

HEMIKLONALE VERERBUNG IM HYBRIDOGENETISCHEN *RANA GRAFI-* KOMPLEX (ANURA: RANIDAE)

***AUSWIRKUNGEN AUF DIE GENETISCHE UND DEMOGRAPHISCHE
STRUKTUR VON POPULATIONEN IM RHONETAL, DEM
NATIONALPARK CAMARGUE UND MEDITERRANEN
KÜSTENGEBIETEN FRANKREICHS***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dirk Schmeller

geb. in Mannheim/Neckarau

Mainz, 1999

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 1999

meiner Familie

INHALT

KAPITEL 1: EINLEITUNG	1
KAPITEL 2: ZUR BIOLOGIE HYBRIDOGENETISCHER WASSERFRÖSCHE	4
2.1 Hybridogenese	4
2.2 Die Areale der verschiedenen europäischen Wasserfroschkomplexe	5
2.3 Die Biologie der untersuchten Taxa	6
2.3.1 Wasserfroschpopulationen	7
2.4 Introgression	9
2.5 Die evolutive Besonderheit der Hybridogenese	11
KAPITEL 3: MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 Probenbehandlung	15
3.2 Allozymelektrophorese	15
3.3 Taxonzugehörigkeit	17
3.4 DNA-Gehaltsbestimmung	18
3.5 Skelettochronologie	19
3.6 Geschlechtsbestimmung und Größenmessung	19
3.7 Populationsstruktur	20
3.8 Berechnung der Introgression	24
3.9 Genetische Parameter, Korrelationsanalysen und Populationsgruppen	24
KAPITEL 4: ERGEBNISSE	25
4.1 Demographie	25
4.1.1 Populationssysteme	27
4.1.2 Geschlechterverhältnis und Populationssystem	29
4.1.3 Unterschiede in der Populationsstruktur in bezug auf die geographische Position	31
4.1.4 Altersanalyse	35
4.2 Genetik	40
4.2.1 Genomexklusion	40

4.2.2	Genetische Variabilität	41
4.2.3	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	47
4.2.4	Introgression	49
4.2.5	Der Einfluß der Introgression auf die genetische Variabilität	54
4.2.6	Diagnostische Aussagekraft	56
4.2.7	Planimetrie	57
4.2.8	Flußzytometrie	60
KAPITEL 5: DISKUSSION		61
5.1	Hybridogenese und Geschlechterverhältnisse	61
5.2	Hybridogenese und genetische Variation	65
5.3	Introgression	66
5.3.1	Introgression bei den einzelnen Taxa	66
5.3.2	Hybridogenese und Introgression	67
5.3.3	Erweiterungen des ursprünglichen Modells der Hybridogenese	69
5.3.4	Warum ist Introgression in den einzelnen Taxa unterschiedlich stark ausgeprägt?	70
5.3.5	Der Einfluß der Introgression auf die genetische Variabilität	74
5.4	Altersanalyse	74
5.5	Ploidiegrad und DNA-Gehalt	76
5.6	Verbreitung der Taxa	77
KAPITEL 6: SCHLUßFOLGERUNG		79
6.1	Sekundäreffekte der Hybridogenese	81
KAPITEL 7: ZUSAMMENFASSUNG		83
KAPITEL 8: LITERATURVERZEICHNIS		85
DANKSAGUNG		94
LEBENS LAUF		96
APPENDIX		95

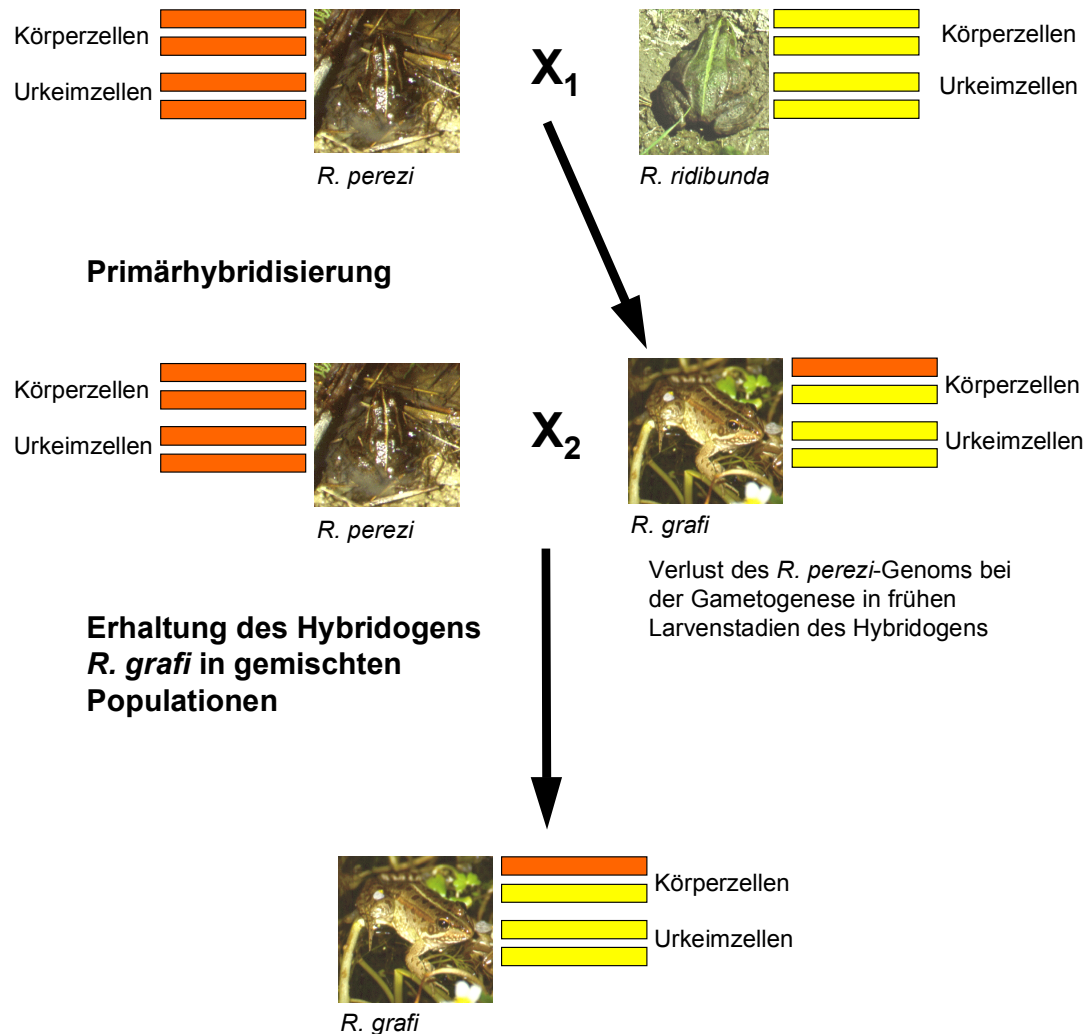
Kapitel 1: EINLEITUNG

Interspezifische Hybride sind im Tierreich nicht selten. Ein besonders populäres Beispiel stellen das Maultier bzw. der Maulesel dar. Vielen dieser Hybriden ist gemeinsam, daß sie eine stark reduzierte Fertilität besitzen oder sogar gänzlich unfruchtbar sind. Dabei ist hauptsächlich die Chromosomenfehlpaarung während der Meiose ein Aberrationsfaktor, der zum teilweisen oder vollständigen Verlust von Gameten führt.

Ein geringer Prozentsatz von Vertebratentaxa (z.B. *Poeciliopsis*, *Ambystoma*, *Rana (Pelophylax)*) zeigt fertile Hybride, die durch eine Primärhybridisierung zwischen den beiden Elternarten entstehen (X_1 ; Abb. 1-1). Diese Hybride scheinen sich aber ohne genetische Rekombination fortzupflanzen, da sie ein elterliches Genom bei der Gametogenese ausschließen und das verbleibende Genom klonieren. Taxa, die eine solche klonale Reproduktion zeigen, sind i.d.R. geographisch weit verbreitet, lokal sehr abundant und können in gestörten Habitaten überleben. Besonders letzteres wird durch den hohen Anteil heterozygoter Genorte erklärt (Hotz *et al.* 1999).

Der bei der tropischen Fischgattung *Poeciliopsis* erstmals beschriebene hemiklonale Fortpflanzungsmodus der Hybridogenese (Schultz 1969) eröffnet durch die Vermeidung von Schwierigkeiten in der Meiose solchen Hybriden eine Möglichkeit ihre Fruchtbarkeit zu erhalten und sich fortzupflanzen (Tunner und Heppich 1981; Bucci *et al.* 1990). Während der hybridogenetischen Gametogenese wird der vollständige Chromosomensatz eines Elternteils vor der meiotischen Teilung eliminiert. Der verbleibende Chromosomensatz wird nachfolgend endoredupliziert (z.B. Berger 1988a), durchläuft eine normale Meiose und führt zu allodiploiden Gametocyten (Graf und Müller 1979; Heppich *et al.* 1982). Dabei scheint die Eliminierung gerichtet zu sein und immer den Chromosomensatz der syntopen Elternform zu betreffen (Uzzell *et al.* 1977). Es wird diskutiert, daß verschiedene Hybridlinien oder auch einzelne Hybride unterschiedliche Gameten produzieren, deren Fortpflanzungserfolg von der An- bzw. Abwesenheit einer der Elternarten abhängt (Schröer 1997). Die Richtung der Genomeliminierung ist deshalb grundsätzlich auf Selektion der einen oder

anderen Hybridlinie aufgrund des Fortpflanzungserfolgs zurückzuführen. Der Hybridogen produziert also hauptsächlich solche Gameten, die den Chromosomensatz der allotypen Elternart enthalten. Um sich erhalten zu können, muß sich der Hybrid deshalb immer mit der syntopen Elternform rückkreuzen (X_2 ; Abb. 1-1). Die Nachkommenschaft dieser Paarungen führt theoretisch zu F_1 -Hybriden und nicht zu F_2 -Rückkreuzungstypen, da eine Re-



Verändert nach Beerli
<http://evolution.genetics.washington.edu/PBhtmls/hybridogenesis.html>

Abb. 1-1: Die Entstehungswege des Hybridogens *R. grafi*. Zum einen entsteht *R. grafi* durch Primärhybridisierung der beiden Parentalarten *R. ridibunda* und *R. perezii* (X_1), zum anderen durch Kreuzung zwischen dem Hybridogen und *R. perezii* (X_2).

kombination der beiden Genome durch die prämeiotische Exklusion eines Chromosomensatzes nicht möglich ist. Die Aufteilung des Gametenpools des Hybridens bei Syntopie beider Elternarten und des Hybridens ist bisher unklar, da solche Populationen bisher nur selten eingehend untersucht worden sind (Günther 1990, s.u.).

Zur Beschreibung hybridogenetischer Komplexe wurden zwei neue Begriffe in die Systematik eingeführt – Klepton (griech. = Dieb) und Synklepton. Nach Polls Pelaz (1994) ist ein

Klepton eine Gemeinschaft von Populationen mit einem Hybridgenom, das sich von der selben Elternart herleitet. Die Hybridlinie ist dabei reproduktiv abhängig von der sympatrischen Elternart, die die Rolle eines sexuellen Wirtes spielt (*A klepton is a community of populations with a hybrid genome derived from the same parental species, reproductively dependent upon sympatric species that play the role of a sexual host*). Als Synklepton bezeichnet man die Gesamtheit eines hybridogenetischen Komplexes, der aus den beiden Elternarten und deren Hybridogen besteht.

Die Hybridogenese wurde kurz nach der Entdeckung bei der tropischen Fischgattung *Poeciliopsis* durch Schultz (1969) auch bei Wasserfröschen gefunden (Tunner 1970) und steht nun seit fast drei Jahrzehnten im Mittelpunkt der Wasserfroschforschung in Europa. Dabei lag der Forschungsschwerpunkt auf dem weitverbreiteten hybridogenetischen Komplex, der durch *Rana ridibunda* (PALLAS, 1771), *Rana lessonae* (CAMERANO, 1882) und deren Hybrid *Rana esculenta* (LINNAEUS, 1758) gebildet wird. Die Nomenklatur sieht vor, daß ein hybridogenetischer Komplex (Synklepton) mit dem jeweiligen Anfangsbuchstaben der nicht-*R. ridibunda* Art und des Hybriden bezeichnet werden (Pagano *et al.* 1997) – in obigem Fall also LE-Komplex. Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Komplex wird PG-Komplex genannt und wird gebildet durch *R. ridibunda*, *Rana perezi* (SEOANE, 1885) und deren Hybrid *Rana grafi*.

An dieser Stelle sei nur kurz erwähnt, daß mindestens ein weiteres Wasserfroschsynklepton in Italien gefunden wurde (BH-Komplex). Auch hier ist *R. ridibunda* die eine Elternart. Die andere Elternart ist ein naher Verwandter von *R. lessonae* und wurde als *Rana bergeri* (GÜNTHER, 1986) beschrieben. Den Hybrid dieses Komplexes nennt man *Rana hispanica* (BONAPARTE, 1839; nach Dubois und Ohler 1994).

Die vorliegende Arbeit präsentiert Daten zur Verbreitung der Taxa *R. perezi*, *R. ridibunda* und *R. grafi* im Rhonetal und -delta und in mediterranen Küstengebieten Südfrankreichs und analysiert die genetische und demographische Struktur der untersuchten Populationen. Besonders der Einfluß des Fortpflanzungsmodus Hybridogenese auf das Geschlechterverhältnis und die genetische Variation der involvierten Taxa steht im Vordergrund der Analyse. Im Vergleich der erhobenen Daten des PG-Komplexes mit früher veröffentlichten Daten des zentraleuropäisch verbreiteten LE-Komplexes wird versucht, eine Erklärung zur Evolution der Hybridogenese zu geben.

Kapitel 2: ZUR BIOLOGIE HYBRIDOGENETISCHER

WASSERFRÖSCHE

2.1 HYBRIDOGENESE

Der Fortpflanzungsmodus Hybridogenese wurde nicht nur bei den Vertebratengattungen *Poeciliopsis* (Schultz 1969, Vrijenhoek 1993) und *Rana (Pelophylax)* (Tunner 1970) entdeckt, sondern auch bei der Insektengattung *Bacillus* (Mantovani und Scali 1992, Tinti und Scali 1995). Eine monophyletische Entstehung der Hybridogenese ist deshalb weitestgehend auszuschließen.

Die Hybridogenese ist ein typisches Beispiel einer Modellvorstellung, die postuliert wurde, um ein mit den bisherigen Kenntnissen nicht erklärbares Phänomen begreifbar zu machen. Dabei erklärt das von Tunner (1970, 1974) vorgeschlagene Modell (Abb. 1-1) sehr gut die beobachteten Genotypen von *R. esculenta*. Cytologische Daten konnten das Modell aber bisher bezüglich der Genomeliminierung nicht bestätigen, weshalb es in dieser Form in Frage gestellt werden muß (Ogielska 1994b). Von den cytologischen Vorgängen ist lediglich bekannt, daß der Eliminierungszeitpunkt in einer frühen Entwicklungsphase und vor der Meiose liegt (Uzzell *et al.* 1980), da in allen Prägameten bereits die Genome der Elternarten getrennt zu sein scheinen (Ogielska 1994b). Zwei mögliche Wege der Genomeliminierung erscheinen denkbar, sie findet (i) während der Interphase durch enzymatische Degradation des Chromatins oder (ii) während der Mitose statt (Ogielska 1994b). Bei der Trennung der verschiedenen Genome könnte heterochromatische DNA eine Schlüsselrolle zur Unterscheidung der *R. ridibunda*- und *R. lessonae*-Chromosomen spielen. Dabei wurde postuliert, daß die Spindelfäden spezifisch an diese Stellen der Chromosomen binden und die im Cytosol verbleibenden Chromosomen bei der darauffolgenden Zellteilung verloren gehen (Bucci *et al.* 1990; Ragghianti *et al.* 1995).

Für den Verlust eines Genoms könnten weiterhin "Nucleus like bodies" (NLB) verantwortlich sein, die sich aus Ausstülpungen des Zellkerns herleiten lassen und Fragmente eines Genoms enthalten (Abb. 2-1, Ogielska 1994b). Da die NLBs aber weder häufig noch groß genug sind, um ein vollständiges Genom auszuschließen, kommen sie als alleinige Möglichkeit der Eliminierung nicht in Frage (Ogielska, pers. Mitt. 1998).

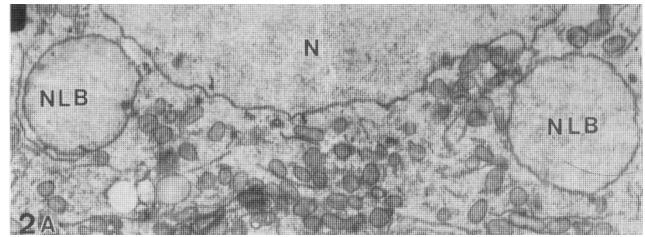


Abb. 2-1: Rekonstruktion von Nucleus like bodys (NLB) in einem Interphasekern (N) des Larvalstadiums 29-31 von *R. esculenta*-Larven (nach Ogielska 1994).

Aufgrund der Ergebnisse aus früheren Studien postulierte Polls Pelaz (1994) vier unterschiedliche Hybridogenese-Modi und bezieht sich bei der Namengebung auf die Tatsache, daß grundsätzlich das *R. ridibunda*-Genom beteiligt ist. Die am weitesten verbreitete Hybridogenese-Form, bei der das nicht-*R. ridibunda*-Genom ausgeschlossen wird, nennt dieser Autor dann „R“-Hybridogenese. Als „anti-R“-Hybridogenese wird der seltene Fall der Exklusion des *R. ridibunda*-Genoms bezeichnet. In manchen Hybriden treten diploide Gameten auf, d.h. kein Genom wurde während der Gametogenese ausgeschlossen. Dieser Modus wird als „poly-R“-Hybridogenese bezeichnet. Der interessanteste Modus ist die „R+anti-R“-Hybridogenese, bei der Gameten beider Elternarten im selben Hybrid gebildet werden. Mehrere Studien konnten den letztgenannten Modus durch experimentelle Daten belegen (Günther 1975a; Günther und Hähnel 1976; Vinogradov *et al.* 1990; 1991).

