2 Haplogruppen, It1 und It2. It1 enthält die Taxa L3_2, 6, 13, 14, L8_3, 5, 6 und It2 besteht aus L3_7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17 (Abbildungen 6, 7, 8, 9, 11, 12). Die Gruppierung L3_15 und L3_17 wird ebenfalls von der Bayesian Analyse mit einer PP von bis zu 0.59 gestützt (Abbildung 8A).

Als ursprünglichster Haplotyp aller TCS-Netzwerk-Analysen zeigt sich L8_6 in der Italien-Klade (Abbildungen 5, 7, 9). Alle anderen Analysen zeigen unterschiedliche basale Haplotypen an: L3_16 (CO1 ML, MS, kombiniert ML; Abbildungen 6A, 6C, 8A), L8_4 (16S ML; 4A), N37_1 (16S MS; Abbildung 4C), L3_2 (kombiniert MS; Abbildung 8C). Als Ancestrale Haplogruppe zeigen sich beide Gruppierungen. Die ML-Analysen (Abbildungen 6A, 8A) tendieren mehr zur Haplogruppe It2 als Ancestrum, die TCS-Analysen (Abbildungen 7, 9) mehr zu It1. Der kombinierte MS-Baum zeigt It1 als basale Haplogruppe (Abbildung 8C).

4.1.2 Statistische Ergebnisse

Die in mit der AMOVA errechneten F_{ST} -Indices liegen durchschnittlich bei 0,93430 (Tabelle 11), und weisen daher nach Wright (1978) auf eine sehr hohe Stufe der Populationsdifferenzierung hin (Tabelle 8). Mit den F_{ST} -Werten konnte auch das Maß an Genfluss zwischen den gesampelten Individuen-Gruppen in Kroatien und Italien berechnet werden. Es gibt praktisch keinen Nachweis an Genfluss (0,04 Migranten/Generation). Dabei sollte aber berücksichtigt werden, dass F_{ST} -Indices fehleranfällig sind, da sie nicht auf einen geringen Sample-Umfang ausgelegt sind. F_{ST} -Indices sind angewiesen auf eine hohe Diversität innerhalb der Populationen, da sie Haplotypen-Frequenzen vergleichen (Meirmans & Hedrick, 2011). Diese Studie enthält zwar viele verschiedene Haplotypen, jedoch nur geringe Haplotypen-Frequenzen. Die Distanzanalyse zeigt eine sehr hohe maximale genetische Distanz von circa 14% (CO1) und eine sehr geringe Variation innerhalb der Populationen (0-3,9%, CO1) (Abbildung 10). Dies könnte der Hinweis auf die Präsenz zweier kryptischer Arten zwischen Italien und Kroatien sein.

4.1.3 Zeitliche Bestimmung des Divergenzalters

Die rekonstruierten Stammbäume der BEAST-Analyse des partitionierten CO1 Datensets zeigen die möglichen Aufspaltungs-Events der kroatischen und italienischen Taxa (Abbildungen 13, 14). Die Analyse mit den Daten von Jörger et al (2010) resultiert in einen CO1-BEAST-Baum, der eine geschätzte Divergenz der kroatischen und italienischen Taxa von etwa 38,78 Millionen Jahre zeigt (Abbildung 14). Im späten Miozän (Messinium) wurde das Mittelmeer vom atlantischen Ozean isoliert. Die Messinianischen Salinitätskrise (Austrocknung des Urmittelmeeres) wird mit 5.96 Myr als Beginn und 5.33 Myr als Ende (Überflutung) datiert (Krijgsman et al., 1999). Viele Arten sind aufgrund steigender Salinität im Mittelmeer ausgestorben (Hofrichter, 2002). Bei einer Aufspaltung vor so langer Zeit (38 Mio. Jahre) müssten es nach der Salinitätskrise vor etwa 5,3 Millionen Jahren (Krijgsman et al., 1999) zu einer Einwanderung der beiden Arten ins Mittelmeer gekommen sein. Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, dass sich eine Art nur in der nördlichen Adria und die andere nur im Ligurischen/Tyrrhenischen Meer angesiedelt hat. Aus dem Grund wurde mit einer weiteren CO1-BEAST-Analyse (mit Substitutionsraten nach Marko, 2002) versucht zu überprüfen, ob die Aufspaltung der beiden Taxa nicht doch jünger ist. Das Divergenzalter der beiden Taxa wird in dieser Analyse auf 3,8 Millionen Jahre geschätzt, wobei der Fehlerbalken bis hin zu einer Aufspaltung von vor etwa 2 Millionen Jahre

reicht (Abbildung 13). Damit wäre die Speziation der Taxa erst nach dem Ende der Messinianischen Salinitätskrise im Mittelmeer erfolgt.