2.2 DIE AREALE DER VERSCHIEDENEN EUROPÄISCHEN WASSERFROSKOMPLEXE

Die weiteste Verbreitung der drei bisher bekannten europäischen Wasserfroschkomplexe besitzt der LE-Komplex. Die Arealgrenzen des *R. esculenta*-Synkleptons liegen im Norden in Südschweden (60°N), im Nordosten im Wolga-Becken, im Osten reichen sie bis zum Schwarzen Meer, im Süden bis zum Zentralmassiv in Frankreich und entlang der Rhône bis zur Camargue, im Südosten sind LE-Populationen bis nach Nordslowenien und einem Teil des Po-Beckens zu finden (44°N; Berger 1988a; Günther 1997; eigene Beobachtungen; vgl. Abb. 2-2). Das Ausbreitungsgebiet des *R. grafi*-Synkleptons ist um ein Vielfaches kleiner. Das Areal reicht von der Atlantikküste Westfrankreichs und Nordspaniens im Nordwesten bis in die Umgebung von Cannes im Nordosten (Hotz *et al.* 1994b). Die südliche Verbreitungsgrenze liegt im Ebro-Tal in Nordostspanien (Berger 1988a, Günther 1990). Dieses Areal ist somit in etwa 10 mal kleiner als das des *R. esculenta*-Synkleptons. Eine rezente Ausbreitung dieses Komplexes auf der Iberischen Halbinsel wird allerdings angenommen (Arano *et al.* 1994).



Abb. 2-2: Verbreitungsgrenzen der hybridogenetischen Wasserfroschkomplexe in Europa.

Die genauen Verbreitungsgrenzen des BH-Synkleptons sind nicht bekannt. Bisherige Daten zeigen allerdings, daß es auf Süditalien beschränkt zu sein scheint (Günther und Plötner 1994, vgl. Abb. 2-2).

2.3 DIE BIOLOGIE DER UNTERSUCHTEN TAXA

Die größte Form der europäischen Wasserfroschtaxa ist *R. ridibunda*, die Kopf-Rumpflängen (KRL) von bis zu 13 cm erreichen kann. Die geringe Sauerstoffbindungskapazität seines Blutes (Nopp und Tunner 1985) erlaubt es *R. ridibunda* nur solche Habitate zu besiedeln, die ständig mit Frischwasser versorgt werden (Morand *et al.* 1998). Dieses Taxon findet man deshalb immer im Überschwemmungsbereich größerer Flüsse. Eine besondere ökologische Eigenheit von *R. ridibunda* ist, daß es sich dabei um die einzige „echte“ Wasserfroschart in Europa handelt, da sie unter Wasser hiberniert. Eine weitere Besonderheit dieser Wasserfroschart ist die geographisch unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit Hybridogenese zu induzieren. Nur *R. ridibunda* aus Mitteleuropa scheint hierzu fähig zu sein, wohingegen *R. ridibunda* aus dem heutigen Kroatien dies nicht vermag (Hotz *et al.* 1985).

R. lessonae erreicht eine mittlere KRL von etwa 8 cm. Der bevorzugte Lebensraum sind kleine Tümpel und Seen, aber auch Kiesgruben oder ähnliche Gewässer werden besiedelt. Durch die schlechte Sauerstoffversorgung solcher Gewässer ist *R. lessonae* gezwungen, an Land zu überwintern.

Der Hybrid der oben beschriebenen Arten, **R. esculenta**, ist ökologisch sehr plastisch. Er nimmt in Größe, Form und Ökologie eine intermediäre Stellung zwischen den Elternarten ein. Diese Wasserfroschform besiedelt sowohl *R. ridibunda*-typische, wie auch *R. lessonae*-typische Habitate und kommt bei Abwesenheit einer der beiden Elternarten und in Abhängigkeit des Gewässertyps in hoher Dichte vor. Intermediär ist auch das Hibernationsverhalten, da die Tiere sowohl im Gewässer als auch an Land überwintern, je nach den Sauerstoffbedingungen des Gewässers (Günther 1996, Morand und Joly 1995, Morand *et al.* 1998).

Über die Biologie von **R. perezii** ist nur wenig bekannt. Diese Art scheint aber die ökologische Nische von *R. lessonae* in Südwesteuropa zu besetzen, da sich beide Arten sowohl in Größe und Habitatpräferenz sehr ähneln. Im Südwesten Spaniens dauert die Reproduktion von *R. perezii* von Februar bis Juni, wobei die ersten Larven schon im April bis Mai beobachtet werden können (Diaz-Paniagua 1987). Eigene Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß im Gebiet des Nationalparks Camargue, u.U. bedingt durch das maritime Klima, sich die Fortpflanzungsperiode bis in den Spätsommer zieht. Es konnten zwar nie Tiere im Amplexus beobachtet werden, doch wurden sehr viele rufende Männchen gehört (Oktober; Jakob, pers. Mitt. 1998) und einige eitragende Weibchen gefangen (Anfang September). Nur in der Zeit von Mitte Dezember bis Ende Januar konnten keine Tiere beobachtet werden (Jakob, pers. Mitt. 1998).

R. grafi nimmt ebenso wie *R. esculenta* eine Zwischenstellung zwischen seinen Elternarten, *R. perezii* und *R. ridibunda*, ein. Auch hier gilt, daß der Hybrid ökologisch wesentlich plastischer ist als die Elternarten und die unterschiedlichsten Habitattypen besiedelt (Morand und Joly 1995, Morand *et al.* 1998, eigene Beobachtungen).

2.3.1 WASSERFROSCHPOPULATIONEN

In diesem Kapitel soll kurz anhand von Studien am LE-Komplex die Vielfalt von Wasserfroschpopulationen aufgezeigt werden, die sich aus der Besonderheit aller Wasserfrösche gemischte Populationen zu bilden, ableitet. Die einzelnen Populationen lassen sich durch die Frequenz der unterschiedlichen Taxa und deren Geschlecht charakterisieren. Das sympatrische Vorkommen dreier Wasserfroschformen wurde nur selten beschrieben (z.B. Günther 1975b, Kotlík und Sulová 1994).

In Mitteleuropa sind die nachfolgenden Populationssysteme am weitesten verbreitet (Günther 1990):

- Reine *R. esculenta*-Populationen
- *R. esculenta*-*R. lessonae*-Populationen (*R. esculenta* dominiert)
- *R. lessonae*-*R. esculenta*-Populationen (*R. lessonae* dominiert)
- *R. esculenta*-*R. ridibunda*-Populationen (beim Hybrid treten beide Geschlechter auf)
- *R. ridibunda*-*R. esculenta*-Population (beim Hybrid finden sich nur Männchen)

Interessant bei der Beschreibung und Charakterisierung der einzelnen Populationssysteme sind neben Paarungspräferenzen beider Geschlechter eines Taxons auch die Geschlechterverhältnisse, die in Kreuzungsexperimenten gefunden wurden. Ökologische Studien an natürlichen Populationen mit *R. lessonae* und *R. esculenta* konnten zeigen, daß *R. esculenta*-Weibchen sich nicht zufällig mit *R. lessonae*- bzw. *R. esculenta*-Männchen paaren, sondern eine Paarungspräferenz für *R. lessonae*-Männchen zeigen (Abt und Reyer 1993; Engeler 1994; Bergen *et al.* 1997). *R. esculenta*-Männchen scheinen im Gegensatz dazu bei der Partnerwahl nicht gezielt vorzugehen, sondern versuchen sich mit Weibchen beider Taxa gleichermaßen zu paaren (Engeler 1994).

Als Grund hierfür wird von diesen Autoren einerseits die hohe Inkompatibilität der hemiklonal vererbten *R. ridibunda*-Genome angeführt, andererseits ist für weite Teile des Tierreiches bekannt, daß Weibchen wesentlich höhere Reproduktionskosten zu tragen haben als Männchen, sich oft nur einmal pro Saison paaren und sie deshalb schon viel wählerischer mit ihrem Reproduktionspotential umgehen müssen (Trivers 1972). Bergen *et al.* (1997) konnten beobachten, daß *R. esculenta*-Weibchen dann einen Teil ihrer Eier ablegen, wenn sie sich mit einem *R. esculenta*-Männchen im Amplexus befinden, um dieses loszuwerden. Die verbleibenden Eier werden für eine weitere Paarung zurückgehalten und damit die Möglichkeit offengehalten sich mit *R. lessonae*-Männchen erfolgreich zu verpaaren. Abt und Reyer (1993) konnten darüber hinaus feststellen, daß weder die Aktivität noch die Größe des Männchens, sondern einzig der Phänotyp (= Taxon) für die Partnerwahl des Weibchens ausschlaggebend zu sein scheint.

Die Geschlechtsbestimmung bei Wasserfröschen folgt dem weit verbreiteten heterogamischen Typus, wobei das Männchen den Genotyp XY zeigt. Für *R. esculenta* ist bekannt, daß mindestens eine weitere Kontrollregion, die nicht Y-gekoppelt ist, an der Geschlechtsausprägung beteiligt ist (Berger *et al.* 1988). Berger, der schon mit seinen frühen Kreuzungsexperimenten die Wasserfroschforschung in den Mittelpunkt des Interesses rückte, führte eine Vielzahl an künstlichen Kreuzungen zwischen vielen der bekannten Wasserfroschtaxa durch (Übersicht in Berger 1994). Bei vielen seiner Kreuzungsergebnisse fiel die

starke Diskrepanz zwischen dem bei bisexuellen Arten zu erwarteten 1:1-Verhältnis zwischen Männchen und Weibchen und den beobachteten Verhältnissen auf.

An dieser Stelle sollen nur die für die vorliegende Arbeit interessanten Ergebnisse dieser Kreuzungsexperimente bezüglich der Geschlechterverhältnisse dargestellt werden. Kreuzungen zwischen *R. esculenta*-Weibchen und *R. ridibunda*-Männchen resultierten in einem großen Anteil an Weibchen und einem kleinen Anteil Männchen (18:1). Paarungen zwischen einem *R. perezi*-Männchen und *R. esculenta*- bzw. *R. ridibunda*-Weibchen hatten eine rein weibliche Nachkommenschaft. Primärhybridisierungen zwischen *R. ridibunda*-Männchen und *R. lessonae*-Weibchen resultierten in *R. esculenta* Männchen, die Gameten mit einem Y-Chromosom produzierten. Die reziproke Paarung hingegen führte zu *R. esculenta* Männchen, die nur weibliche Gameten erzeugten.

2.4 INTROGRESSION

Schon früh erkannte man, daß es keine perfekte Hybridogenese zu geben scheint, da rekombinierte Tiere in geringer Frequenz gefunden wurden (Binkert *et al.* 1982, Eikhorst 1988). Dieser Befund steht im Kontrast zur Modellvorstellung der Hybridogenese, da der Ausschluß des einen Genoms schon früh in der Gametogenese stattfindet und Rekombinationsereignisse sich lediglich zwischen den klonierten Chromosomensätzen des verbliebenen Genoms ereignen und deshalb genetisch nicht nachweisbar sind. Uzzell *et al.* (1977) erklärten ihre Ergebnisse deshalb mit einer „leaky hybridogenesis“ – einer undichten Hybridogenese. Uzzell (1982) sieht die Quelle der Introgression, also die Inkorporation artfremder Allele in den eigenen Genpool, in Irregularitäten der hybridogenetischen Gametogenese, nennt aber keine cytologischen Details. Günther und Plötner (1988) machten Zelllinien, die mit hybridogenetischen Zelllinien koexistieren und Chromosomen beider Elternarten enthalten, für Introgression verantwortlich.

Ein weitere Ursache für Introgression könnte eine unvollständige Eliminierung eines der beiden Elterngenome sein. Aneuploide Oocyten, wie sie von Tunner und Heppich-Tunner (1991) in 15% ihrer Proben gefunden wurden, sind als mögliches Indiz hierfür zu werten. Berger *et al.* (1994) konnten feststellen, daß *R. esculenta* in niedriger Frequenz Gameten produziert, die nicht wie erwartet das *R. ridibunda*-Genom enthalten, sondern das von *R. lessonae*. Dieses Ergebnis wird durch flußzytometrische Untersuchungen von Vinogradov *et al.* (1991) unterstützt. In dieser Studie wurden unterschiedliche DNA-Gehalte, spezifisch für *R. ridibunda* und *R. lessonae*, in Gameten eines *R. esculenta* gefunden. Unterschiedliche Gametentypen wurden bereits von Uzzell *et al.* (1975) bei *R. esculenta* entdeckt. Dabei produzierten diese Tiere haploide und in geringerem Umfang diploide Gameten. Von welcher Art die unterschiedlichen Chromosomensätze stammten, konnte damals nicht geklärt werden.

Uzzell *et al.* (1977) faßten die Grundvoraussetzungen für eine nachweisbare Introgression wie folgt zusammen: (a) die Genome der Elternarten müssen rekombinieren, (b) ein rekombiniertes Genom muß sich während der Befruchtung mit einem Parentalgenom paaren, (c) die so gebildete Zygote muß überleben und sich erfolgreich reproduzieren, (d) die so gewonnenen Genotypen dürfen durch genetische Drift und/oder natürliche Selektion nicht verlorengelangen. Die Wahrscheinlichkeit, daß diese Grundannahmen alle erfüllt werden, scheinen sehr gering zu sein. Die Wahrscheinlichkeit, Introgression zu detektieren, wird weiterhin durch die verwendete Methode verringert. Es könnte deshalb erwartet werden, daß Introgression, die unter Verwendung von Allozymelektrophorese nachgewiesen wurde, niedriger ist als die tatsächliche Introgression.

Frühere Studien am LE-Komplex konnten zeigen, daß *R. ridibunda* grundsätzlich eine wesentlich höhere Introgression aufweist als *R. lessonae* und *R. esculenta*. Der Hybrid nimmt dabei in den meisten Studien eine Zwischenstellung ein (Tab. 2-1). Dies ist dadurch zu erklären, daß die Hybridogenese, durch den Ausschluß des *R. lessonae*-Genoms die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fortpflanzung eines rekombinierten Genoms dieser Art reduziert. Im Gegensatz dazu wird die Fortpflanzung eines rekombinierten *R. ridibunda*-Genoms durch die Hybridogenese eher forciert, da es zu einer Klonierung dieses Genoms im Hybrid kommt, der reproduktiv wie *R. ridibunda* funktioniert.

Tab. 2-1: Literaturdaten zur Introgression im LE-Komplex. A. Loci = Anzahl der untersuchten Loci; I = Introgression; Rekomb. Genotypen = prozentualer Anteil rekombinierter Genotypen der untersuchten Individuen.

Taxon	Herkunft	A. Loci	I	Rekomb. Genotypen	Referenz			
<i>R. esculenta</i>	Polen	5	1.2%	3.7%	Uzzell und Berger 1975			
<i>R. lessonae</i>			2.2%	4.5%				
<i>R. ridibunda</i>			7.8%	15.6%				
<i>R. esculenta</i>	Ostdeutschland	1		5.7%	Günther und Hähnel 1976			
<i>R. lessonae</i>			0.9%	1.9%				
<i>R. ridibunda</i>			9.7%	19.4%				
<i>R. esculenta</i>	Ostdeutschland	1	3.1%	6.2%	Koref-Santibanez und Günther 1980			
<i>R. lessonae</i>			2.2%	4.3%				
<i>R. ridibunda</i>			4.0%	7.9%				
<i>R. esculenta</i>	Ostdeutschland	5	3.3%	6.5%	Plötner und Klinkhardt 1992			
<i>R. esculenta</i>			Westdeutschland	7		13.0%	82.7%	Schröder 1997
<i>R. lessonae</i>						12.5%	87.9%	
<i>R. ridibunda</i>	13.6%	85.8%						
<i>R. esculenta</i>	Zentralfrankreich	3	5,8%	34,8%	Pagano und Schmeller 1999			
<i>R. lessonae</i>			2,1%	12,5%				

2.5 DIE EVOLUTIVE BESONDERHEIT DER HYBRIDOGENESE

Die evolutive Besonderheit einer erfolgreichen Etablierung der Hybridogenese in Wasserfröschen wird auch nach über 30 Jahren intensiver Forschung kontrovers diskutiert. Berger *et al.* (1994) sehen in *R. esculenta*, dem Hybriden des LE-Systems, eher ein genomisches „Faß ohne Boden“ als eine genetische Brücke zweier Arten. Interessanterweise gelang es dem *R. ridibunda*-Genom über ganz Europa verbreitet zu werden, obwohl *R. ridibunda* aufgrund seines Sauerstoffbedarfs eine eher stenöke Art ist. Dabei diente vor allem der Hybrid *R. esculenta* als Vektor, aber auch Hybride aus anderen hybridogenetischen Wasserfroschsystemen dienen der Verbreitung des *R. ridibunda*-Genoms. Die größere ökologische Plastizität dieser Hybride ermöglicht es dem *R. ridibunda*-Genom auch ungünstige Landschaften zu „durchqueren“ und pessimale Zeiten zu überstehen (Günther 1990).

Trotz dieser scheinbaren Vorteile zeigten Kreuzungsexperimente (Berger *et al.* 1988, Berger 1994), daß aus Hybrid X Hybrid-Kreuzungen ausschließlich weibliche *R. ridibunda*-Nachkommen hervorgingen. In Hybridlinien, die schon sehr lange rein hybridogenetisch, also nur in Syntopie mit einer Elternart bestehen, tritt ferner das Phänomen der Akkumulation letaler Mutationen auf (Mullers Ratchet; Muller 1964). Die prämeiotische Genomexklusion läßt Rekombination zwischen den beiden parentalen Genomen theoretisch nicht zu und die hemiklonale Vererbung des *R. ridibunda*-Genoms verhindert durch die fehlende phänotypische Ausprägung letaler Mutation die Selektion. Nur bei Homozygotie solcher Letalmutationen, die in hybridogenetischen Systemen bei Hybrid X Hybrid-Kreuzungen entstehen, kann Selektion einsetzen.

Hybrid X Hybrid-Kreuzungen solcher genetischer Linien führen deshalb oft nur zu einer unfitten *R. ridibunda*-Nachkommenschaft, die in frühen Entwicklungsstadien abstirbt. Nur wenige *R. ridibunda* aus solchen Kreuzungen erreichen das Adultstadium (Blankenhorn *et al.* 1971; Günther 1973; Hotz *et al.* 1994a). Eine Minimierung des Verlustes großer Teile der Nachkommenschaft aus Hybrid X Hybrid-Kreuzungen durch Letalmutationen wird nur durch Genfluß zwischen den Elternarten über Rekombinationsprozesse während der Gametogenese der Hybriden erreicht. Dennoch muß für eine Populationsgründung postuliert werden, daß Hybrid X Hybrid-Kreuzungen nicht ausschließlich zu weiblichen *R. ridibunda* führen (Günther 1983).

In verschiedenen Studien (Tab. 2-1) wurden Rekombinationsprozesse zwischen den Genomen von *R. lessonae* und *R. ridibunda* eindeutig nachgewiesen. Dies eröffnet *R. ridibunda* eine weitere Möglichkeit von der Hybridogenese zu profitieren, indem diese Art vorteilhafte Allele aus dem Genpool der anderen Elternart in seinen eigenen Genpool eingliedert. Unter den Annahmen für erfolgreiche Rekombination (Uzzell *et al.* 1977; s.o.) und selektionsneutraler, rekombinierter Multilocusgenotypen (MLGs) kann diese Hypothese u.U. auch die Evolution eines egoistischen Faktors im *R. ridibunda*-Genom erklären. Hier-

bei würden solche *R. ridibunda*, die Hybridogenese zu induzieren vermögen, ähnlich einem genomischen Parasiten agieren.