4.2 Genetische Differenzierung

4.2.1 Wie kommt Genfluss zwischen Populationen zustande?

Genfluss ist der genetische Austausch aufgrund von Wanderungen potenziell fertilen Individuen oder Gameten zwischen Populationen. Durch Genfluss können Populationen Allele hinzugewinnen oder verlieren und es kommt zur tendenziellen Verringerung der Unterschiede zwischen Populationen (Campbell, 2003). Genfluss könnte durch aktive Migration adulter Individuen zustande kommen, doch die Verbreitung von Larven oder adulten interstitiellen Gastropoden wird nur innerhalb eines kleinen Radius Schritt für Schritt angenommen. (Neusser et al., 2011a). Interstitielle Gastropoden-Larven haben aufgrund einer stationären Larvenentwicklung, mit einer nur kurzen oder keinen freischwimmenden Phase, ein sehr geringes Ausbreitungspotential (Swedmark, 1968). Auch die Bildung durchgehender Populationen in tieferen Gewässern könnte möglich sein, doch marine mesopsammale Gastropoden scheinen ausschließlich in Küsten-Sanden vorzukommen. Es besteht die Möglichkeit der passiven Verschleppung von adulten Tieren oder Eier, welche an Sandkörnern angehaftet sind, durch starke Stürme oder Strömungen. Aber eine Verbreitung über weite Distanzen durch Wasser-Strömungen und Stürme ist nicht besonders wahrscheinlich. Menschlicher Eingriff (z.B. die Verschleppung von kleinen Sandmengen per Schiff) kann allerdings nicht immer ausgeschlossen werden (Neusser et al., 2011a). Bei temporär durchgehendem mesopsammalen Habitat zwischen zwei weit disjunkten Populationen könnte es auch zu „Gene-hopping“ kommen. Sand ist ein dynamisches Habitat, das zeitweilig auch ein durchgehendes Habitat zwischen zwei weit voneinander entfernten Populationen schaffen könnte. Allerdings konnte in Zuge der Aufsammlungen für diese Studie entlang der gesamten italienischen Ostküste, sowie an vielen Standorten nahe Neapel (Tabelle 2, Abbildung 3) keine Individuen von *Philinoglossa praelongata* gefunden werden. Insgesamt konnten in der Nähe von Neapel nur drei „*Ph. praelongata*“ Individuen aufgesammelt werden. Nahe Neapel schien als einziges die interstitielle Schnecke *Parahedyle cryptophthalma* (Westheide & Wawra, 1974) und *Pontohedyle milaschewitchii* häufig zu sein. Der Sand an der italienischen Ostküste ist möglicherweise zu feinkörnig, da er nur einen geringen Anteil an Schell-Elementen enthält. Die meisten mesopsammalen Gastropoden, vor allem *Ph. praelongata*, bevorzugen Grobsande mit hohem Schellanteil. Weiters könnte während der letzten

Kaltzeit, die vor ca. 10.000 Jahren endete (Hofrichter, 2002), Genfluss zwischen interstitiellen Arten der west-italienischen und kroatischen Seite erfolgt sein. Sehr wahrscheinlich ist dabei die Zeit des letzten glazialen Maximums (LGM) vor ca. 20.000 Jahren, als der Meeresspiegel am tiefsten lag bei ca. -120 Meter (Maselli, 2011), und es aufgrund der Meeresspiegelschwankungen und Sediment-Verfrachtung vermutlich zu Kontraktionen und Expansionen der Habitate interstitieller Populationen kam. Dabei verlagerten sich möglicherweise das Artenareal der nördlichen Adria und das des Ligurischen Meeres in den Süden. Auch Maselli (2011) berichtete von grenzüberschreitenden Sediment-Verlagerungen, sodass das nord-adriatische Schelf fast vollkommen unter subaerischen Bedingungen war. Durch diese Habitat-Verlagerung und Kontraktion bestand die Möglichkeit des Genflusses zwischen der west-italienischen und nord-adriatischen Population. Werth (2008) zog genetischen Austausch während der letzten Kaltzeit als Erklärung für die resultierende geringe genetische Variabilität in Betracht. Das Ergebnis der Ermittlung des Divergenzalters von *Ph. praelongata* zeigt jedoch, dass die Speziation der beiden Taxa lange vor der letzten Kaltzeit stattgefunden haben muss, und zwar vor etwa 3,8 Millionen Jahren (Abbildung 13). Damit könnte auch erklärt werden, warum *Ph. praelongata* Populationen im Gegensatz zu *P. milaschewitchii* Populationen zwischen Italien und Kroatien genetisch so stark differenziert sind.

4.2.2 Präsenz Kryptischer Arten?

Zwischen den beiden geographisch weit getrennten untersuchten *Philinoglossa praelongata*-„Populationen“ ist in den hier gewonnenen Daten kein Genfluss nachweisbar. Alle Analysen resultieren in zwei geografisch getrennte Kladen. Die Häufigkeitsverteilung der paarweisen Distanzen zeigt eine große Kluft zwischen den Distanzen innerhalb der Populationen und zwischen den Populationen. Die interspezifische maximale paarweise Distanz von *Ph. praelongata* zwischen der Westküste Italiens und der Nordadria beträgt in dieser Studie 14,1% (CO1). Ähnliche Ergebnisse zeigten die interstitiellen kryptischen Gastropoden-Arten der Gattung *Pseudunela* (Acochlidia) in der Studie von Neusser et al. (2011a), deren interspezifische Distanz bei 14,04-16,28% (CO1) lag. Die Studie von Werth (2008) über die mesopsammalen Gastropode *Pontohedyle milaschewitchii* (Acochlidia) hingegen zeigt keine Bestätigung einer hohen genetischen Variabilität zweier weit voneinander getrennten Populationen im nördlichen Mittelmeer. Aufsammlungs-Orte, Habitat, Genregion und Analysemethoden waren in dieser Studie sehr ähnlich gewählt. Die Analysen des 16S und CO1 Gens resultieren in gemischte Kladen. Zwischen den