Ungeklärt ist bisher, warum hybridogenetische Populationssysteme trotz des Entzugs von Reproduktionspotential der Elternarten durch den Hybriden stabil sind. Die folgenden Regulationsmechanismen sollen nach Günther (1983) das Überleben einer hybridogenetischen Population garantieren:

- reduzierte Fertilität der Hybriden durch Entwicklungsstörungen der Gonaden (*R. esculenta* developmental syndrom, Ogielska 1994a)
- Verstärkung der Elternpopulationen durch Auskreuzungen bei Hybrid X Hybrid-Paarungen.
- das genetische Material kann in Form der ökologisch wesentlich plastischeren Hybridform pessimale Zeiten besser überstehen
- Bevorzugung von *R. esculenta*-Weibchen in RE-Populationen genauso wie in LE-Populationen

Genetische Analysen haben gezeigt, daß sich *R. perezi* und *R. saharica* schon sehr früh von der genetischen Linie der anderen Wasserfroscharten abgespaltet haben müssen (Uzzell 1982; Hotz *et al.* 1985; Berger *et al.* 1994; Beerli 1994; Plötner 1998). Diese beiden Arten sind mit *R. ridibunda* genetisch viel weniger eng verwandt, als *R. lessonae* oder *R. bergeri*. Hotz *et al.* (1994b) sehen in Studien am PG-Komplex deshalb eine wichtige Möglichkeit, Vergleiche zum gut untersuchten LE-Komplex zu ziehen, um allgemeinere Schlußfolgerungen bezüglich der Evolution der Hybridogenese zu erhalten.

Studies on the "...PG-complex provide an important comparative opportunity to assess the generality of evolutionary genetic, ecological and behavioral results obtained for the well studied LE-system" (Hotz et al. 1994b).

Kapitel 3: MATERIAL UND METHODEN

Die Wasserfrösche der Gattung *Rana* (*Pelophylax*) wurden an 31 Stellen im Rhône-tal und mediterranen Küstengebieten Frankreichs gesammelt (Abb. 3-1). Zu Vergleichszwecken wurden Gewebeproben von *R. perezi* aus Spanien, von *R. ridibunda* aus Polen (Poznan) und Frankreich (Lyon) und *R. esculenta* bzw. *R. lessonae* aus Slowenien (Gomilsko und Dravsko polje) und Norditalien (Pesina) herangezogen (96 Tiere). Es wurden inklusive der Referenzen 1014 Tiere analysiert.

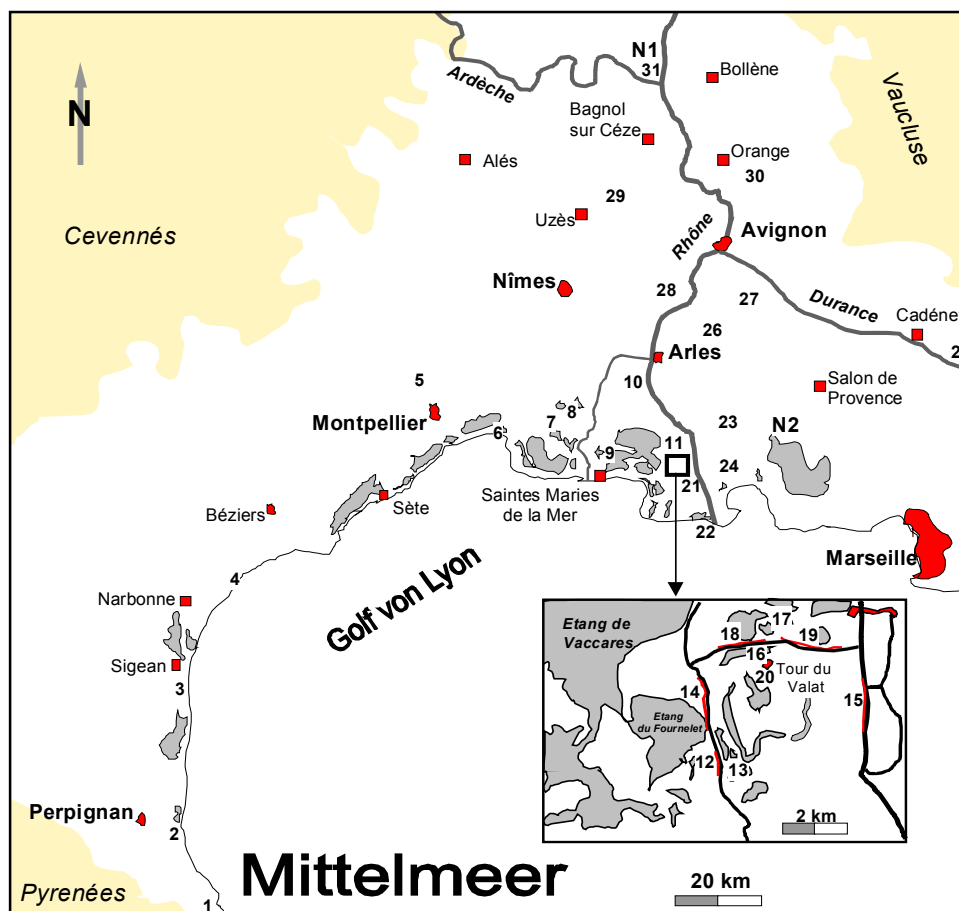


Abb. 3-1 : Probenentnahmestellen. N1 und N2 stellen die später verwendeten geographischen Nullpunkte dar (vgl. Text unten).

14 der beprobten Habitats liegen im französischen Nationalpark La Camargue, der durch das Rhônedelta gebildet wird (Abb. 3-1). Charakteristisch für den Park ist eine große Vielfalt von Habitattypen, die von flachen, temporären Tümpeln, über Bewässerungs- bzw. Entwässerungskanälen, bis zu großflächigen, permanenten, aber flachen Seen reichen (Tab. 3-1). Allerdings können nur etwa 40% des etwa 800 km² großen Gebietes als natürlich angesehen werden. Das anthropogene Management der Hydrologie zur Reiskultivierung und für den Schutz von meeresexponierten Sandbänken veränderte das Rhônedelta nachhaltig. Hinzu kommt der jährlich wachsende Tourismus (Pearce und Crivelli 1994). Die Großflächigkeit des Gesamtgebietes und die Zentrierung des Tourismus auf wenige Ortschaften erlauben es dennoch, den anthropogenen Einfluß für größere Teilgebiete zu minimieren. Dadurch wird die Camargue zu einem einzigartigen Untersuchungsgebiet.

Tab. 3-1: Habitattypen und GPS-Koordinaten der beprobten Populationen. Die angegebene Nummer (Nr.) stimmt mit den Angaben in der Karte in Abb. 3-1 überein.

Nr.	Habitattyp	Koordinaten	Nr.	Habitattyp	Koordinaten
01	Kanal	42°38.39 N, 4°38.88 E	17	Temporärer Tümpel	43°31.30 N, 4°40.44 E
02	Fluß	42°39.14 N, 2°54.39 E	18	Straße	43°30.31N, 4°38.25 E
03	Kanal	43°00.47 N, 3°02.56 E	19	Straße	43°30.37 N, 4°41.23 E
04	Bach	43°15.30 N, 3°10.90 E	20	Bewässerungskanal	43°30.32 N, 4°40.02 E
05	Fluß	43°48.34 N, 3°45.60 E	21	Straße	43°29.26 N, 4°43.26 E
06	Permanenter Tümpel	43°33.23 N, 3°54.21 E	22	Permanenter Teich	43°22.23 N, 4°48.33 E
07	Straße	43°33.66 N, 4°12.61 E	23	Temporärer Tümpel	43°32.20 N, 4°45.31 E
08	Tümpel	43°36.43 N, 4°20.34 E	24	Entwässerungskanal	43°27.99 N, 4°52.86 E
09	Temporärer Teich	43°36.43 N, 4°20.34 E	25	Schmaler Kanal	43°45.16 N, 5°13.45 E
10	Permanenter Teich	43°38.86 N, 4°35.92 E	26	Entwässerungskanal	43°47.15 N, 4°57.10 E
11	Straße	43°33.04 N, 4°37.77 E	27	Bewässerungskanal	43°48.01 N, 4°56.10 E
12	Straße	43°28.38 N, 4°38.50 E	28	Permanenter Tümpel	43°54.10 N, 4°40.32 E
13	Bewässerungskanal	43°28.71 N, 4°38.99 E	29	Weitläufiger Etang	44°02.33 N, 4°32.17 E
14	Straße	43°29.20 N, 4°38.30 E	30	Permanenter Tümpel	44°05.20 N, 4°48.33 E
15	Straße	43°30.29 N, 4°42.26 E	31	Flußaue	44°16.30 N, 4°38.45 E
16	Entwässerungskanal	43°30.50 N, 4°40.18 E			

3.1 PROBENBEHANDLUNG

Die Frösche wurden entweder nachts mit der Hand oder Netzen gefangen. Zusätzlich wurden modifizierte Fischreusen unterschiedlicher Größe eingesetzt. Die Größenunterschiede der Reusen sollten es ermöglichen, auch die verschiedenen Größenklassen der Frösche zu fangen (Abb. 3-2).

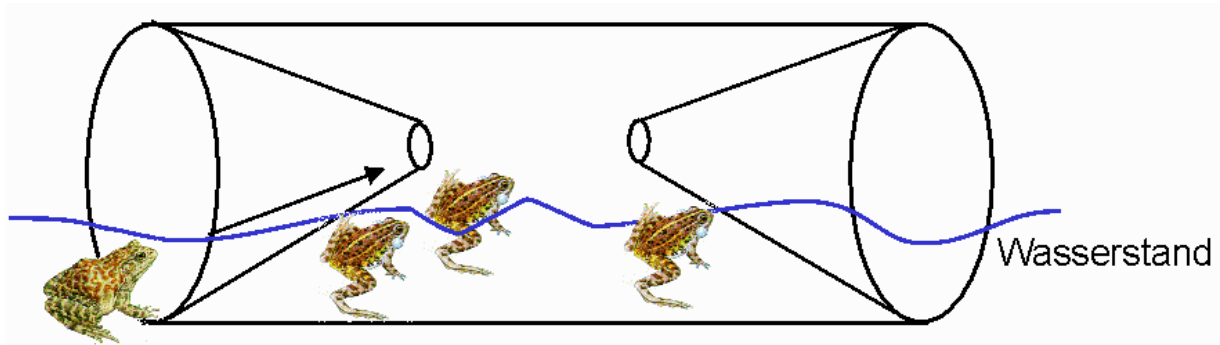


Abb. 3-2: Skizze einer modifizierten Fischreuse. Die Länge der Reuse variierte zwischen 50 und 150 cm, der Durchmesser der inneren Öffnungen zwischen 3 und 6 cm. Es wurde darauf geachtet, daß der Wasserstand etwas unterhalb der inneren Öffnungen lag um ein Herausschwimmen bzw. Herausspringen der gefangenen Frösche zu vermeiden.

Die gesammelten Frösche wurden durch eine hohe Dosis von 3-Aminobenzoesäure-ethyl-ester (MS222) getötet. Danach wurde die Leber, das Herz, ein Teil der Oocyten bzw. Hoden und ein Teil der Oberschenkelmuskulatur entfernt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C .

3.2 ALLOZYMELEKTROPHORESE

Für die Identifizierung der verschiedenen Taxa und deren genetischer Analyse wurden 19 Enzymsysteme, die für 24 Enzymloci kodieren, auf Celluloseacetatplatten analysiert (Hebert und Beaton 1993): *6pgdh* (EC 1.1.1.44), *aco* (EC 4.2.1.3), *ahh* (EC 3.3.1.1), *apk* (EC 2.7.1.2), *ck* (EC 2.7.3.2), *fh* (EC 4.2.1.2), *gapdh* (EC 1.2.1.12), *α gdh* (EC 1.1.1.8), *gdh* (EC 1.4.1.3), *got-1*, *got-2* (EC 2.6.1.1), *pgi* (EC 5.3.1.9), *idh-1*, *idh-2* (EC 1.1.1.42), *ldh-a*, *ldh-b* (EC 1.1.1.27), *mdh* (EC 1.1.1.37), *me* (EC 1.1.1.40), *mpi* (EC 5.3.1.8), *pgm* (EC 5.4.2.2), sowie drei undefinierte Muskelloci (*mpr-1*, *mpr-2*, *mpr-3*) und ein Leber Protein (*lpr*) (Tab. 3-2). Für die Allozymelektrophorese wurden Homogenate von somatischem Gewebe (Leber und Muskel) und von primären Oocyten benutzt. Die Gewebe und die Oocyten wurden in Tierpuffer homogenisiert (Harris and Hopkinson 1976). Die Tierkadaver wurden in sitzender Stellung in Formalin fixiert und für spätere Untersuchungen in 70%igem Alkohol konserviert.

Tab. 3-2: Laufbedingungen der untersuchten Enzymsysteme.

Enzym	Gewebe	Puffer	Hits	Zeit/Strom
<i>6pgdh</i>	Muskel	TB 8,9	2	200/50
<i>aco</i>	Leber	TG 8,9	4	250/40
<i>ahh</i>	Leber	TG 8,5	1	200/40
<i>apk</i>	Muskel	TM 7,0	1	200/30
<i>ck</i>	Muskel	TG 8,5	1	200/40
<i>fh</i>	Leber	TG 8,5	2	200/40
<i>αgdh</i>	Leber	TG 8,5	3	200/40
<i>gapdh</i>	Muskel	TC 8,2	1	200/50
<i>gdh</i>	Muskel	TM 7,0	3	200/30
<i>got</i>	Leber	TC 8,2	1	200/40
<i>pgi</i>	Leber	TG 8,5	1	200/40
<i>ldh</i>	Leber	TB 8,9	2	200/40
<i>ldh</i>	Leber	TG 8,5	3	200/40
<i>mdh</i>	Muskel	PP 7,0	2	200/40
<i>me</i>	Muskel	TG 8,9	3	200/40
<i>mpi</i>	Leber	TM 7,0	3	200/40
<i>mpr</i>	Muskel	TB 8,9	1	200/50
<i>lpr</i>	Leber	TB 8,9	1	200/50
<i>pgm</i>	Muskel	TM 7,0	1	200/40

Zur Unterscheidung von *R. ridibunda* und *R. lessonae* wurden die Loci *6pgdh*, *got-2*, *gapdh*, *pgi*, und *ldh-b* herangezogen. *R. ridibunda* und *R. perezi* wurden aufgrund der Analyse der Loci *6pgdh*, *ahh*, *ck*, *gapdh*, *αgdh*, *ldh-b* und *mpr-2* unterschieden. Diese Loci wurden z.T. bereits früher zur Unterscheidung der genannten Taxa herangezogen (Arano et al. 1994; Beerli 1994; Hotz et al. 1994b; Pagano et al. 1997; Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Enzymloci, die in der Literatur für den PG-Komplex als diagnostisch beschrieben worden sind. Gemeinsame Allele sind fett markiert. Die jeweiligen Stichprobengrößen sind in Klammern angegeben, die Referenz numerisch abgekürzt: 1 = Hotz et al. 1994b, 2 = Beerli 1994, 3 = Arano et al. 1994.

Locus	<i>R. ridibunda</i>	<i>R. perezi</i>	Referenz	Locus	<i>R. ridibunda</i>	<i>R. perezi</i>	Referenz
<i>gapdh</i>	d (8)	b (35)	1	<i>mpi</i>	a (8)	l, m, r (35)	1
	c, d (198)	b (26)	2		a, c (198)	l, m (26)	2
<i>6pgdh</i>	b, c (198)	d (26)	2	<i>ahh</i>	a (198)	b (26)	2
<i>αgdh</i>	a (8)	c (35)	1	<i>mpr</i>	b (198)	c (26)	2
	a, b (198)	c (26)	2	<i>s-aco</i>	b, c, e (198)	c (26)	2
	a (?)	b (238)	3	<i>gcdh</i>	c (198)	b (26)	2
<i>ldh-b</i>	a (8)	d, i (35)	1	<i>pgi</i>	a, d, f (198)	b (26)	2
	a, c (?)	c , e (238)	3				
	a, c (198)	d (26)	2				

Die hemiklonale Vererbung der Hybridogenese wird am besten anhand genetischer Analysen von Gameten nachgewiesen, weil im Hybriden durch die Genomexklusion nur noch Enzyme einer Elternart nachweisbar sind (Tunner 1980; Tunner und Heppich 1981; Hotz 1983). Zu diesem Zweck wurden jeweils etwa 10-20 Oocyten von 18 *R. ridibunda*, neun *R. perezi* und 18 *R. grafi* in Tierpuffer homogenisiert. Es gilt hierbei anzumerken, daß eine Kontamination der Homogenate mit Enzymen aus somatischen Zellen wahrscheinlich ist. Grundsätzlich sind in den Oocyten nur Proteine enthalten, die vom im Oocyt enthaltenen Genom während des Diplotäns (Meiose) produziert wurden. Da die Oocyten jedoch im Ovar kapselartig von einem Follikel umgeben sind und dieser aus somatischen Zellen besteht, werden während des Homogenisierens Oocyten-Enzyme mit somatischen Enzymen vermischt. Die hohe Proteinproduktion im Oocyt während der Meiose läßt es jedoch zu, die schwach ausgeprägten Bandenmuster somatischer Enzyme von den kräftigen Banden der Oocyten-Enzyme zu unterscheiden. Nicht alle diagnostischen Loci konnten in den Oocyten elektrophoretisch nachgewiesen werden. Zur Anwendung kamen die Loci *ck*, *ldh-b*, *αgdh* und *gapdh*.

3.3 TAXONZUGEHÖRIGKEIT

In einem hybridogenetischen System und unter der Annahme nicht nachweisbarer oder geringer Rekombination sollte es ohne Schwierigkeiten möglich sein, die unterschiedlichen Individuen einem Taxon zuzuordnen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch ein hohes Maß an rekombinierten Genotypen. Es lassen sich aus diesen Überlegungen zwei Zuordnungsmodelle ableiten:

- (1) Es werden nur solche Tiere den Parentalarten *R. perezi* bzw. *R. ridibunda* zugeordnet, die ausschließlich die für das jeweilige Taxon typischen Allele zeigen. Es ergeben sich daraus die fünf Einteilungsgruppen *R. ridibunda*, *R. ridibunda*-ähnliche *R. grafi*, reine *R. grafi*, *R. perezi*-ähnliche *R. grafi* und *R. perezi*, d.h. alle untypischen Allelkombinationen werden dem Hybriden *R. grafi* zugeordnet.
- (2) Die Frösche werden dem Taxon zugeordnet mit dem die Mehrzahl der Genotypen übereinstimmt. Die fünf oben genannten Gruppen werden durch rekombinierte *R. ridibunda* und *R. perezi* ergänzt.