Populationen konnte ein Genfluss von 6,1 Migranten pro Generation nachgewiesen werden. Auch die interspezifischen genetischen Distanzen zwischen den beiden untersuchten Standorten fielen mit 4,8% vergleichsweise wesentlich geringer aus (Werth, 2008). Weitere molekulare Studien unterstützen ebenfalls die Präsenz kosmopolitischer (*Hesionides gohari*, Polychaeta) oder amphiatlantischer (*Ctenodrilus serratus*, Polychaeta), und somit geographisch weit voneinander disjunkten meiofaunalen Taxa, mit genetischer Interaktion über große Ozeane hinweg, ohne das Vorhandensein von pelagischen Larven (Schmidt & Westheide, 1999; Westheide *et al.*, 2003). Die Studie von Schmidt & Westheide (1999) zeigt, dass es sich bei den untersuchten europäisch-atlantischen *Hesionides gohari* Individuen und denen des Mittelmeers und des Roten Meeres um dieselbe Spezies handelt. Westheide *et al.* (2003) untersuchte Individuen des meiofaunalen Polychaeten *Ctenodrilus serratus* an sechs Standorten beiderseits des nordatlantischen Ozeans. Die Ergebnisse von Westheide *et al.* (2003) weisen auf die Existenz eines gemeinsamen Genpools hin.

Der fehlende Genfluss in dieser Studie, sowie die hohe interspezifische und geringe intraspezifische Variation (0-3,9%, CO1), sowie zusätzlich die zwei deutlich getrennten Kladen zwischen den kroatischen und italienischen *Ph. praelongata*- „Populationen“ in dieser Studie, weisen auf eine hohe genetische Differenzierung hin und führen zu der Annahme der Präsenz zweier kryptischer Arten.

Kryptische Arten sind zwei oder mehrere verschiedene Arten, die, aufgrund des Fehlens von morphologischen Unterschieden, als eine Art klassifiziert wurden (Bickford *et al.*, 2007). Erst kürzlich konnte in tropischen Sanden die Existenz kryptischer Arten einer interstitiellen acochliden Gastropode der Gattung *Pseudunela* mit molekularen und morphologischen Untersuchungen bewiesen werden. Dabei wurden auf den Salomon-Inseln zwei verschiedene kryptische Arten an zwei benachbarten Stränden gefunden (Neusser *et al.*, 2011a). Zur Entstehung von kryptischen Arten kommt es durch reproduktive Isolation, welche z.B. durch eine geographische Barriere zwischen den Populationen zustande kommt. Zwischen den hier untersuchten Populationen liegt eine solche Barriere, die italienische Halbinsel zwischen der westitalienischen Küste und der nordadriatischen Küste, mit einer maximalen Distanz von ca. 2260 km Küstenlinie. Speziell im interstitiellen Habitat, welches viele Taxa mit geringer Fähigkeit zur Ausbreitung beherbergt, existiert möglicherweise ein hoher Grad an kryptischen Artbildungen, wodurch der Anteil der Meiofauna an der marinen Biodiversität möglicherweise ernsthaft unterschätzt wird (Casu *et al.*, 2009).

4.2.3 Unterschiede in der Fortpflanzungsbiologie?

Swedmark (1968) erwähnte eine sehr ähnliche Charakteristik der Reproduktionsbiologie der interstitiellen Gastropodengruppen Acochlidia und Philinoglossidae. Während die acochlide Schnecke *Pontohedyle milaschewitchii* getrenntgeschlechtlich ist (Wawra, 1986, Jörger et al., 2007), sind andere acochlide Gattungen sowie auch die Philinoglossidae hermaphroditisch (Swedmark, 1968). Die Übertragung von Spermatophoren wurde bei hermaphroditischen acochliden (*Hedylopsis brambelli*, Swedmark, 1968), wie auch getrenntgeschlechtlichen acochliden (*P. milaschewitchii*, Jörger et al., 2007) Schnecken beobachtet. Da der Transfer von Spermatophoren bei interstitiellen Taxa mit einer geringen Gametenproduktion eine sichere Garantie für die Befruchtung darstellen (Swedmark, 1968), ist daher anzunehmen, dass die Übertragung von Spermatophoren bei den hermaphroditischen interstitiellen Philinoglossiden ebenfalls eine Rolle für die Befruchtung spielen könnte. Während der Reproduktionszeit werden Spermatophoren an das zu befruchtende Individuum angehaftet, welche voll mit Spermatozoen sind. Während sich die Spermatophoren in den nächsten Tagen entleeren, dringen die Spermatozoen über die Haut in das Individuum ein (Swedmark, 1968). Eine Gemeinsamkeit der Acochlidia und Philinoglossidae ist, dass etwa 50 Eier in gelatinösen Kokons an Sandkörner angehaftet werden. Die daraus sich entwickelnde Veligerlarve unterscheidet sich nur in der schwarzen Larvalniere der Philinoglossidae (Swedmark, 1968). Die Larvalbiologie beider Gruppen ist noch weitgehend unerforscht. Da Licht die Orientierung der Larven nicht zu beeinflussen scheint, und larvale Lokomationsorgane nur schwach entwickelt zu sein scheinen, kann angenommen werden, dass die freischwimmende Periode der interstitiellen Gastropodenlarven nicht oder nur sehr kurz erfolgt (Swedmark, 1968). Swedmark (1968) erwähnte dabei, dass vermutlich der Großteil der Larven im Interstitium verbleibt und niemals aktiv sich in Richtung Wassersäule bewegt. Aus dem Grund wurde bisher auch ein niedriges Ausbreitungspotential angenommen. Trotzdem ergibt die Studie von Werth (2008) einen hohen genetischen Verwandtschaftsgrad der beiden weit getrennt untersuchten interstitiellen Gastropodenpopulationen. Weitere Untersuchungen zur larvalen Entwicklung der Gastropode *P. milaschewitchii* sollten klären, ob diese weit verbreitete Art nicht doch im Vergleich zu anderen interstitiellen Gastropodenarten ein pelagisches Larven-Stadium aufweist. Sollten Unterschiede in der larvalen Entwicklung von *P. milaschewitchii* und *Ph. praelongata* gegeben sein, welche bisher noch nicht entdeckt wurden, könnte hierin die Ursache dafür liegen, dass bei weit getrennten Populationen eine Art um ein Wesentliches differenzierter ist, als die andere.