Der Unterschied der beiden Modelle liegt in der Annahme von Rekombination in *R. grafi*, die sich in den Parentalarten manifestieren kann. In der Literatur konnte bisher noch nicht eindeutig widerlegt werden, daß rekombinierte Genome der Parentalarten, die von Hybriden produziert wurden, durch Rück- und Auskreuzungen in den Genpool der Parentalarten gelangen können. Ein interspezifischer Genfluß ist daher nicht auszuschließen. Für die Taxonzuordnung kam deshalb Modell 2 zum Einsatz.

Die praktische Vorgehensweise der Taxonzuordnung basiert auf dem Vergleich meiner Proben mit den Referenzproben aus anderen Gebieten. Diese Proben wurden mir von anderen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Daten wurden typische *R. lessonae*, *R. ridibunda* und *R. perezi* Allele bestimmt und die einzelnen Genotypen den Taxa zugeordnet. Seltene und gemeinsame Allele, die bei den verschiedenen Artenpaaren (z.B. *R. ridibunda/R. perezi Idh-b_c*) gefunden wurden, gingen nicht in die Auswertung ein, da eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. Zeigte ein Tier z.B. die Genotypen *Idh-b_{cc}*, *Idh-b_{ce}* oder andere Kombinationen des Alleles *Idh-b_c* mit *R. perezi*- bzw. *R. ridibunda*-typischen Allelen, wurde dieser Locus nicht in die Zuordnung einbezogen. Tiere, die keine Mehrheit für Genotypen eines der Taxa besaßen, wurden als „unidentifiziert“ deklariert und bei der Auswertung gesondert betrachtet.

3.4 DNA-GEHALTSBESTIMMUNG

Frühere Studien am LE-Komplex beschreiben das Auftreten von triploiden *R. esculenta*, die reproduktiv als funktionale Parentalformen dienen, d.h. Gameten mit den Genomen beider Parentalarten bilden können und somit reine Hybridpopulationen formen (z.B. Günther 1990). Für die vorliegende Arbeit war es deshalb von Interesse, den Ploidiegrad der Hybriden zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden zwischen 20 und 30 Erythrocyten pro Tier, insgesamt wurden 442 Frösche untersucht, von luftgetrockneten Blutaussstrichen unter Verwendung des Bildanalyseprogramms AnalySIS 2.0 planimetrisch vermessen, da die Fläche von Erythrocyten (EF) direkt mit dem Ploidiegrad korreliert (Uzzell und Berger 1975; Polls Pelaz und Graf 1988; Günther *et al.* 1991). Die Fläche der Blutkörperchen wurde aus deren maximaler Länge und Breite nach

$$EF = \frac{\text{Länge} \cdot \text{Breite} \cdot \pi}{4} [\text{cm}^2]$$

berechnet.

Eine exaktere Methode, den Ploidiegrad zu bestimmen, stellt die Durchflußzytometrie dar. Dabei wird die Reflektionsintensität von UV-Licht von einzelnen Zellkernen, deren DNA mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt wurde, umgerechnet in Pikogramm DNA. Pro Tier werden zwischen 100.000 und 500.000 Zellkerne vermessen. Der AT-Gehalt von 278 Tieren wurde in der vorliegenden Arbeit durch Anfärbung mit dem Farbstoff DAPI (Sigma) bestimmt. Als Berechnungsstandard für den AT-Gehalt diente der Krallenfrosch *Xenopus laevis* (vgl. auch Darzynkiewicz und Crissman 1990).

3.5 SKELETTOCHRONOLOGIE

Die hohe genetische Variabilität des Hybridogens durch die fixierte Heterozygotie und die hohe Plastizität gegenüber des Lebensraums deuten auf Heterosiseffekte hin, die u.U. auch eine Verlängerung der Lebensspanne des Hybriden im Vergleich zur syntopen Elternart zur Folge haben könnte. Aus diesem Grund wurde die Altersstruktur in elf Populationen anhand von 298 Wasserfröschen skelettochronologisch untersucht.

Die Skelettochronologie konnte als zuverlässige Standardmethode der Altersbestimmung von Amphibien und Reptilien etabliert werden (Smirina 1994). Durch den unterschiedlich ausgeprägten Knochenzuwachs während Hibernations- oder Ästivationsphasen ist es bei Amphibien möglich, ähnlich wie bei Bäumen, Jahresringe zu zählen. Hervorgerufen werden diese LAGs (*lines of arrested growth*) durch die Stoffwechselaktivität der Tiere, die durch saisonale Klimaveränderungen beeinflusst wird (Castanet *et al.* 1993; Esteban *et al.* 1996). Frühere Studien an *R. perezi* (Juarranz und Patón 1990; Patón *et al.* 1991) bestätigten, daß trotz des milderen Klimas im Verbreitungsgebiet von *R. perezi* keine Variation im Muster der histologischen Ausprägung des Knochenwachstums im Vergleich mit anderen nordeuropäischen Anuren gefunden werden konnte.

Zur Altersbestimmung wurde den formalinfixierten Tieren die äußerste Zehe einer der vorderen Extremitäten abgeschnitten, entkalkt, entwässert und in Historesin® der Firma LEICA eingebettet. Danach wurden die eingebetteten Zehen unter Verwendung eines Rotationmikrotoms mit einer Schnittdicke von ca. 11 µm geschnitten. Pro Tier wurden bis zu 60 Schnitte angefertigt, um möglichst gute Schnitte zur Auswertung heranziehen zu können und Ungenauigkeiten bei der Altersbestimmung zu vermeiden. Die LAGs wurden dann bei zwei bis fünf ausgesuchten Schnitten bestimmt und gezählt. Die Färbung der LAGs erfolgte mit Kresylviolett.

3.6 GESCHLECHTSBESTIMMUNG UND GRÖßENMESSUNG

Für die Demographie der einzelnen Populationen ist neben der Altersstruktur auch das Geschlechterverhältnis ein wichtiger Parameter, besonders deshalb, weil es bedingt durch die Hybridogenese zu einer Störung des zu erwartenden 1:1-Verhältnisses kommt (s.o.).

Die Geschlechtsbestimmung stützt sich sowohl auf äußere wie innere Geschlechtsmerkmale. Bei Entnahme der inneren Organe wurde in den geöffneten Tieren nach Anlagen für Ovarien bzw. Hoden gesucht. Leicht erkennbar waren adulte, geschlechtsreife Männchen anhand ihrer Daumenschwielen und paarigen Schallblasen. Adulte Weibchen konnten ebenfalls leicht anhand der mit Eiern gefüllten/eierenthaltenden Ovarien erkannt werden. Eine Unterscheidung juveniler und subadulter Frösche war makroskopisch nicht möglich, weshalb nur die Gruppen Männchen, Weibchen und Juvenile definiert wurden. Die **Kopfrumpf-Länge** (KRL) der Tiere wurde direkt nach dem Einschlafen mit einer elektronischen Schublehre gemessen.

3.7 POPULATIONSTRUKTUR

In der Literatur (z.B. Günther 1990) wird ein Populationssystem anhand der vorhandenen Taxa beschrieben und das System mit den Anfangsbuchstaben des Artnamens der syntopen Arten bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit steht nach dieser Konvention R für *R. ridibunda*, G für *R. grafi*, P für *R. perezi*, L für *R. lessonae* und E für *R. esculenta*. Die Tiere ohne bestimmbare Taxonzugehörigkeit bleiben unberücksichtigt.

Über die Ökologie, das Reproduktionsverhalten und das gestörte Geschlechterverhältnis im LE-Komplex ist aus der Literatur einiges bekannt (siehe Kapitel 2; Abt und Reyer 1993; Berger 1994; Engeler 1994; Bergen *et al.* 1997). Hieraus wurden vier Modelle abgeleitet, mit denen in Kombination mit eigenen Daten theoretische Populationszusammensetzungen errechnet wurden.

Folgende Grundannahmen liegen allen Modellen zugrunde:

- (1) die Populationen sind unendlich groß;
- (2) es treten alle Genomkombinationen zumindest in frühen Entwicklungsstadien auf;
- (3) *R. grafi*-Männchen produzieren in PG-Populationen nur $R_g X_m$ -Gameten, d.h. Gameten mit *R. ridibunda*-Genom und X-Chromosom. *R. grafi*-Männchen in PGR-Populationen produzieren sowohl X-tragende, wie auch Y-tragende *R. ridibunda*-Gameten ($R_g X_m$, $R_g Y$). In letzterem Populationssystem sind Kreuzungen zwischen *R. perezi*-Weibchen und *R. ridibunda*-Männchen wahrscheinlich. Das Y-Chromosom-tragende Genom ($R_g Y$) wird in der hybridogenetischen Gametogenese nicht ausgeschlossen. In der ersten Generation wird angenommen, daß das Verhältnis von $R_g X_m$ und $R_g Y$ -Gameten 1:1 beträgt.
- (4) *R. grafi* X *R. grafi*-Paarungen führen zu keiner lebensfähigen Nachkommenschaft aufgrund der Anhäufung von Letalmutation und deren homozygotem Auftreten in einer solchen Nachkommenschaft unter Bezug auf Muller's Ratchet (Muller 1964; Hotz *et al.* 1992). *R. ridibunda* X *R. grafi*-Paarungen führen aus dem selben Grund nicht immer zu vitalen Nachkommen (Beerli 1986; Hotz *et al.* 1992). Aufgrund fehlender Literaturdaten wurde angenommen, daß nur die Hälfte der Nachkommen einer solchen Paarung überlebt.

Beobachtete und theoretische Populationszusammensetzungen von PG- und PGR-Populationen wurden mit einem χ^2 -Test gegeneinander getestet um unzutreffende Modelle ausschließen zu können. Hierzu wurden aus beobachteten Populationszusammensetzungen die Gametenfrequenzen (vgl. Tab. 3-5) der einzelnen Genotypen berechnet. Nach Normierung auf die Summe der Genotypen ($\sum_{\text{Genotypen}}$; Tab. 3-5) wurden die absoluten

Häufigkeiten der Genotypen unter Berücksichtigung der einzelnen Modelle und Annahmen bestimmt. Um die Stabilität der Geschlechterverhältnisse zu prüfen wurden bis zu zehn Nachfolgenerationen berechnet. Das Kreuzungsschema (Tab. 3-4) zeigt die verschiedenen Möglichkeiten der Gametenkombinationen und der resultierenden Genotypen in PG- und PGR-Populationen. Da in PG-Populationen theoretisch keine *R. grafi*-Männchen auftreten können (z.B. Berger 1994) wurden PG-Populationen ohne *R. grafi*-Männchen separat betrachtet.

Tab. 3-4: Genotypentabelle für PG- (grau unterlegt) und PGR-Populationen. Im Gegensatz zu *R. grafi*-Männchen in PG-Populationen können *R. grafi*-Männchen in PGR-Populationen auch *Ry*-Gameten produzieren. Gameten von *R. grafi* sind fett markiert, Gameten von *R. ridibunda* kursiv. *Px* = Gameten mit *R. perezi*-Genom und X-Chromosom, *Py* = Gameten mit *R. perezi*-Genom mit Y-Chromosom, *Rx* = *R. ridibunda*-Genom mit X-Chromosom, *Ry* = *R. ridibunda*-Genom mit Y-Chromosom. *R_gx*; *R_gy* bezeichnet Gameten von *R. grafi*.

♀	♂							
	<i>Px</i>	<i>Py</i>	<i>R_gx</i>	<i>R_gx</i>	<i>R_gy</i>	<i>Rx</i>	<i>Ry</i>	
<i>Px</i>	PP ♀	PP ♂	RP ♀	RP ♀	RP ♂	RP ♀	RP ♂	
<i>Px</i>	PP ♀	PP ♂	RP ♀	RP ♀	RP ♂	RP ♀	RP ♂	
<i>R_gx</i>	RP ♀	RP ♂	RR ♀	RR ♀	RR ♂	RR ♀	RR ♂	
<i>R_gx</i>	RP ♀	RP ♂	RR ♀	RR ♀	RR ♂	RR ♀	RR ♂	
<i>Rx</i>	RP ♀	RP ♂	RR ♀	RR ♀	RR ♂	RR ♀	RR ♂	
<i>Rx</i>	RP ♀	RP ♂	RR ♀	RR ♀	RR ♂	RR ♀	RR ♂	

Tab. 3-5: Berechnungstabelle für die Genotypfrequenzen für PG- und PGR-Populationen. Zur Normierung und Berechnung der absoluten Genotyphäufigkeiten wurden alle Werte durch die Summe der Genotypen ($\Sigma_{\text{Genotypen}}$) dividiert. a_x = Letalitätskoeffizient; p_x = Paarungspräferenzkoeffizient; *Px*, *Py*, *R_gx*, *R_gy*, *Rx*, *Ry* = Frequenz der verschiedenen Gametentypen, x_m bezeichnet dabei das vom Männchen stammende X-Chromosom.

	<i>Px_m</i>	<i>Py</i>	<i>R_gx_m</i>	<i>R_gy</i>	<i>Rx_m</i>	<i>Ry</i>	
<i>Px</i>	$a_1 p_1 P x_m P x$	$a_2 p_2 P y P x$	$a_3 p_3 R_g x_m P x$	$a_4 p_4 R_g y P x$	$a_5 p_5 R x_m P x$	$a_6 p_6 R y P x$	Σ_1
<i>R_gx</i>	$a_7 p_7 P x_m R_g x$	$a_8 p_8 P y R_g x$	$a_9 p_9 R_g x_m R_g x$	$a_{10} p_{10} R_g y R_g x$	$a_{11} p_{11} R x_m R_g x$	$a_{12} p_{12} R y R_g x$	Σ_2
<i>Rx</i>	$a_{13} p_{13} P x_m R x$	$a_{14} p_{14} P y R x$	$a_{15} p_{15} R_g x_m R x$	$a_{16} p_{16} R_g y R x$	$a_{17} p_{17} R x_m R x$	$a_{18} p_{18} R y R x$	Σ_3
	$\Sigma_{\text{Genotypen}} = \Sigma_1 + \Sigma_2 + \Sigma_3$						

Die folgenden Modelle wurden aufgestellt.

Modell 1 nimmt Panmixie zwischen allen syntopen Taxa an, wobei der Anteil von *R. ridibunda* reduziert wird (siehe Annahmen). Für PG-Populationen gilt: $f_4 = 0$ (Annahme A 3); $f_5 = f_6 = f'' = 0$ (In PG-Populationen treten keine *R. ridibunda*-Genotypen auf); $p_x = 1$; $a_x = 1$ außer $a_9 = 0$ (A 4). Für PGR-Populationen gilt: $Px_m = Py$; $Rx_m = Ry$ (Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Gameten ist bei Männchen 1:1); $R_g x_m > 0$; $R_g y > 0$; $p_x = 1$; $a_x = 1$, außer $a_9 = a_{10} = 0$; $a_{11} = a_{12} = a_{15} = a_{16} = 0,5$ (A 4; Tab. 3-6, Tab. 3-7).

Tab. 3-6: Berechnungstabelle für Modell 1 und PG-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	0	0	0
$R_g x$	$Px_m R_g x$	$Py R_g x$	0	0	0	0
Rx	0	0	0	0	0	0

Tab. 3-7: Berechnungstabelle für Modell 1 und PGR-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	$R_g y Px$	$Rx_m Px$	$Ry Px$
$R_g x$	$Px_m R_g x$	$Py R_g x$	0	0	$0,5 Rx_m R_g x$	$0,5 Ry R_g x$
Rx	$Px_m Rx$	$Py Rx$	$0,5 R_g x_m Rx$	$0,5 R_g y Rx$	$Rx_m Rx$	$Ry Rx$

Das **zweite Modell** basiert auf den Ergebnissen von früheren Kreuzungsexperimenten (Übersicht in Berger 1994). Dabei treten nur weibliche Nachkommen bei Kreuzungen zwischen männlichen *R. perezi* und *R. grafi*- bzw. *R. ridibunda*-Weibchen auf. Ferner treten bei Kreuzungen zwischen *R. ridibunda*-Männchen und *R. grafi*-Weibchen 18 mal mehr Weibchen als Männchen auf. Zusätzlich zu Modell 1 gilt für PG-Populationen: $a_8 = a_{14} = 0$. Für PGR-Populationen gilt: $a_8 = a_{14} = 0$; $a_{12} = \frac{1}{18} a_{11}$ (Tab. 3-8, Tab. 3-9).

Tab. 3-8: Berechnungstabelle für Modell 2 und PG-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	0	0	0
$R_g x$	$Px_m R_g x$	0	0	0	0	0
Rx	0	0	0	0	0	0

Tab. 3-9: Berechnungstabelle für Modell 2 und PGR-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	$R_g y Px$	$Rx_m Px$	$Ry Px$
$R_g x$	$Px_m R_g x$	0	0	0	$0,5 Rx_m R_g x$	$0,028 Ry R_g x$
Rx	$Px_m Rx$	0	$0,5 R_g x_m Rx$	$0,5 R_g y Rx$	$Rx_m Rx$	$Ry Rx$

Im **Modell 3** wurden die Ergebnisse von Abt und Reyer (1993) und Engeler (1994) berücksichtigt. Es wurde hierbei angenommen, daß *R. grafi*-Weibchen in 67% ihrer Paarungen *R. perezi*-Männchen allen anderen Männchen vorziehen. Zusätzlich zu Modell 1 gilt für PG- Populationen: $p_7 = p_8 = 0,67$; $p_9 = p_{10} = 0,33$; für PGR-Populationen gilt: $p_7 = p_8 = 0,67$; $p_9 = p_{10} = p_{11} = p_{12} = 0,33$ (Tab. 3-10, Tab. 3-11).

Tab. 3-10: Berechnungstabelle für Modell 3 und PG-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	0	0	0
$R_g x$	0,67 $Px_m R_g x$	0,67 $Py R_g x$	0	0	0	0
Rx	0	0	0	0	0	0

Tab. 3-11: Berechnungstabelle für Modell 3 und PGR-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	$R_g y Px$	$Rx_m Px$	$Ry Px$
$R_g x$	0,67 $Px_m R_g x$	0,67 $Py R_g x$	0	0	0,17 $Rx_m R_g x$	0,17 $Ry R_g x$
Rx	$Px_m Rx$	$Py Rx$	0,5 $R_g x_m Rx$	0,5 $R_g y Rx$	$Rx_m Rx$	$Ry Rx$

Modell 4 stellt eine Kombination aller vorherigen Modelle dar (Tab. 3-12, Tab. 3-13).

Tab. 3-12: Berechnungstabelle für Modell 4 und PG-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	0	0	0
$R_g x$	0,67 $Px_m R_g x$	0	0	0	0	0
Rx	0	0	0	0	0	0

Tab. 3-13: Berechnungstabelle für Modell 4 und PGR-Populationen.