Schließlich sollte auch erwähnt werden, dass eine zweite morphologisch sehr ähnliche Art der Gattung *Philinoglossa* im Mittelmeer lebt, *Philinoglossa helgolandica* (Hertling, 1932).

4.3 *Ph. praelongata* versus *Ph. helgolandica*

Neben *Philinoglossa praelongata* existiert noch eine zweite Art der Gattung *Philinoglossa* im interstitiellen Lebensraum des Mittelmeeres, nämlich *Philinoglossa helgolandica*. Sie ist im Mittelmeer weniger häufig anzutreffen (Salvini-Plawen, 1973) und kommt im Vergleich zu *Ph. praelongata* auch in den weniger groben Sanden Schwedens, Helgolands, und in der Robin Hood's Bay (Yorkshire, U.K.) häufig vor (Poizat, 1980; Poizat, 1981; Hertling, 1932). Poizat zog allerdings später die bisher gefundenen schwedischen *Philinoglossa* nicht mehr länger als *Ph. helgolandica* in Betracht, sondern Aufgrund einer morphologischen Nachprüfung des Materials als *Ph. praelongata* (Poizat, 1991). Im Mittelmeer wurde aber *Ph. helgolandica* bereits nahe der Standorte von *Ph. praelongata* bei Livorno (Italien; Salvini-Plawen, 1973) und Rovinj (Kroatien; Salvini-Plawen, 1973) gefunden. Beide Arten teilen viele morphologische Gemeinsamkeiten, könnten aber durch 3 wesentliche Hauptmerkmale unterschieden werden: Körperlänge, Terminalabschnitt und Radula.

Das offensichtlichste Unterscheidungsmerkmal sind die Körperproportionen. Im Vergleich zu *Philinoglossa praelongata* (Abbildung 15A, links) ist *Ph. helgolandica* (Abbildung 15A, rechts) wesentlich gedrungener. Während *Ph. praelongata* ein Verhältnis von Länge zu Breite von 6 aufweist (Körperlänge bis zu 3 mm), ist es bei *Ph. helgolandica* nur ein Verhältnis von 3,5 – 4,5 (Körperlänge bis zu 1,5 mm) (Salvini-Plawen, 1973).

Der zweite offensichtliche Unterschied zwischen den beiden Arten liegt im hinteren Körperabschnitt. Während der Terminalabschnitt von *Philinoglossa helgolandica* keine besonderen Merkmale aufweist, ist der hintere Körperabschnitt von *Philinoglossa praelongata* ungewöhnlich verlängert und das überhängende Notum (Abbildung 15B, unten) etwas gedreht-gekrümmt (Abbildung 15A, links). Diese Einrichtung eignet zusammen mit den Haft-Drüsen hervorragend zum Festhaften an einzelnen Sandkörnern, und stellt daher eine charakteristische Anpassung von *Ph. praelongata* an das mesopsammale Leben dar (Abbildung 15B, oben) (Salvini-Plawen, 1973).

Die Radula stellt ein drittes wichtiges Unterscheidungsmerkmal dar. Philinoglossidae haben eine typische, sechs-gliedrige Radula mit der Formel 3.0.3. Die Radula von

Philinoglossa praelongata zeigt an den inneren Lateralzähnen keine Dentikel, sondern einen glatten Rand (Abbildung 15C, links). Die Radula von *Philinoglossa helgolandica* hingegen weist an den inneren Lateralzähnen eine nur schwer zu erkennende Zähnelung von circa 20 Dentikeln auf (Abbildung 15C, rechts). Die Anzahl der Dentikel ist alters- und größenabhängig (Salvini-Plawen, 1973).

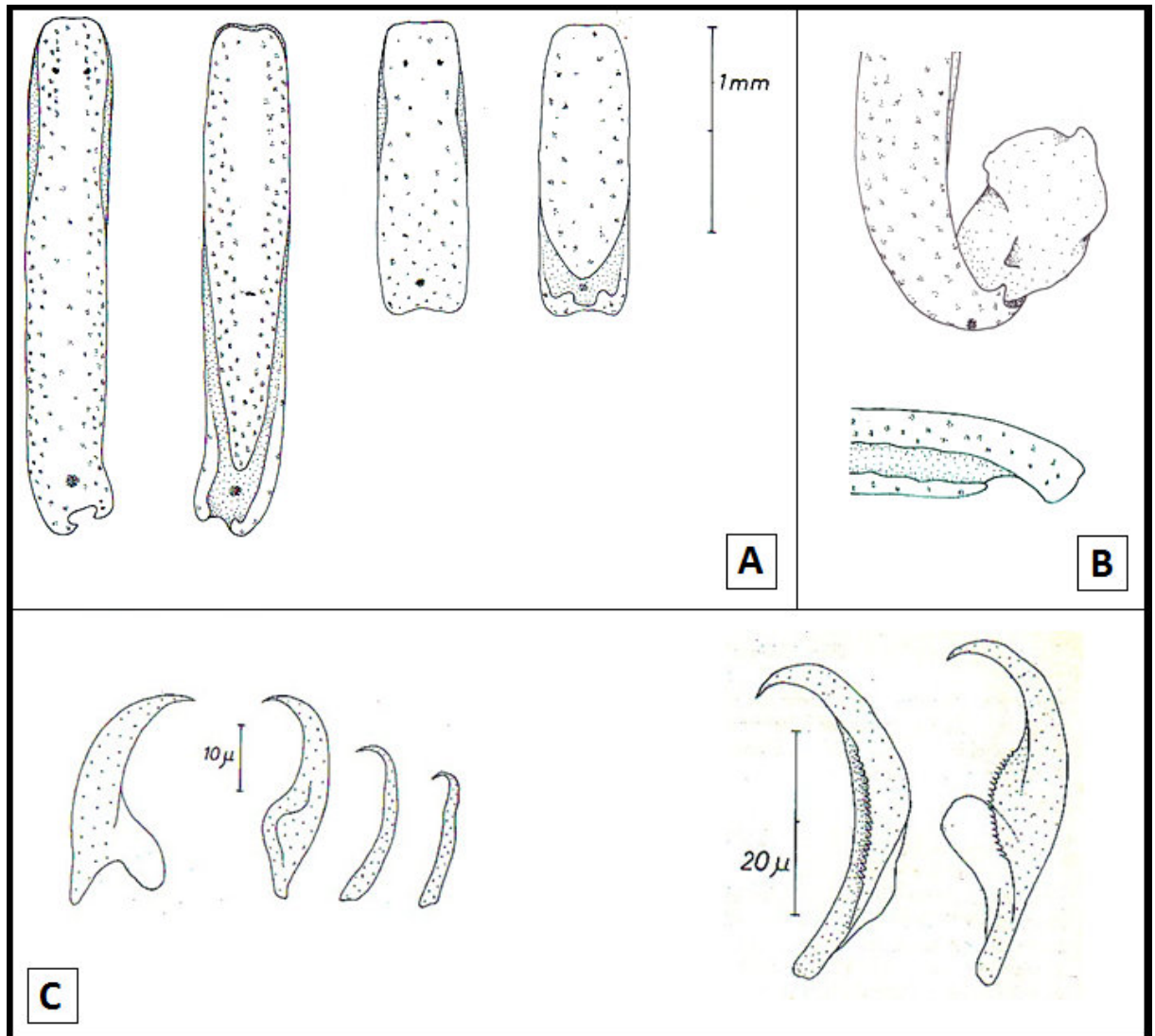


Abbildung 15. (A) Dorsal- und Ventralansicht von *Ph. praelongata* (links) und *Ph. helgolandica* (rechts) (B) Posteriore Haft-Einrichtung (oben) und Lateralansicht des überhängenden Notums am posterioren Ende von *Ph. praelongata* (unten) (C) Ein isolierter innerer Lateralzahn und eine halbe Querreihe der Radula von *Ph. praelongata* (links) und zwei innere Lateralzähne von *Ph. helgolandica* (rechts) (alle Abbildungen zusammengestellt aus Salvini-Plawen, 1973)

Die in Italien, wie auch in Kroatien gesammelten Individuen hatten von der Körperlänge ein deutliches Längen/Breiten-Verhältnis von mindestens 6, und der hintere Körperabschnitt war deutlich verlängert, gedreht und überhängend. Die Tiere haften sich häufig mit ihrem Haftapparat an Sandkörnern fest. Die Radula der gesammelten

Tiere wurde nicht untersucht, aufgrund zu geringer Zahl an gefundenen Individuen. Man kann davon ausgehen, dass die Sequenzen der kroatischen Tiere von *Philinoglossa praelongata* stammen. Leider stehen von *Philinoglossa helgolandica* auch keine Sequenz-Daten zur Verfügung, um auf genetischer Ebene zu untersuchen, ob es sich bei der italienischen Population nicht doch um *Ph. helgolandica* handeln könnte.

4.4 Conclusio

Die genetische Variabilität zwischen den beiden untersuchten mesopsammalen „Populationen“ von *Philinoglossa praelongata* im nördlichen Mittelmeer zeigt sich in allen Analysen dieser Studie als sehr hoch. Das Auftreten zweier kryptischer Arten ist sehr wahrscheinlich. Es muss überprüft werden, ob es sich bei der italienischen Klade um *Philinoglossa helgolandica* handelt. Weiters bleibt die Frage offen, wieso der Genfluss zwischen Populationen anderer interstitieller Schnecken-Arten vergleichbarer Aufsammlungs-Orte um vieles höher zu sein scheint, als in der aktuellen Studie.