	Px_m	Py	$R_g x_m$	$R_g y$	Rx_m	Ry
Px	$Px_m Px$	$Py Px$	$R_g x_m Px$	$R_g y Px$	$Rx_m Px$	$Ry Px$
$R_g x$	0,67 $Px_m R_g x$	0	0	0	0,17 $Rx_m R_g x$	0,009 $Ry R_g x$
Rx	$Px_m Rx$	0	0,5 $R_g x_m Rx$	0,5 $R_g y Rx$	$Rx_m Rx$	$Ry Rx$

3.8 BERECHNUNG DER INTROGRESSION

Die individuelle Introgressionsrate I_x wurde als Anteil fremder Allele an den diagnostischen Loci mit folgender Formel berechnet:

$$(1) \quad I_x = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_i + z_i}{2}$$

Dabei sind y_i und z_i der Anteil Allele von Taxon Y und Z am Locus i . Zur Berechnung der Introgressionsrate für den Hybriden *R. grafi* (I_h) mußte Formel 1 modifiziert werden, weil im Genpool von *R. grafi* jeweils ein haploider Chromosomensatz der Elternarten *R. ridibunda* und *R. perezi* zu finden ist. Die Division durch 2 ist demnach unzulässig. Die modifizierte Formel lautet dann:

$$(2) \quad I_h = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i + z_i$$

Es wurden zwei Introgressionswerte berechnet. Die PG-Introgression bezieht sich dabei auf die Allele an den für den PG-Komplex diagnostischen Genorten (Kapitel 3.2) und die totale Introgression beinhaltet zusätzlich die Allele aus dem Genpool von *R. lessonae* an den Loci *6pgdh*, *got-2*, *gapdh*, *pgi*, und *ldh-b*.

3.9 GENETISCHE PARAMETER, KORRELATIONSANALYSEN UND POPULATIONSGRUPPEN

Die genetische Variabilität wurde mit dem Computerprogramm BIOSYS-1 (Swofford und Selander, 1989) berechnet. Zum Vergleich der Taxa wurden alle Proben eines Taxons über alle Populationen gepoolt. Bestimmt wurden die Parameter Polymorphie (P), beobachtete Heterozygotie (H_o), Allelzahl (A) und Allelzahl über polymorphe Loci (A_p).

Für Korrelationsanalysen zwischen genetischen Parametern, der Introgression und der geographischen Position der Probenorte wurden mit Hilfe des Programms GEODIST v1.0 (Heidenreich 1998) aus GPS-Koordinaten paarweise Distanzdaten in Kilometern berechnet. Die Distanzen beziehen sich dabei auf die exponierteste Population im Osten bzw. Norden des Untersuchungsgebietes (vgl. Abb. 3-1). In gleicher Weise wurden Distanzen zur nächsten PGR-Populationen berechnet.

Zum Vergleich von größeren Gebieten wurden Populationsgruppen gebildet, die durch ihre Lage zu den Flüssen Petit Rhône und Grande Rhône definiert sind: Rhône Nord (Gebiet 1: 26 - 31), Rhône Süd (Gebiet 2: 10, 21, 22), Camargue (Gebiet 3: 9, 11 - 20), Sollac (Gebiet 4: 23, 24), Montpellier (Gebiet 5: 5 - 8) und Südfrankreich (Gebiet 6: 1 - 4). Die Lage der einzelnen Probenentnahmestellen sind in Abb. 3-1 dargestellt.

Kapitel 4: ERGEBNISSE

Von den 918 allozymelektrophoretisch untersuchten Wasserfröschen (ohne Referenztiere) konnten neun Tiere (1%) keinem Taxon eindeutig zugeordnet werden. Dem Taxon *R. esculenta* wurde ein Tiere (0,1%), dem Taxon *R. lessonae* zwei Tiere (0,2%) zugeordnet. 254 Tiere (27,7%) zeigten einen für *R. ridibunda* und 200 Tiere (21,8%) einen für *R. perezi* typischen Multilocusgenotyp. Fast die Hälfte der Gesamtprobe wird durch den Hybridogen *R. grafi* mit 452 Tieren (49,2%) gestellt (Tab. 4-1).

4.1 DEMOGRAPHIE

In diesem Kapitel sollen neben der Bestimmung der Populationsstruktur auch die Ergebnisse der exakten Altersbestimmung anhand skelettochronologischer Daten beschrieben und in bezug auf taxon-, populations- und gebietsspezifische Einteilungen verglichen werden.

Die Taxonproben gliedern sich wie folgt auf:

Bei dem *R. esculenta*-Individuum und den *R. lessonae*-Tieren handelte es sich um Juvenile. Die *R. grafi*-Teilprobe gliedert sich in 263 Weibchen (58,2%), 156 Juvenile (34,5%) und 33 Männchen (7,3%). Es wurden 90 juvenile (45,0%), 79 männliche (39,5%) und 31 weibliche (15,5%) *R. perezi* gefunden. Von 254 *R. ridibunda* waren 34 Juvenile (13,5%), 76 Männchen (29,9%) und 143 Weibchen (56,3%; vgl. Tab. 4-2).

Tab. 4-1: Der absolute und relative Anteil (in Klammern) der verschiedenen Wasserfroschtaxa in den untersuchten Populationen. PopNr. = die Populationszahl aus Abb. 2-1, N = Stichprobengröße; n.i. = nicht identifizierte Tiere; PopSys = das aus der Zusammensetzung resultierende Populationssystem.

PopNr.	N	<i>R. ridibunda</i>	<i>R. perezi</i>	<i>R. grafi</i>	n.i.	<i>R. lessonae</i>	<i>R. esculenta</i>	PopSys
01	26		10 (38)	16 (62)				PG
02	30		9 (30)	21 (70)				PG
03	37		37 (100)					P
04	37		19 (51)	18 (49)				PG
05	17			17 (100)				G?
06	29	24 (83)	4 (14)	1 (3)				PGR
07	26		10 (39)	16 (61)				PG
08	28		8 (29)	20 (71)				PG
09	25		13 (52)	12 (48)				PG
10	22	22 (100)						R
11	45		18 (40)	27 (60)				PG
12	15			15 (100)				G?
13	34		18 (53)	16 (47)				PG
14	59		5 (8)	54 (92)				PG
15	18	5 (28)	2 (11)	8 (44)	2 (12)	1 (6)		PGRL
16	32	1 (3)	2 (6)	29 (91)				PGR
17	27	2 (7)	3 (11)	22 (82)				PGR
18	37		7 (19)	29 (78)	1 (3)			PG
19	49	4 (8)	7 (14)	37 (76)	1 (2)			PGR
20	24		5 (21)	19 (79)				PG
21	27	8 (30)	6 (22)	7 (26)	4 (15)	1 (4)	1 (4)	PGREL
22	27	1 (4)	1 (4)	25 (93)				PG
23	35		10 (29)	25 (71)				PG
24	24		6 (25)	18 (75)				PG
25	27	27 (100)						R
26	27	27 (100)						R
27	21	20 (95)			1 (5)			R
28	28	28 (100)						R
29	28	28 (100)						R
30	28	28 (100)						R
31	29	29 (100)						R
Σ	918	254	200	452	9	2	1	

4.1.1 POPULATIONSSYSTEME

Die untersuchten Populationen setzten sich sehr vielfältig zusammen. Allein aufgrund der An- bzw. Abwesenheit der einzelnen Taxa konnten die 31 untersuchten Populationen sieben verschiedenen Populationssystemen zugeordnet werden. Die meisten Populationen setzten sich aus *R. perezi* und *R. grafi* zusammen (PG-Populationen; 14 von 31 Populationen; 45%). Da alle Populationen des Rhônetals nördlich von Arles sich ausschließlich aus *R. ridibunda* zusammensetzten, ist dieser Populationstyp der zweithäufigste (R-Populationen; 8; 26%). Es wurden vier Populationen mit allen drei Wasserfroschtaxa des PG-Komplexes gefunden (PGR-Populationen; 13%) und zusätzlich wurden in zwei weiteren Populationen *R. esculenta* und *R. lessonae* nachgewiesen (PGREL-Populationen). Im Gegensatz zu bisherigen Angaben in der Literatur (z.B. Berger 1988a) kamen *R. ridibunda*, *R. perezi* und *R. grafi* also in sechs Populationen syntop vor (19%). Ferner konnten neben einer reinen *R. perezi*-Population noch zwei reine *R. grafi*-Populationen (5, 12) gefunden werden (Tab. 4-1). Da der Stichprobenumfang in den Populationen 5 und 12 jedoch sehr gering und damit die Wahrscheinlichkeit *R. perezi* bzw. *R. ridibunda* nicht nachzuweisen sehr hoch (> 40%) ist, kann nicht zweifelsfrei von reinen Hybridpopulationen ausgegangen werden. Eine exakte Zuordnung dieser beiden Populationen ist deshalb nicht möglich.

Tab. 4-2: Der absolute und relative Anteil (in Klammern) von Männchen ($\sigma\sigma$), Weibchen ($\varphi\varphi$) und Juvenilen (juv.) in den Taxonteilproben von *R. ridibunda*; *R. grafi* und *R. perezi*. PopNr. = Nummer der Population aus Abb. 2-1.

PopNr.	<i>R. ridibunda</i>			<i>R. grafi</i>			<i>R. perezi</i>		
	$\sigma\sigma$	$\varphi\varphi$	juv.	$\sigma\sigma$	$\varphi\varphi$	juv.	$\sigma\sigma$	$\varphi\varphi$	juv.
01					5 (31)	11 (69)	7 (70)		3 (30)
02				2 (10)	14 (67)	5 (24)	6 (67)	1 (11)	2 (22)
03							21 (57)	5 (14)	11 (30)
04					11 (61)	7 (39)	3 (16)	8 (42)	8 (42)
05				17 (100)					
06	4 (17)	20 (83)		1 (100)			2 (50)	1 (25)	1 (25)
07					10 (63)	6 (38)	1 (10)	1 (10)	8 (80)
08					18 (90)	2 (10)	1 (13)	3 (38)	4 (50)
09				1 (8)	5 (42)	6 (50)	3 (23)	2 (15)	8 (62)
10	5 (23)	17 (77)							
11				1 (4)	19 (70)	7 (26)	6 (33)	2 (11)	10 (56)
12					14 (93)	1 (7)			
13				3 (19)	7 (44)	6 (38)	6 (33)		12 (67)
14					54 (100)		1 (20)	4 (80)	
15	2 (40)	3 (60)			8 (100)		1 (50)	1 (50)	
16	1 (100)			4 (14)	12 (41)	13 (45)	2 (100)		
17			2 (100)			22 (100)			3 (100)
18					6 (21)	23 (79)	4 (57)		3 (43)
19	2 (50)	2 (50)			37 (100)		4 (57)	3 (43)	
20				3 (16)	15 (79)	1 (5)	1 (20)		4 (80)
21	1 (13)	4 (50)	3 (37)		5 (71)	2 (29)	3 (50)		3 (50)
22					2 (8)	23 (92)			1 (100)
23					8 (32)	17 (68)	2 (20)		8 (80)
24				1 (6)	13 (72)	4 (22)	5 (83)		1 (17)
25		27 (100)							
26	9 (33)	11 (41)	7 (26)						
27	6 (30)	7 (35)	7 (35)						
28	23 (82)	5 (18)							
29	15 (54)	13 (46)							
30	3 (11)	17 (61)	8 (29)						
31	5 (17)	17 (59)	7 (24)						
Σ	76 (30)	143 (57)	34 (13)	33 (7)	263 (58)	156 (35)	79 (40)	31 (15)	90 (45)

4.1.2 GESCHLECHTERVERHÄLTNIS UND POPULATIONSSYSTEM

In den meisten natürlichen Populationen sich bisexuell vermehrender Arten findet man ein 1:1-Verhältnis beider Geschlechter (z.B. Berger 1994). Paarweise Chi²-Tests zwischen den hier beobachteten Geschlechterverhältnissen und einer theoretisch zu erwartenden 1:1-Verteilung zeigten, daß das Geschlechterverhältnis in *R. ridibunda* in reinen und in PGR-Populationen signifikant von einem 1:1-Verhältnis abweicht. Dies trifft auch auf die *R. grafi*-Teilprobe für PG- und PGR-Populationen und für *R. perezi* in der reinen und den PG-Populationen zu (Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Absolutwerte von Männchen (♂♂) und Weibchen (♀♀) der Teilproben von *R. ridibunda*, *R. grafi* und *R. perezi* und deren Geschlechterverhältnis (Prop.) in bezug auf reine Populationen (R-, P- und G-Populationen), PG-Populationen und PGR-Populationen. Fett markierte Geschlechterverhältnisse weichen signifikant vom erwarteten 1:1-Verhältnis ab. Dabei bedeutet *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

PopSys	<i>R. ridibunda</i>			<i>R. grafi</i>			<i>R. perezi</i>		
	♂♂	♀♀	Prop.	♂♂	♀♀	Prop.	♂♂	♀♀	Prop.
reine Populationen	66	114	1:2**	17	14	1:1	21	5	4:1*
PG				15	187	1:12***	50	21	2:1*
PGR	13	39	1:3*	5	49	1:10***	8	4	2:1

Da Männchen oft viel früher das Reproduktionsgewässer erreichen als Weibchen (Bergen *et al.* 1997), und durch dieses asynchrone Auftreten eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses möglich ist, wurden die Geschlechterverhältnisse in Proben vom Frühjahr mit denen des Sommers verglichen. Obwohl bei *R. perezi* im Sommer 11% mehr Weibchen auftraten als im Frühjahr stellte sich der Unterschied als nicht signifikant heraus (Frühjahr 28%; Sommer 39%; $\chi^2 = 1,78$; $df = 1$; $p > 0,05$). Das Gleiche gilt auch für die *R. ridibunda*-Teilprobe, welche aber ebenfalls deutlich weniger Weibchen im Frühjahr (58%) als im Sommer (71%; $\chi^2 = 2,17$; $df = 1$; $p > 0,05$) zeigte. Für *R. grafi* ist der Unterschied zwischen Frühjahr (89%) und Sommer (99%) signifikant ($\chi^2 = 13,32$; $df = 1$; $p < 0,001$).

Im nächsten Schritt wurden die im Kapitel 2 vorgestellten, vom LE-Komplex auf den PG-Komplex übertragenen Modelle, gegen die beobachteten Populationsverteilungen getestet. Dabei konnte nur für PG-Populationen ohne *R. grafi*-Männchen eine den Erwartungswerten sehr ähnliche Verteilung bei Annahme des zweiten Modells gefunden werden ($\chi^2 = 0,6$; $df = 3$; $p > 0,05$). Alle anderen Modelle resultierten in theoretischen Populationszusammensetzungen, die erheblich von den beobachteten Zusammensetzungen abwichen (Tab. 4-4).

In den beobachteten Populationsverteilungen war, mit Ausnahme von Modell 2, der Anteil an *R. perezi* sowohl für PG- wie auch PGR-Populationen höher als in den theoretischen Populationen. Im Gegensatz dazu war der Anteil an *R. ridibunda* und *R. grafi* bei einigen Modellberechnungen niedriger. Ferner entspricht das Geschlechterverhältnis von *R. perezi*

in den natürlichen Populationen nicht dem theoretisch berechneten 1:1-Verhältnis ($\chi^2 > 10$; $df = 1$; $p < 0,01$). Dies gilt nicht für Modell 2 für PG-Populationen ohne *R. grafi*-Männchen. Auch die beobachteten Geschlechterverhältnissen in der *R. grafi*-Teilprobe sind von den theoretischen Verhältnissen sehr verschieden, da in PG-Populationen entweder keine *R. grafi*-Männchen auftraten, oder sich ein 1:1-Verhältnis einstellte. In PGR-Populationen wird der Anteil *R. grafi*-Männchen im Vergleich zu natürlichen Populationen entweder stark unterschätzt (modelliert: 1:8; 1:25; beob.: 1:12) oder stark überschätzt (1:1; vgl. Tab. 4-4). Auch das Geschlechterverhältnis von *R. ridibunda* ist in beobachteten und modellierten Populationszusammensetzungen signifikant verschieden (modelliert: ca 1:1; beob.: 1:3; $\chi = 6,9$; $p < 0,05$). In keinem Modell stellte sich ein Gleichgewicht zwischen allen Taxa eines Populationssystems ein (Appendix 1 und 2).

Tab. 4-4: Testergebnisse des Vergleiches zwischen beobachteten Geschlechterverteilungen und den berechneten theoretischen Verteilungen (χ^2), basierend auf den in Kapitel 2 erläuterten Modellen und in bezug auf die unterschiedlichen Populationssysteme (PopSys). Die Populationssysteme beziehen sich dabei auf die beobachteten Populationen.

PopSys	Genotyp und Geschlecht	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 4	Beobachtung
PG, ohne <i>R. grafi</i> -Männchen	PP ♂	9	16			19
	PP ♀	9	16			16
	RP ♂	65	0			0
	RP ♀	65	116			114
	keine <i>R. ridibunda</i> -Genotypen aufgrund von Mullers Ratchet					
	p	< 0,001	> 0,05			
PG, mit <i>R. grafi</i> -Männchen	PP ♂	3	6	2	4	27
	PP ♀	3	6	2	4	5
	RP ♂	53	0	55	0	11
	RP ♀	56	97	56	108	73
	keine <i>R. ridibunda</i> -Genotypen aufgrund von Mullers Ratchet					
	χ^2	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
PG	PP ♂	13	22	8	15	46
	PP ♀	13	22	8	15	21
	RP ♂	116	0	122	0	11
	RP ♀	122	221	126	234	187
	keine <i>R. ridibunda</i> -Genotypen aufgrund von Mullers Ratchet					
	χ^2	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
PGR	PP ♂	1	2	1	2	8
	PP ♀	1	2	1	2	4
	RP ♂	27	5	34	2	5
	RP ♀	26	40	35	50	49
	RR ♂	28	37	20	25	13
	RR ♀	35	33	27	38	39
		χ^2	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

4.1.3 UNTERSCHIEDE IN DER POPULATIONSTRUKTUR IN BEZUG AUF DIE GEOGRAPHISCHE POSITION

Die Verbreitung der europäischen Wasserfrösche entlang der Rhône konnte trotz einiger Untersuchungen bisher nicht vollständig geklärt werden, zumal rezente Einführungen von *R. ridibunda* (Grossenbacher 1988) das Verbreitungsareal dieses Taxons künstlich vergrößerten. Durch diesen anthropogenen Eingriff und durch den Einfluß der Hybridogenese (vgl. Kapitel 2) kann das Geschlechterverhältnis in Abhängigkeit von der geographischen Position der einzelnen Populationen variieren. Korrelationsanalysen und statistische Tests sollen nachfolgend hierüber Aufschluß geben.

Im Gebiet 1 (Rhône) nördlich von Arles wurde nur *R. ridibunda* nachgewiesen. Das Geschlechterverhältnis über alle Populationen in diesem Gebiet ist von einem 1:1-Verhältnis nicht signifikant unterschiedlich ($\chi^2 = 0,3$, $p > 0,05$) mit einem leichten Überhang an *R. ridibunda*-Weibchen (Tab. 4-5).