Um zu klären, ob es sich bei einer der beiden „Populationen“ um eine neue kryptische Art handelt, oder um die nahe verwandte Art *Ph. helgolandica*, wäre eine morphologische Untersuchung der Radula von Individuen beider besammelten Standorte (Italien und Kroatien) nötig, sowie weitere Sequenz-Daten von *Ph. helgolandica* zum genetischen Vergleich. Eine weitere Koaleszenanalyse mit Sequenz-Daten von *Pontohedyle milaschewichii* würde Aufschluss geben, über den Zeitpunkt der Divergenz im Vergleich zu *Ph. praelongata*. Zusätzlich könnten neue Informationen zur Larven-Entwicklung von interstitiellen Gastropoden-Arten mehr Aufschluss geben.

5 Literatur

Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L, Meier, R., Winkler, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 22: 148–155.

Eilertsen, M.H., Malaquias, M.A.E., 2013. Systematic revision of the genus *Scaphander* (Gastropoda, Cephalaspidea) in the Atlantic Ocean with a molecular phylogenetic hypothesis. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 167 (3), 389-429.

Bouchet, P.; Rocroi, J.-P., 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia. International Journal of Malacology*, Band 47 (1-2) 397.

Campbell, N.A., Reece, J.B., 2003. *Biologie*. Heidelberg, Berlin. Spektrum Verlag. pp: 524-533, 550.

Casu, M., Lai T., Sanna, D, Cossu, P., Curini-Galletti, M., 2009. An integrative approach to the taxonomy of the pigmented European *Pseudomonocelis* Meixner, 1943 (Platyhelminthes: Proseriata). *Biological Journal of the Linnean Society*. 98: 907–922.

Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9: 1657-1659.

Corel Corporation, 2010: CorelDRAW X5 version 15.0.0.486.

Dayrat, B., Tillier, S., 2002. Evolutionary relationships of euthyneuran gastropods (Mollusca): a cladistic re-evaluation of morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 135:403-470.

Dinapoli, A., Klussmann-Kolb, A., 2010. The long way to diversity - phylogeny and evolution of the Heterobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogeny and Evolution*. 55: 60-76.

Drummond, A. J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin v.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.

Giere, O., 2009. Meiobenthology - The microscopic motile Fauna of aquatic sediments, Second Edition. Springer. Pp: 224-225.

Gofas, S., Le Renard, J., Bouchet, P., 2001. Mollusca, in: Costello, M.J. et al. (Ed.), 2001. European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Collection Patrimoines Naturels, 50: pp. 180-213 (www.marinespecies.org).

Haszprunar, G., 1985. The Heterobranchia — a new concept of the phylogeny of the higher Gastropoda. Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung. 23 (1): 15–37.

Hart, A., 2004. How to interpret family History & Ancestry DNA Test Results for Beginners. Asja Press. Pp: 538.

Hertling, H., 1932. *Philinoglossa helgolandica* n.g. n. sp., ein neuer Opisthobranchier aus der Nordsee bei Helgoland. Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen Abteilung Helgoland, N. F. 19, 1-9.

Hofrichter, R., 2002. Das Mittelmeer, Band 1: Allgemeiner Teil. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin. Pp: 86-96.

Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics, 17: 754-755.

Jörger, K.M., Neusser, T.P., Haszprunar, G., Schrödl, M., 2007. Undersized and underestimated: 3D visualization of the Mediterranean interstitial acochlidian gastropod *Pontohedyle milaschewitchii* (Kowalevsky, 1901). ScienceDirect, Organisms, Diversity & Evolution. 8: 194–214

Jörger, K.M., Stöger, I., Kano, Y., Fukuda, H., Knebelsberger, T., Schrödl, M., 2010. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. BMC Evolutionary Biology 10: 323. Pp: 1-20.

Krijgsman, W., Hilgen, F.J., Raffi, I., Sierro, F.J., Wilsonk, D.S., 1999. Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. Nature 400: 652-655.

Klussmann-Kolb, A., Dinapoli, A., Kuhn, K., Streit, B., Albrecht, C., 2008. From sea to land and beyond—new insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). BMC Evolutionary Biology, 8:57 Pp: 1-16.

Kondrashov, A. S., Povolotskaya, I. S., Ivankov, D. N., Foyodor, A. K., 2010. Rate of sequence divergence under constant selection. Biology Direct. 5:5 Pp: 1.

Maeda, T., Kajita, T., Maruyama, T., Hirano, Y., 2010. Molecular phylogeny of the Sacoglossa, with a discussion of gain and loss of kleptoplasty in the evolution of the group. *Biological Bulletin* 219 (1): 17-26.

Malaquias, M. A. E., Dodds, J. M., Bouchet P. & Reid, D. G., 2009. A molecular phylogeny of the Cephalaspidea sensu lato (Gastropoda: Euthyneura): Architectibranchia redefined and Runcinacea reinstated. *Zoologica Scripta*. 38 (1): 23-41.

Maselli, V., 2011. The stratigraphic record of the quaternary sea level fluctuations and the impact of the post-glacial sea level rise (termination I) in the adriatic basin (Mediterranean Sea), Tesi di Dottorato, Università di Bologna, Pp: 11, 100.

Marko, P. B., 2002. Fossil Calibration of Molecular Clocks and the Divergence Times of Geminate Species Pairs Separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology and Evolution*. 19 (11): 2005–2021.

Medin, 2011. UK checklist of marine species derived from the applications Marine Recorder and UNICORN, version 1.0. (www.marinespecies.org).

Meirmans, P. G., Hedrick, P. W., 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources* 11: 5-18.

Mikkelsen, P. M., 1996. The evolutionary relationships of Cephalaspidea S. L. (Gastropoda: Opisthobranchia): A phylogenetic analysis. *Malacologia*, 37 (2): 375-442.

NCBI: The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

NCBI: Homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

NCBI: The Genetic Codes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/index.cgi?chapter=tgencodes>).

Neevia technology. Document converter express. (<http://docupub.com/pdfconvert/>).

Neusser, T. P., Jörger, K. M., Schrödl, M., 2011a. Cryptic Species in Tropic Sands - Interactive 3D Anatomy, Molecular Phylogeny and Evolution of Meiofaunal Pseudunelidae (Gastropoda, Acochlidia). *PLoS ONE*. 6 (8): e23313.

Neusser, T. P., Fukuda, H., Jörger, K. M., Kano, Y., Schrödl, M., 2011b. Sacoglossa or Acochlidia? 3D reconstruction, molecular phylogeny and evolution of Aitengidae (Gastropoda: Heterobranchia). *Journal of Molluscan Studies*. 77: 332-350.

- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author www.psc.edu/biomed/genedoc.
- Nylander, J. A. A. 2004. Mr.Modeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Ott, J., 1996. Meereskunde. 2. Auflage. Ulmer Verlag. Stuttgart. pp: 95-97, 227-232
- Page, R.D.M., 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Bioscience. 12: 357-358.
- Poizat, C., 1980. Gastéropodes Opisthobranthes Mésopsammiques du Skagerrak (Suède Occidentale) Distribution et dynamique de population. Vie Milieu, 30 (3-4): 209-223.
- Poizat, C., 1981. Gastéropodes Mésopsammiques de la Mer du Nord (Robin Hood's Bay, U.K.) Ecologie et Distribution, Journal of Molluscan Studies. 47, 1-10.
- Poizat, C., 1991. New Data on an interstitial Opisthobranch Assamblage and other Meiofauna from the Skagerrak, Sweden. Journal of Molluscan Studies. 57, 167-177.
- Ponder, W.F., Lindberg, D.R., 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. Zoological Journal of the Linnean Society. 119 (2): 83–265.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 14: 817-818.
- Raes, J., Van de Peer Y., 1999. ForCon: a software tool for the conversion of sequence alignments. Embnet New. 6: 10-12.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., 2002-2012a. TreeAnnotator v1.7.4. MCMC Output analysis. Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Department of Computer Science, University of Auckland.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., 2002-2012b. LogCombiner v 1.7.4. MCMC Output Combiner. Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Department of Computer Science, University of Auckland.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., 2003-2009. Tracer MCMC Trace Analysis Tool Version v1.5.0. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Department of Computer Science, University of Auckland.

- Rambaut, A., 2006-2012. FigTree Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0.. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Riedl, R. 1983. Fauna und Flora des Mittelmeeres. Verlag Paul Parey, Hamburg & Berlin Pp:307.
- Salvini-Plawen, L., Steiner, G., 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. In Origin and evolutionary radiation of the Mollusca . The Malacological Society of London: 29–51.
- Salvini-Plawen, L., Sterrer, W., 1968. Zur Kenntnis der mesopsammalen Gattung *Pseudovermis* (Gastropoda, Nudibranchia). – Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen. 18, 68-77.
- Salvini-Plawen, L., 1971. Schild- und Furchenfüßer (Caudofoveata und Solenogastres), verkannte Weichtiere am Meeresgrund. A. Ziemsen Verlag. pp: 7.
- Salvini-Plawen, L., 1973. Zur Kenntnis der Philinoglossacea und der Acochliidae mit *Platyhedylae* fam. nov. (Gastropoda, Cephalaspidea). Verlag Paul Parey Hamburg. 11, (2): 110-133.
- Salvini-Plawen, L., Templado, J., 1990. Nota sobre los Moluscos Mesopsammicos del Sudeste de Espana. Iberus. 9 (1-2): 527-528.
- Schmekel, L., 1985. Aspects of evolution within the opisthobranchs. Pp. 221-267, in: Trueman, E.R., Clarke, M.R., The Mollusca. Academic Press, Orlando., 10, Evolution, 491 pp.
- Schmidt, H., Westheide, W., 1999. Genetic Relationships (RAPD-PCR) Between Geographically Separated Populations of the “Cosmopolitan” Interstitial Polychaete *Hesionides gohari* (Hesionidae) and the Evolutionary Origin of the Freshwater Species *Hesionides riegerorum*. Biological Bulletin. 196: 216-226.
- SPSS Inc., 1989-2006. SPSS v. 15.0.
- Staubach, S., 2008. The Evolution of the Cephalic Sensory Organs within the Opisthobranchia. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Pp: 73.
- Swedmark, B., 1964. The interstitial fauna of marine Sand. Biological Reviews, 39:1:1–42.

Swedmark, B., 1968. The Biology of interstitial Mollusca: Symposia of the Zoological Society of London. 22:135-149.

Swofford, D.L., 2003. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Technelysium, Pty Ltd, 1998-2005. Chromas Lite v. 2.01.

Technelysium, Pty Ltd, 2003-2009. Chromas Pro v. 1.5.

The International HapMap Consortium, 2003. The International HapMap Project. Nature. 426: 789–796.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 24: 4876-4882.