Tab. 4-5: Absolutwerte von Männchen ($\sigma\sigma$) und Weibchen ($\varphi\varphi$) der Taxa *R. ridibunda*, *R. grafi* und *R. perezi* in den untersuchten Gebieten. Geschlechterverhältnisse (Prop.), die signifikant von einem 1:1-Verhältnis abweichen, sind fett markiert (χ^2 -Test). Kursive Zahlen markieren Gebiete in welchen nur ein Geschlecht pro Taxon gefunden wurde. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Die Gebiete sind: 1 = Rhône Nord; 2 = Rhône Süd; 3 = Camargue; 4 = Sollac; 5 = Montpellier; 6 = Südfrankreich.

Gebiet	<i>R. ridibunda</i>			<i>R. grafi</i>			<i>R. perezi</i>		
	$\sigma\sigma$	$\varphi\varphi$	Prop.	$\sigma\sigma$	$\varphi\varphi$	Prop.	$\sigma\sigma$	$\varphi\varphi$	Prop.
1	61	70	1:1						
2	6	21	1:4*		5		3		
3	5	5	1:1	12	179	1:15***	28	13	2:1
4				1	21	1:21**	7		
5	4	20	1:5*	18	28	1:2	4	5	1:1
6				2	30	1:15***	37	14	3:1*

Interessant ist das Gebiet 2 (Rhône-Süd), denn dort wurden alle Wasserfroschtaxa der hybridogenetischen LE- und PG-Komplexe gefunden, wenn auch *R. esculenta* und *R. lessonae* nur in sehr niedriger Frequenz (Tab. 4-1). Dominant in diesem Gebiet waren *R. ridibunda*-Weibchen (60%), das Geschlechterverhältnis der *R. ridibunda*-Stichprobe beträgt etwa 1♂:4♀ und ist signifikant unterschiedlich zu einem 1:1-Verhältnis ($\chi^2 = 4,0$; $p < 0,05$). Es wurden nur *R. grafi*-Weibchen beziehungsweise *R. perezi*-Männchen nachgewiesen.

Im Gebiet 3 wurden insgesamt 242 adulte Tiere gefangen, wovon allerdings nur 10 (4,1%) *R. ridibunda* zugeordnet wurden. Das Geschlechterverhältnis in der *R. ridibunda*-Teilprobe betrug 1:1. Dominiert wurde dieses Gebiet von *R. grafi*-Weibchen (74,0%), wobei auch *R.*

grafi-Männchen in niedriger Abundanz nachgewiesen werden konnten (5,0%). Die Proportion zwischen beiden Geschlechtern beträgt in diesem Gebiet etwa 1:15. *R. perezi* wurde in wesentlich höherer Proportion als in den zuerst genannten Gebieten nachgewiesen (16,9%), wobei auch hier der Anteil an Männchen bei adulten Tieren überwog (Verhältnis 2:1), aber nicht signifikant von einem 1:1-Verhältnis abwich ($\chi^2 = 2,9$; $p > 0,05$). Erwähnenswert ist der hohe Anteil juveniler Tiere in jeder taxonspezifischen Teilprobe (33,0% - 50,0%) und auch in der Gesamtprobe (38,0%).

Das Gebiet 4 (Sollac) wurde stark von *R. grafi*-Weibchen dominiert, wobei ein identischer Anteil an Juvenilen gefunden wurde. Im gesamten Gebiet trat nur ein *R. grafi*-Männchen (3,4%) auf. *R. perezi*-Weibchen wurden in diesem Gebiet nicht nachgewiesen. Der gesamte Anteil an *R. perezi* (Männchen und Juvenile) betrug weniger als ein Drittel.

Richtung Westen schließt an Gebiet 3 das Gebiet 5 an. Dieses Gebiet beinhaltet auch das Untersuchungsgebiet von Graf *et al.* (1977), die erstmals den Hybriden *R. grafi* bei Aigues Mortes nachgewiesen hatten. Dieses Gebiet scheint aber in mehrfacher Hinsicht eine Ausnahme darzustellen. Zum einen findet sich in diesem Gebiet die einzige von *R. grafi*-Männchen dominierte Population, zum anderen wurden hier mehrfach *R. ridibunda* ausgesetzt (Crochet, pers. Mitt., 1997). Ferner zeigten Vierfeldertests, daß die Männchen-Weibchen-Proportionen in den Populationen 5 und 6 signifikant von allen anderen Gebieten abweichen ($\chi^2 = 3,51 - 36,18$; $p < 0,05$). Eine Gesamtbetrachtung dieses Gebietes scheint deshalb nicht sinnvoll zu sein, weshalb die Populationen 5 und 6 getrennt von den Populationen 7 und 8 betrachtet werden.

Population 6 wird von *R. ridibunda*-Weibchen dominiert, das Geschlechterverhältnis beträgt 1:6. Sowohl *R. grafi*, wie auch *R. perezi* treten nur in sehr geringen Frequenzen auf. Die Population 5 nördlich von Montpellier besteht ausschließlich aus *R. grafi*-Männchen und stellt somit eine Besonderheit dar. In den Populationen 7 und 8 ist der Anteil von *R. grafi*-Weibchen mit 41,8% höher als in den übrigen Gebieten (Tab. 4-1). Das Geschlechterverhältnis hat sich zu Ungunsten der *R. grafi*-Männchen weiter verschoben (1:33). Die *R. perezi*-Teilprobe enthält Männchen und Weibchen in einem 1:1-Verhältnis, wobei sich der Anteil von *R. perezi* in der Gesamtprobe im Vergleich mit den Gebieten 2, 3 und 4 erhöht hat ($G_2 = 27\%$, $G_3 = 16\%$, $G_4 = 19\%$, Population 7/8 = 39,2%). Der Anteil juveniler Wasserfrösche ist mit 43,0% nicht signifikant höher als in Gebiet 3 ($\chi^2 = 0,67$; $p > 0,1$).

Im südlichsten Gebiet 6 ist der Anteil von *R. perezi* mit 57,7% erstmals höher als der Anteil von *R. grafi*. Das Geschlechterverhältnis der *R. perezi*-Teilprobe ist jedoch immer noch zu Gunsten der Männchen verschoben (3:1) und weicht signifikant von einem 1:1-Geschlechterverhältnis ab ($\chi^2 = 5,5$; $p < 0,05$). Auch das Geschlechterverhältnis der *R. grafi*-Teilprobe zeigt wie in Gebiet 3 einen starken Weibchenüberschuß (1:15; Tab. 4-5).

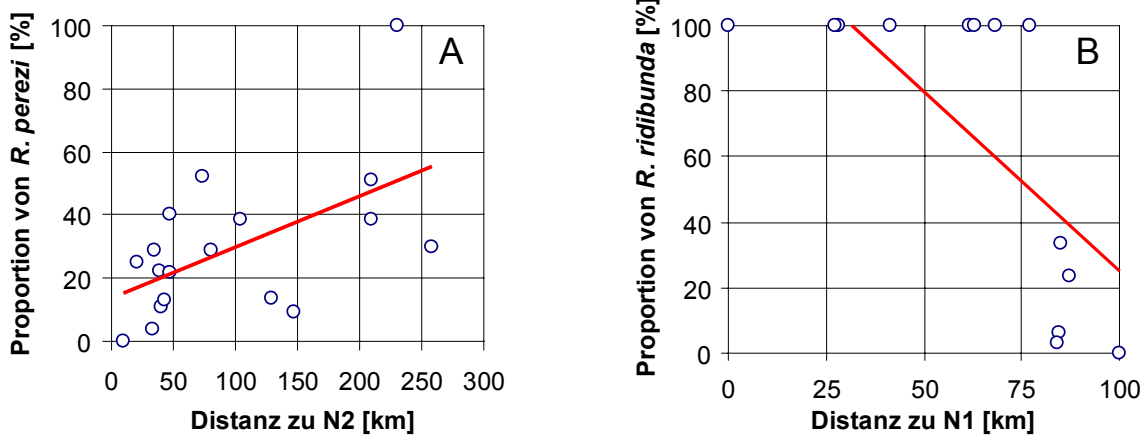


Abb. 4-1: Korrelationen zwischen der Distanz der untersuchten Populationen zu den Nullpunkten (vgl. Abb. 3-1) und dem Anteil an *R. perezii* bzw. *R. ridibunda*.

Der höhere Anteil von *R. perezii* in südlichen Populationen wird durch eine Regressionsanalyse unter Verwendung des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten belegt. Dieser zeigt einen signifikanten Anstieg des *R. perezii*-Anteils nach Süden ($R = 0,53$; $p < 0,05$; Abb. 4-1 A) bei einer gleichzeitigen signifikanten Abnahme von *R. ridibunda* ($R = -0,63$; $p < 0,05$, Abb. 4-1 B). Wie oben gezeigt werden konnte, kommt *R. grafi* in nördlichen und südlichen Populationen in geringerer Frequenz vor als in der Camargue. Es scheint dies jedoch kein stetiges Phänomen zu sein und ergab keinen signifikanten Zusammenhang bei der Regressionsanalyse ($R = 0,17$; $p > 0,05$; Abb. 4-2).

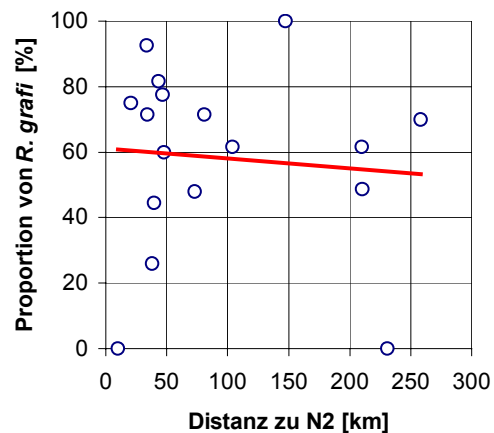


Abb. 4-2: Korrelationen zwischen der Distanz der untersuchten Populationen zu Nullpunkt N2 und dem Anteil an *R. grafi*.

Frühere Studien zeigten, daß Hybrid X Hybrid-Kreuzungen zu einer rein weiblichen Nachkommenschaft führen (Hotz et al. 1994a, Berger 1994 u.a.). Aufgrund dieser Ergebnisse und dem hohen Anteil an Hybriden in Populationen der Gebiete 2 und 3 kann eine Verschiebung der Geschlechterverhältnisse zu Gunsten von *R. ridibunda*-Weibchen von Norden nach Süden angenommen werden. Um diese Hypothese zu testen wurde das Geschlechterverhältnis mit der geographischen Position der Population korreliert. Der Zusammenhang zeigte keine Signifikanz ($R = 0,1$; $df = 11$; $p > 0,05$). Die fehlende Signifikanz ist wahrscheinlich auf den unerwartet hohen Weibchenanteil in den Populationen 30 und 31 zurückzuführen (Tab. 4-2).

Die Annahme, daß es sich bei diesen beiden Populationen um Ausreißer handelt, wird durch eine Ausreißer-Analyse bestätigt. Hierbei zeigt Population 31 eine Mahalanobis-Distanz von 3,2 und Population 30 einen Distanzwert von 2,4, während alle anderen Populationen Werte unter 2,1 zeigten (Ausreißergrenze: 2,34). Unter Ausschluß dieser beiden Populationen ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang ($R = 0,84$; $df = 9$; $p < 0,01$; Abb. 4-3). Gestützt wird diese Beziehung auch durch χ^2 -Tests zwischen den Geschlechterverhältnissen der einzelnen Gebiete ($\chi^2_{\text{Gebiet } 1/2} = 4,1$; $p < 0,05$; $\chi^2_{\text{Gebiet } 1/3} = 6,0$; $p < 0,05$).

Im Falle von *R. perezii* kann eine ähnliche Hypothese aufgestellt werden, da Hybrid-Weibchen Paarungspräferenzen für *R. perezii*-Männchen zeigen (Abt und Reyer 1993). Da im Hybrid eine besonders stark ausgeprägte Störung des Geschlechterverhältnisses zu Gunsten von Weibchen vorliegt (s.o.), kann erwartet werden, daß Paarungen zwischen *R. perezii*-Männchen und *R. grafi*-Weibchen relativ häufiger sind. *R. perezii*-Weibchen sollten in einem solchen System benachteiligt sein. Aus diesem Grund kann postuliert werden, daß der Anteil an *R. perezii*-Männchen von Populationen im Gebiet 3, in dem PG-Populationen anteilig überwiegen, zu Populationen im Gebiet 6 abnimmt. Weder die Regressionsanalyse noch Vierfeldertests konnten jedoch eine solche Beziehung statistisch stützen.

Durch die Hybridogenese ist das Auftreten von *R. grafi*-Männchen in PG-Populationen theoretisch unmöglich, da das Y-Chromosom-tragende *R. perezii*-Genom bei der hybridogenetischen Gametogenese ausgeschlossen wird (z.B. Plötner *et al.* 1994). Es ist jedoch denkbar, daß aus nahe gelegenen PGR-Populationen *R. grafi*-Männchen immigrieren. Eine Regressionsberechnung zwischen der Distanz einer PG-Population zur nächsten PGR-Population und ihrem Anteil an *R. grafi*-Männchen ergab keinen signifikanten Zusammenhang. Dabei ist jedoch festzustellen, daß die mittlere Distanz zu PGR-Populationen bei PG-Populationen ohne *R. grafi*-Männchen (48,8 km) größer ist, als bei PG-Populationen mit *R. grafi*-Männchen (31,0 km). Ein t-Test (streuungsinhomogen) zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied ($t = 0,7$; $df = 12$; $p > 0,05$).

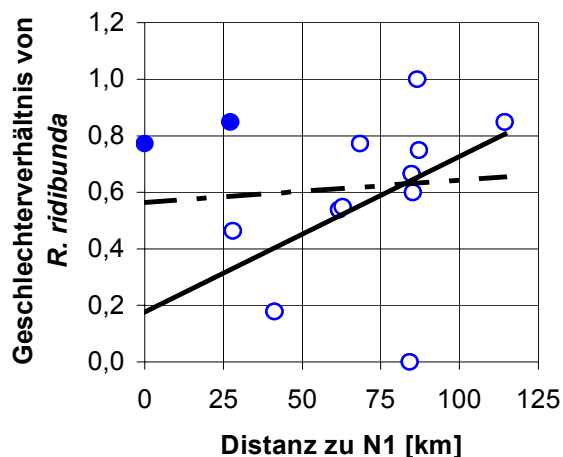


Abb. 4-3: Geschlechterverhältnis von *R. ridibunda* in Korrelation mit der Distanz der Population zu Nullpunkt N1. Die gestrichelte Linie zeigt den Zusammenhang unter Einschluß aller Populationen, die durchgezogene Linie den Zusammenhang ohne die Populationen 30 und 31 (gefüllte Kreise).

4.1.4 ALTERSANALYSE

In diesem Kapitel soll der Frage nachgegangen werden, ob der Hybrid *R. grafi* aufgrund seiner genetischen Ausstattung im Vergleich zu den syntopen Taxa ein höheres Alter erreicht oder nicht.

Insgesamt wurden 183 *R. grafi*, 51 *R. perezi*, 58 *R. ridibunda*, zwei *R. lessonae*, ein *R. esculenta* und vier undefinierte Tiere untersucht. 41,6% (127 Tiere) der Wasserfrösche hatten das erste Lebensjahr noch nicht vollendet, über die Hälfte der Probe (152 Tiere, 51,0%) befanden sich im zweiten Lebensjahr, nur 5,4% erreichten das dritte Lebensjahr und sogar nur 1% wurden in ihrem vierten Lebensjahr gefangen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede im Auftreten verschiedener Altersklassen zwischen den drei zuerst ge-

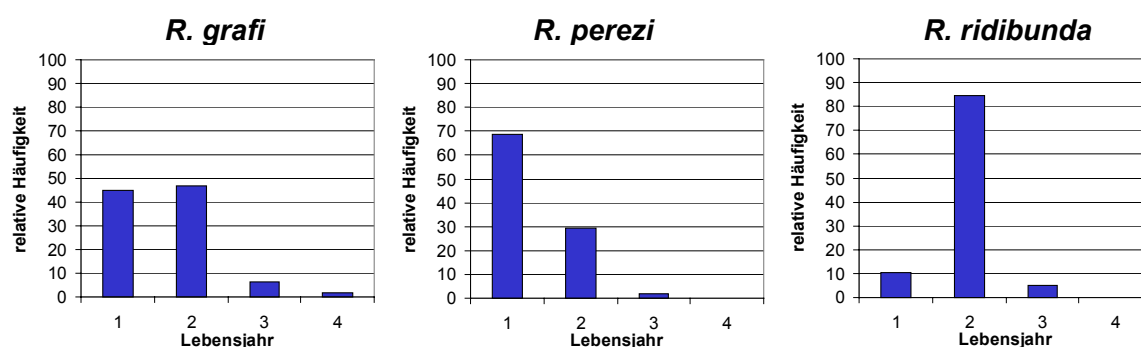


Abb. 4-4: Die Altersklassenverteilung der Taxa *R. grafi*, *R. perezi* und *R. ridibunda*.

nannten Taxa, deren Median allerdings nur im Fall der Parentalarten signifikant verschieden war ($Z = -2,4$; $p < 0,05$). Die Altersklassenverteilungen der Taxa *R. grafi*, *R. perezi* und *R. ridibunda* zeigten signifikante Unterschiede ($\chi^2 > 29,6$; $p < 0,001$; Abb. 4-4). *R. ridibunda* erreichte das höchste mittlere Alter mit 1,95 Lebensjahren, *R. perezi* mit 1,3 das niedrigste. *R. grafi* nahm mit 1,65 Jahren eine intermediäre Stellung zwischen den beiden Parentalarten ein.

44,8% der untersuchten *R. grafi* befanden sich in ihrem ersten, 47,0% im zweiten, 6,6% im dritten und 1,6% im vierten Lebensjahr (Abb. 4-4; Tab. 4-6). Beide Geschlechter zeigten geschlechtsreife Tiere schon im ersten Lebensjahr. Allerdings konnten prozentual mehr adulte Weibchen im ersten Lebensjahr (35,4%) gefangen werden als adulte Männchen (5,6%). Die meisten der untersuchten *R. grafi*-Männchen (83%) befanden sich im zweiten Lebensjahr, wohingegen nur knapp die Hälfte der adulten Weibchen (48%) im gleichen Alter waren. Allerdings waren bei den Weibchen etwa 16% und bei den Männchen nur 11% der Tiere älter als zwei Jahre. Juvenile und subadulte Tiere befanden sich zu 71% im ersten und zu 29% im zweiten Lebensjahr.

Tab. 4-6: Absolutwerte der Altersklassenverteilung über alle Individuen eines Taxons und über die Geschlechterteilprobe.

Altersklasse	<i>R. grafi</i>			<i>R. perezi</i>			<i>R. ridibunda</i>		
	alle	♂♂	♀♀	alle	♀♀	♂♂	alle	♀♀	♂♂
1	82	2	24	35	0	9	6	1	0
2	86	30	33	15	3	10	49	37	10
3	12	2	10	1	0	1	3	3	0
4	3	2	1	0	0	0	0	0	0

In der *R. perezi*-Stichprobe überwog der Anteil an unter einem Jahr alten Tieren (68,6%). Nur 29,4% der *R. perezi*-Individuen erreichten das zweite Lebensjahr und nur ein *R. perezi* wurde drei Jahre alt (2,0%; Abb. 4-4; Tab. 4-6). 45% der adulten *R. perezi*-Männchen hatten ihr erstes Lebensjahr noch nicht beendet und 50% ihr zweites, nur ein *R. perezi*-Männchen wurde drei Jahre. Insgesamt zeigte der durchgeführte U-Test, daß die *R. perezi*-Männchen signifikant jünger waren als die *R. grafi*-Männchen ($Z = -2,5$; $p < 0,01$).

Alle *R. ridibunda*-Männchen wurden in ihrem zweiten Lebensjahr gefangen, wie 90% der Weibchen. Allerdings wurden auch 2% Weibchen gefangen, die bereits in ihrem ersten Lebensjahr geschlechtsreif waren. Kein *R. ridibunda* war älter als drei Jahre. Die Aufspaltung der Juvenilen ist ähnlich der von *R. grafi* (Lebensjahr 1 = 67%; Lebensjahr 2 = 33%).

Auffallend ist die ungewöhnliche Altersstruktur in Gebiet 5. Dort zeigten die untersuchten Taxa das höchste mittlere Alter (*R. perezi* = 1,50; *R. grafi* = 2,30; *R. ridibunda* = 2,00). Die Einzelbetrachtung der Taxa zeigt nur für *R. grafi* signifikante Unterschiede zwischen den Gebieten, so sind die Tiere aus Gebiet 5 mit 2,30 Lebensjahren signifikant älter als in den übrigen Populationen (3 = 1,64; 2 = 1,43; 6 = 1,23; $Z > 3,0$; $p < 0,01$).

Der Vergleich des mittleren Alters der Taxa *R. grafi* und *R. perezi* in einer Population zeigte, daß *R. grafi* in vier von fünf Populationen (1, 13, 18, 20, 21) älter war als die syntop vorkommende Elternart *R. perezi*. Signifikant war der Unterschied allerdings nur in der Population 13 (Tab. 4-7). Nur in Population 21 konnte aufgrund des Stichprobenumfangs ein Vergleich zwischen *R. ridibunda* und den beiden anderen Taxa durchgeführt werden. Hierbei stellte sich heraus, daß *R. ridibunda* im Mittel älter war als *R. grafi* und *R. perezi*, die Unterschiede waren aber auch hier nicht signifikant (Tab. 4-7).

Tab. 4-7: Vergleich des mittleren Alters der syntopen Wasserfroschformen. PopNr. = Populationsnummer (Abb. 2-1); Anzahl getesteter Tiere pro Taxon in Klammern. Fett markiert sind signifikante Unterschiede auf dem 99%-Niveau. Die standardisierten Z-Werte wurden mit dem U-Test berechnet.

PopNr.	mittleres Alter			
	<i>R. perezi</i>	<i>R. grafi</i>	Z-Wert	t-Wert
1	1,33 (9)	1,24 (21)	-0,41	-0,52
13	1,22 (18)	1,94 (16)	3,31	4,79
18	1,33 (3)	1,67 (24)	0,69	0,79
20	1,60 (5)	1,67 (21)	0,29	0,18
21	1,33 (6)	1,43 (7)	0,29	0,33
	<i>R. ridibunda</i>	<i>R. perezi</i>		
21	1,66 (6)	1,33 (6)	-0,96	-1,12
	<i>R. ridibunda</i>	<i>R. grafi</i>		
21	1,66 (6)	1,43 (7)	-0,72	-0,81

Frühere Studien (Duellman und Trueb 1986) beschreiben die Möglichkeit einer Altersbestimmung bei Amphibien anhand der Kopf-Rumpf-Länge (KRL), da Amphibien ein unbegrenztes Größenwachstum zeigen. Korrelationsberechnungen bestätigen zwar, daß ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und der KRL besteht ($R_{R. grafi} = 0,56$; $R_{R. perezi} = 0,57$; $R_{R. ridibunda} = 0,45$; $p < 0,001$), die Streuung der Einzelwerte ist jedoch erheblich (vgl. Tab. 4-8; Abb. 4-5) und macht eine genaue Altersbestimmung einzelner Wasserfrösche anhand der KRL unmöglich.

Eine Varianzanalyse (ANOVA) weist auf eine signifikant unterschiedliche Varianz zwischen Tieren gleichen Alters und unterschiedlichem Taxon hin ($F = 4,76$; $F_{\text{Taxon}} = 18,13$; $F_{\text{Lebensjahr}} = 36,15$; $p < 0,001$). Es ist dabei festzustellen, daß die mittlere Differenz zwischen einjährigen und zweijährigen (13,67 mm) und zweijährigen und dreijährigen Tieren (9,72

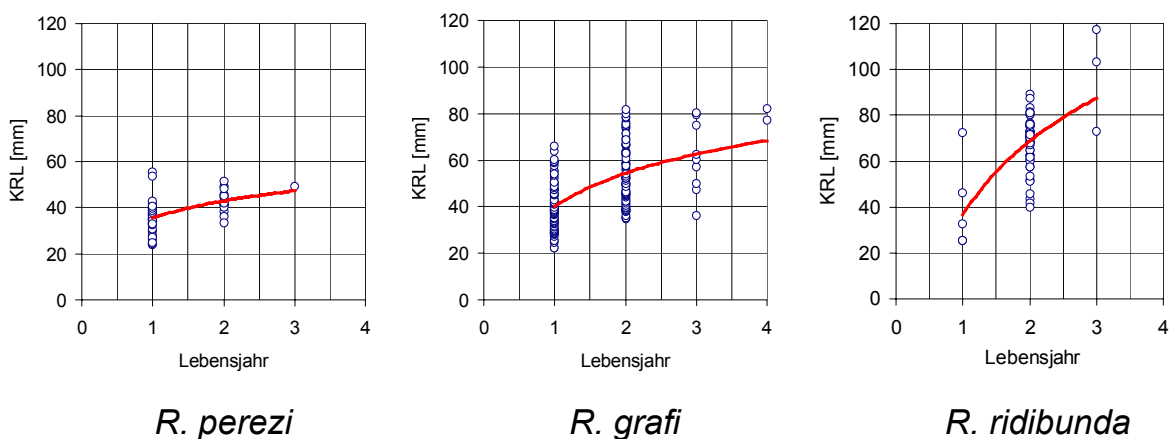


Abb. 4-5: Korrelation des Alters und der KRL der einzelnen Taxa.

mm) in *R. grafi* größer ist als in *R. perezi* ($1/2 = 7,28$ mm; $2/3 = 6,52$ mm). Die KRL von *R. grafi* in den einzelnen Altersklassen ist, mit Ausnahme der dreijährigen Tiere, ebenfalls größer als die KRL in *R. perezi*. Eine noch größere Differenz der KRL in den einzelnen Altersklassen zeigt *R. ridibunda* ($1/2 = 27,37$ mm; $2/3 = 30,09$ mm; Tab. 4-8).

Tab. 4-8: Die Verteilung der verschiedenen Altersklassen bei *R. grafi*, *R. perezi* und *R. ridibunda*, deren mittlerer KRL, der Varianz und den minimalen und maximalen KRL einer Altersklasse.

	Lebensjahr	KRL [mm]	Varianz.	Min. [mm]	Max. [mm]	N (%)
<i>R. grafi</i>	1	40,43	105,33	22,30	66,10	82 (44,8)
	2	54,10	167,43	35,00	81,44	86 (47,0)
	3	63,82	230,80	36,20	80,32	12 (6,6)
	4	80,37	7,73	77,17	82,23	3 (1,6)
						183
<i>R. perezi</i>	1	35,46	47,88	23,80	55,50	35 (68,6)
	2	43,14	24,35	33,35	51,22	15 (29,4)
	3	49,25				1 (2,0)
						51
<i>R. ridibunda</i>	1	40,36	394,50	25,15	72,45	5 (8,8)
	2	67,73	127,95	39,80	89,10	49 (86,0)
	3	97,82	509,86	73,00	117,15	3 (5,3)
						57

Gut erkennbar ist das schnelle Größenwachstum der Frösche an den großvolumigen Knochen, besonders in der an die Metamorphose anschließenden Wachstumsphase (Abb. 4-6).

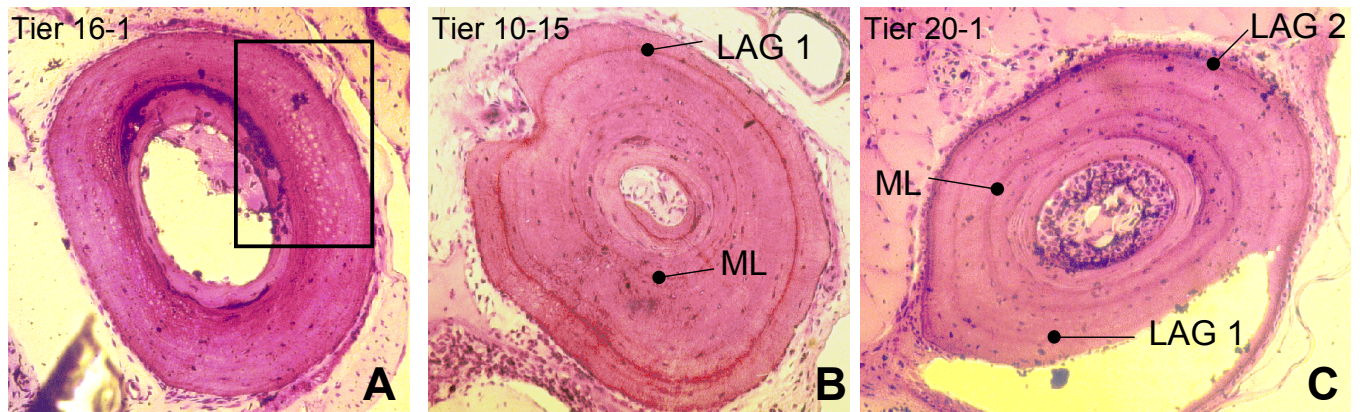


Abb. 4-6: Querschnitte (ca. 200fache Vergrößerung) durch Zehen zur skelettochronologischen Analyse. Der markierte Bereich in Bild A zeigt besonders große Knochenporen, das Tier, ein Hybrid, befand sich in seinem ersten Lebensjahr und wurde im Mai gefangen. Das schnelle Größenwachstum von *R. ridibunda* illustriert Bild B im Vergleich zu Bild C (*R. perezi*). Der Knochenbereich zwischen Metamorphoselinie (ML) und der ersten Hibernationslinie (LAG1) ist bei *R. ridibunda* wesentlich breiter. Beide Tiere wurden ebenfalls im Frühjahr gefangen.

Verschiedene Faktoren, wie Predatordichte, mittlere Jahrestemperatur und Futterangebot, können die KRL bei Amphibien beeinflussen (Duellmann und Trueb 1986). Um festzustellen ob die Varianz der KRL in den Altersgruppen 1, 2 und 3 zwischen den Gebieten größer ist als innerhalb eines Gebietes wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Ein signifikanter Effekt konnte nur für die zweijährigen *R. perezi* gefunden werden (Mittleres Quadrat des Effekts = 55,5; $F = 14,5$; $p < 0,05$). Alle anderen getesteten Wertepaare waren nicht signifikant. Gestützt wird dieses Ergebnis durch einen streuungsinhomogenen t-Test, der zeigte, daß die zweijährigen *R. perezi* in der Population 2 im Süden Frankreichs mit einer KRL von 47,05 mm signifikant größer waren als Tiere aus der Camargue (38,66 mm; $t = 2,73$; $p < 0,05$). Ferner zeigte der t-Test signifikante Größenunterschiede bei einjährigen *R. perezi*, die in der Camargue (Gebiet 3) eine KRL im Mittel von 33,67 mm zeigten, in den anderen Gebieten aber wesentlich größer wurden (2 = 38,87 mm; 5 = 37,93 mm; 6 = 40,45 mm; $t > 5,54$; $p < 0,05$).

4.2 GENETIK

4.2.1 GENOMEXKLUSION

Der Vergleich der Multilocusgenotypen von *R. ridibunda*-, *R. perezi*- und *R. grafi*-Weibchen mit ihren primären Oocyten zeigte eindeutig, daß immer das *R. perezi*-Genom während der Gametogenese der analysierten Hybriden ausgeschlossen wurde (Tab. 4-9). Ferner waren bei Oocyten von heterozygoten *R. ridibunda* zwei Banden zu finden.

Tab. 4-9: Vergleich des somatischen Genotyps der einzelnen Taxa mit dem in primären Oocyten gefundenen Genotypen. *R. perezi*-Allele sind fett markiert. PopNr = Populationsnummer (Abb. 2-1), N = Anzahl der untersuchten Tiere.

Taxon	Gewebe	PopNr	N	<i>ck</i>	<i>ldh-b</i>	<i>αgdh</i>	<i>gapdh</i>
<i>R. grafi</i>	Soma	7, 13, 24, 20, 4	11	ab	be	ab	cd
	Oocyten			b	b	a	d
	Soma	24	1	ab	ae	ab	cd
	Oocyten			b	a	a	d
	Soma	24	4	ab	bb	ab	cd
	Oocyten			b	b	a	d
	Soma	15	1	ab	be	ab	bc
	Oocyten			b	b	a	b
	Soma	1	1	ab	be	ab	cd
Oocyten			b	b	a	d	
<i>R. perezi</i>	Soma	7, 8, 20, 4	6	aa	ee	bb	cc
	Oocyten			a	e	b	c
	Soma	3, 4	3	aa	ee	bb	cc
	Oocyten			a	e	b	c
<i>R. ridibunda</i>	Soma	10	1	bb	ab	aa	dd
	Oocyten			b	ab	a	d
	Soma	10	2	bb	bc	aa	de
	Oocyten			b	bc	a	de
	Soma	6	6	bb	bb	aa	dd
	Oocyten			b	b	a	d
	Soma	6	1	bb	bc	aa	dd
	Oocyten			b	bc	a	d
	Soma	6	1	ab	bb	aa	dd
	Oocyten			ab	b	a	d
	Soma	6	3	bb	bb	aa	dd
	Oocyten			b	b	a	d
	Soma	6	1	bb	bc	aa	dd
	Oocyten			b	bc	a	d
	Soma	6	1	bb	bb	aa	dd
	Oocyten			b	b	a	d
Soma	6	2	bb	bb	aa	ee	
Oocyten			b	b	a	e	

4.2.2 GENETISCHE VARIABILITÄT

Zur Beschreibung der genetischen Variabilität wurden die vier Parameter Polymorphie (P), beobachtete Heterozygotie (Ho), mittlere Allelzahl über alle Loci (A) und über polymorphe Loci (Ap) berechnet. Hierbei zeigt *R. perezi* bei allen Parametern wesentlich niedrigere Werte als *R. ridibunda* und der Hybrid *R. grafi* (Tab. 4-10). Die hohe genetische Variabilität des Hybriden war wegen der durch die Hybridogenese verursachten fixierten Heterozygotie bei diagnostischen Loci zu erwarten. Erstaunlich hingegen ist die hohe genetische Variabilität von *R. ridibunda*, die fast doppelt so hoch ist, wie die von *R. perezi* und im Falle des Parameters Ap sogar den Hybriden übertrifft (Tab. 4-10).

Tab. 4-10: Die genetische Variabilität von *R. perezi*, *R. ridibunda* und *R. grafi*. Die einzelnen genetischen Parameter sind mit ihrem Mittelwert, den Maxima bzw. Minima und der Varianz angegeben. P = Polymorphie, A = Allelzahl über alle Loci, Ap = Allelzahl über die polymorphen Loci, Ho = Heterozygotie.

		P	A	Ap	Ho
<i>R. perezi</i>					
Alle Loci	Mittelwert	0,244	1,299	2,077	0,061
	Varianz	0,008	0,019	0,015	0,001
	Min.	0,056	1,056	2,000	0,017
	Max.	0,389	1,611	2,400	0,133
Diagnostische Loci	Mittelwert	0,333	1,343	1,681	0,069
	Varianz	0,062	0,070	0,602	0,005
	Min.	0,000	1,000	0,000	0,000
	Max.	0,833	1,833	2,250	0,278
<i>R. ridibunda</i>					
Alle Loci	Mittelwert	0,397	1,564	2,377	0,157
	Varianz	0,006	0,019	0,045	0,003
	Min.	0,333	1,444	2,000	0,105
	Max.	0,500	1,889	2,833	0,278
Diagnostische Loci	Mittelwert	0,361	1,528	2,639	0,094
	Varianz	0,050	0,065	0,368	0,002
	Min.	0,167	1,167	2,000	0,021
	Max.	0,833	2,000	4,000	0,176
<i>R. grafi</i>					
Alle Loci	Mittelwert	0,622	1,796	2,185	0,514
	Varianz	0,002	0,012	0,018	0,001
	Min.	0,556	1,611	2,000	0,464
	Max.	0,722	1,944	2,417	0,545
Diagnostische Loci	Mittelwert	1,000	2,158	2,158	0,971
	Varianz	0,000	0,025	0,025	0,001
	Min.	1,000	2,000	2,000	0,889
	Max.	1,000	2,500	2,500	1,000

Einen besseren Vergleich zwischen den beiden Parentalarten *R. perezii* und *R. ridibunda* erhält man, wenn man nur die für den PG-Komplex diagnostischen Loci in die Parameterberechnung einbezieht. In diesem Fall ist die genetische Variabilität von *R. ridibunda* zwar immer noch höher als die in *R. perezii*, übertrifft diese aber nicht so deutlich (Tab. 4-10).

Zwischen den einzelnen Gebieten sind zum Teil erhebliche Unterschiede in der genetischen Variation festzustellen. So zeigt *R. grafi* signifikant mehr Allele an polymorphen Loci in Gebiet 2 als in Gebiet 3 ($t = 3,2$; $p < 0,01$) und Gebiet 5 ($t = 5,2$; $p < 0,05$). Ferner ist die Heterozygotie in Gebiet 3 signifikant höher als in allen übrigen Gebieten ($t > 3,9$; $p < 0,01$). Die beiden Gebiete 4 und 5 unterscheiden sich signifikant nur in der Allelzahl ($t = 3,9$; $p < 0,05$; Abb. 4-7 C und D). Die genetische Variabilität von *R. grafi* an diagnostischen Loci des PG-Komplexes unterscheidet sich nicht signifikant in den einzelnen Gebieten (Abb. 4-8 C und D). Alle anderen paarweisen Vergleich zeigten ebenfalls keine Signifikanz.