Veit-Köhler, G., Kuhnert, J., Volkenborn, N., 2010. Der Ingenieur im Watt und die Meiofauna. Natur und Museum 140 (5/6): 120-125.

Vonnemann, V., 2005. Rekonstruktion der Phylogenie der Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda) mit Hilfe molekularer Methoden. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.

Wägele, H., 2004. Potential key characters in Opisthobranchia (Gastropoda, Mollusca) enhancing adaptive radiation. Organism Diversity & Evolution. 4: 175-188.

Wawra, E., 1986. Geschlechtsdimorphismus bei *Pontohedyle milaschewitchii* (Kowalevsky, 1901) (Gastropoda: Opisthobranchia). Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. 87: B: 325-329.

Werth, M., 2008. Genetic variability in the Mediterranean interstitial gastropod *Pontohedyle milaschewitchii* (Kowalevsky, 1901)(Opisthobranchia, Acochlidia). Diplomarbeit, Universität Wien.

Westheide, W., Hass-Cordes, E., Krabusch, M., Müller, M.C.M., 2003. *Ctenodrilus serratus* (Polychaeta : Ctenodrilidae) is a truly amphi-Atlantic meiofauna species - evidence from molecular data. Marine Biology 142: 637–642.

Westheide, W., Wawra, E., 1974. Organisation, Systematik und Biologie von *Microhedyle cryptophthalma* nov. spec. (Gastropoda, Opisthobranchia) aus dem Brandungsstrand des Mittelmeeres. Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen 26: 27-41.

Wright, S., 1978. Variability within and among populations. *Evolution and the genetics of populations*. 4. University of Chicago Press, Chicago.

Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *The Journal of Heredity* 92: 371-373.

Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei meinen Eltern Andreas und Erika, die mir in all den Jahren eine geistige, emotionale wie auch finanzielle Stütze waren. Ohne eure Hilfe wäre es mir niemals möglich gewesen, diese Arbeit zu schreiben und meine Ausbildung abzuschließen. Ich bedanke mich auch bei meinem Bruder Nikos, dass er für mich da war und mir die nötige Kraft gab.

Danke an meinen Betreuer Dr. Gerhard Steiner für seine Unterstützung, Anregungen, wie auch seine Geduld während dieser Arbeit. Dank ihm kam wieder Licht in den oft recht dunklen, wirren Wald voll mit all den Bäumen.

Danke an meine Arbeitsgruppe und an die Studenten und Mitarbeiter des Zentrallabors, für ihre Unterstützung und Mithilfe. Vor allem möchte ich mich bedanken bei Mag. Dr. Leyli Samadi für die professionelle Einführung in die Arbeit im Labor, bei MMag. Dr. Johannes Rath für die Sequenzierung meiner Proben, bei Mag. Dr. Eva Ringler, Mag. Christian Baranyi und Mag. Gerald Timelthaler für ihre Unterstützung im Labor und bei Mag. Dr. Emiliano Dell' Ampio für seine Freundschaft und die unterhaltsamen Kaffeepausen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Mag. Dr. Daniel Abed Navandi und MMag. Ivo Gallmetzer bedanken, für ihre Hilfe beim Beschaffen eines guten Proben-reichen Sandes in Rovinj. Außerdem gebührt allen Studenten der vergangenen Rovinj-Kurse (2010-2012) Dank für ihre Mithilfe beim Suchen und Identifizieren meiner Schnecken am Mesopsammon-Kurstag.

Im Speziellen geht mein Dank an meine Kollegen Christine Mayer und Christoph Ritschel, für ihre stete Unterstützung und Hilfe. Danke, dass wir so viel im Team gemeinsam erlebt haben, mit allen Höhen und Tiefen, sowohl im Labor, in den Praktika, als auch auf unseren abenteuerlichen Aufsammlungs – Reisen. Ohne Euch wäre es in all den Jahren lange nicht so lustig gewesen.

Danke an meine Freunde Agnes, Dora, Ifa, und Fanni, meinen Stiefvater Paul, meine Stiefmutter Barbara, meine beiden Großmütter Maria und Margarete, sowie an meine beiden Brüder Sebastian und Alexander. Danke dass ihr alle für mich da wart die letzten Jahre, mir Kraft gespendet habt, und dass ihr Teil meines Lebens seid!

Vor allem danke ich Christian, für seine Kraft und Stütze und für seinen guten Sinn für Humor. Danke dass du an meiner Seite stehst, für mich da bist, und es immer schaffst, mir ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern.

Lebenslauf

Daniela Trpisovsky

Geboren 1982 in Wien, Österreich

Schul- und Ausbildung

1989 – 1993 Besuch der Volksschule Berndorf (NÖ)

1993 – 1997 Besuch des Bundesrealgymnasiums Berndorf

1997 – 2002 Besuch der HBLA Baden für Mode und Bekleidungstechnik

2002 – 2004 Kolleg für Innenausbau und Möbelbau an der HTL-Mödling

Seit 2005 Studium der Biologie, Studienzweig Ökologie an der Universität Wien

Berufliche Tätigkeiten

Seit 2005 Tiergarten Schönbrunn

Mitarbeiterin des Besucherservice

Ferialpraxis in der Tierpflege

2010 – 2012 Universität Wien

Tutorin bei der Lehrveranstaltung: Einführung in die Flora und Fauna mariner Lebensräume – in Rovinj (Kroatien)