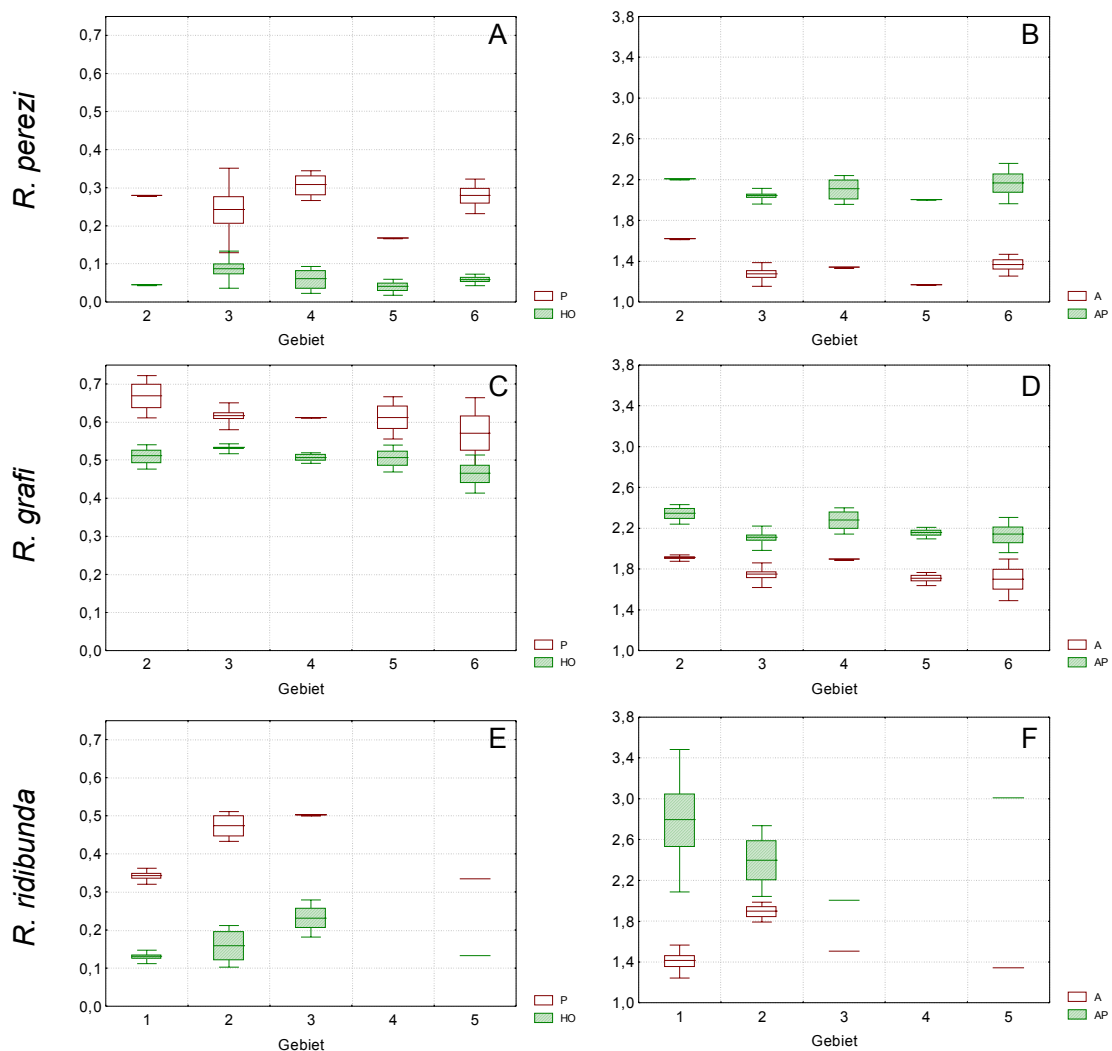


Abb. 4-7: Genetische Variation über alle Loci von *R. perezii* (A und B), *R. grafi* (C, D) und *R. ridibunda* (E, F) in den unterschiedlichen Gebieten (1 - 6). P = Polymorphie, Ho = Heterozygotie, A = Allelzahl über alle Loci, Ap = Allelzahl über polymorphe Loci. Box: Mittelwert \pm Standardfehler; Whisker: Maximum und Minimum.

Die Teilproben von *R. perezi* in den Gebieten 2 und 3 zeigten signifikant unterschiedliche Allelzahlen (2: $A = 1,61$; 3: $A = 1,27$; $t = 2,8$; $p < 0,05$). Die genetische Variabilität von *R. perezi* ist in Gebiet 5 bei allen berechneten Parametern am niedrigsten (Abb. 4-7 A und B) und unterscheidet sich signifikant in der Polymorphie von Gebiet 4 ($t = 6,7$; $p < 0,01$) und in der Anzahl der Allele von den Gebieten 2, 3, 4 und 6 ($t > 3,0$; $p < 0,05$). Bei Betrachtung der genetischen Variabilität der diagnostischen Loci konnten für alle vier Parameter schwach signifikante Unterschiede zwischen den Gebieten 3 und 6 festgestellt werden ($t > 2,0$; $p < 0,07$). Die anderen Gebiete unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Es gilt jedoch darauf hinzuweisen, daß die Gebiete 2 und 3 eine höhere Polymorphie und Heterozygotie zeigen als die Populationen 4, 5 und 6 im Gebiet 5 (Abb. 4-8 A und B).

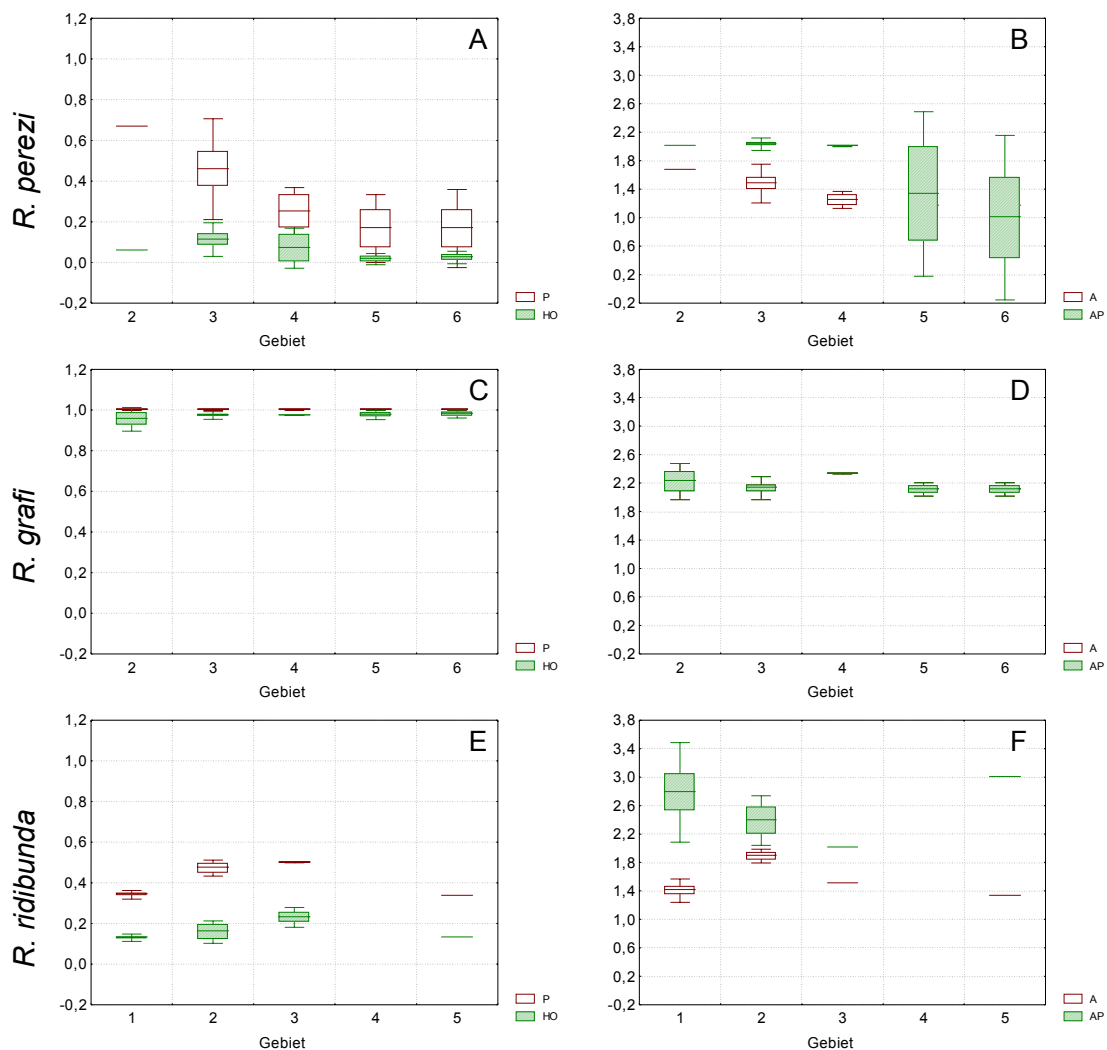


Abb. 4-8: Genetische Variation über die diagnostischen Loci von *R. perezi* (A und B), *R. grafi* (C, D) und *R. ridibunda* (E, F) in den unterschiedlichen Gebieten (1 - 6). P = Polymorphie, Ho = Heterozygotie, A = Allelzahl über alle Loci, Ap = Allelzahl über polymorphe Loci. Box: Mittelwert \pm Standardfehler; Whisker: Maximum und Minimum.

In Gebiet 1 zeigt *R. ridibunda* eine niedrigere genetische Variabilität, als in den Gebieten 2 und 3. Signifikante Unterschiede wurden für die Polymorphie ($t > 6,0$; $p < 0,001$), die Allelzahl (Gebiet 1 und 2: $t = 3,7$; $p < 0,01$) und die Heterozygotie gefunden (Gebiet 1 und 3: $t = 5,1$; $p < 0,001$; Abb. 4-7 E und F). Ähnliches gilt für die genetischen Parameter basierend auf den diagnostischen Loci. Besonders die Polymorphie unterscheidet sich zwischen Gebiet 1 und den Gebieten 2 und 3 ($t > 4,3$; $p < 0,01$; Abb. 4-8 E und F).

Die verschiedenen Tests zwischen den Gebieten zeigen, daß die geographische Lage einzelner Populationen einen Einfluß auf die genetische Variabilität zu haben scheint. Die genetischen Parameter über alle Loci sind allerdings im Fall von *R. grafi* und *R. perezi* nicht korreliert mit der Distanz zum Nullpunkt N2 ($R < 0,3$; $p > 0,05$). Für die genetischen Parameter der diagnostischen Loci ergibt sich aus den Korrelationsberechnungen ein anderes Bild. In diesem Fall zeigt *R. ridibunda* keine Korrelationen, *R. grafi* eine schwache Abnahme der Allelzahl und der Polymorphie nach Süden ($R = -0,38$; $p = 0,09$; Abb. 4-9 A und D) und *R. perezi* eine Abnahme der Heterozygotie nach Süden ($R = -0,55$; $p < 0,05$; Abb. 4-9 B). Ferner zeigt *R. perezi* eine Abnahme des Parameters A_p nach Süden ($R = -0,47$; $p < 0,05$; Abb. 4-9 E), aber auch in Abhängigkeit zur Entfernung zur nächsten PGR-Populationen ($R = -0,47$; $p < 0,05$; Abb. 4-9 C).

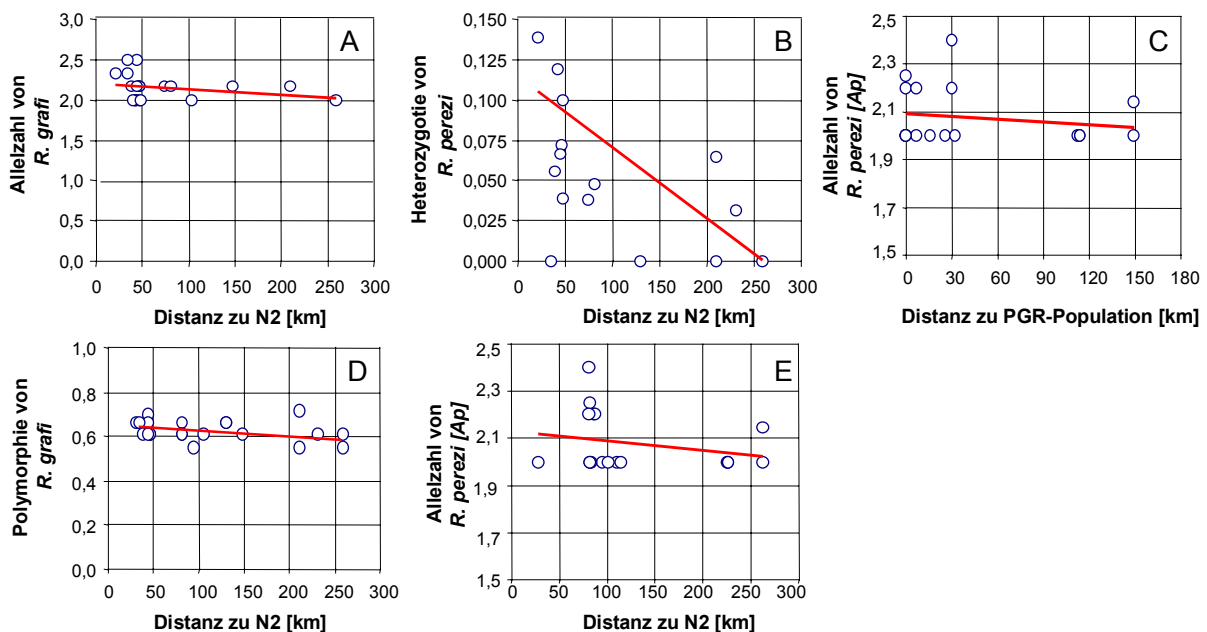


Abb. 4-9: Korrelationen verschiedener genetischer Parameter über die diagnostischen Loci mit der Distanz der untersuchten Populationen zum Nullpunkt N2 und zur nächsten PGR-Population. Vgl. auch Text.

Die Korrelation des Parameters A_p von *R. perezi* deutet auf einen Einfluß der An- bzw. Abwesenheit von *R. ridibunda* und damit auf den Populationstyp hin. Aus diesem Grund wurde getestet, ob die genetischen Parameter der einzelnen Taxa in unterschiedlichen Po-

populationssystemen signifikant voneinander abweichen. *R. perezi* zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Populationssystemen (Abb. 4-10 A). Dagegen waren die Polymorphie ($t = 2,6$; $p < 0,05$) und die Heterozygotie ($t = 1,9$; $p < 0,1$) von *R. ridibunda* in PGR-Populationen ($P = 0,456$; $H_o = 0,188$) grundsätzlich höher als in R-Populationen ($P = 0,361$; $H_o = 0,138$; Abb. 4-10 C). Im Fall von *R. grafi* ist die Polymorphie in PGR-Populationen signifikant höher als in PG-Populationen ($t = 2,7$; $p < 0,05$; vgl. Abb. 4-10 B). Unterschiede zwischen verschiedenen Populationssystemen konnten für die genetische Variabilität an für den PG-Komplex diagnostischen Loci für kein Taxon nachgewiesen werden.

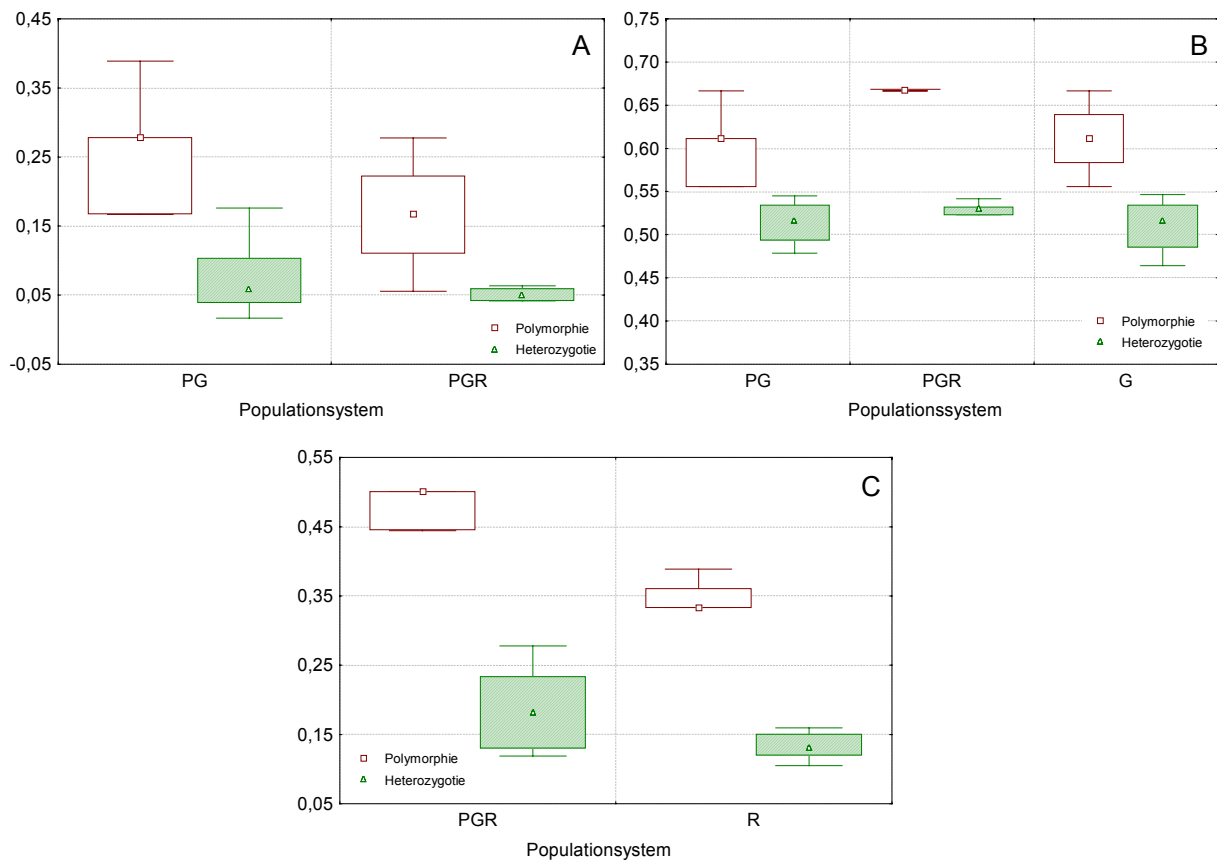


Abb. 4-10: Die Heterozygotie (H_o) und die Polymorphie (P) von *R. perezi* (A), *R. grafi* (B) und *R. ridibunda* (C) in den unterschiedlichen Populationssystemen (R, G, PG und PGR). Vgl. auch Text. Box: Mittelwert \pm Standardfehler; Whisker: Maximum und Minimum.

An dieser Stelle erscheint es sinnvoll, anhand einer Korrelationsanalyse zu testen, ob der Anteil der Taxa an den einzelnen Populationen einen Einfluß auf die genetische Variabilität haben, da der Fortpflanzungserfolg rekombinierter Genome von der Verfügbarkeit „guter“ Paarungspartner abhängig sein könnte (vgl. Kapitel 2.1). Folgende signifikante Zusammenhänge konnten gefunden werden:

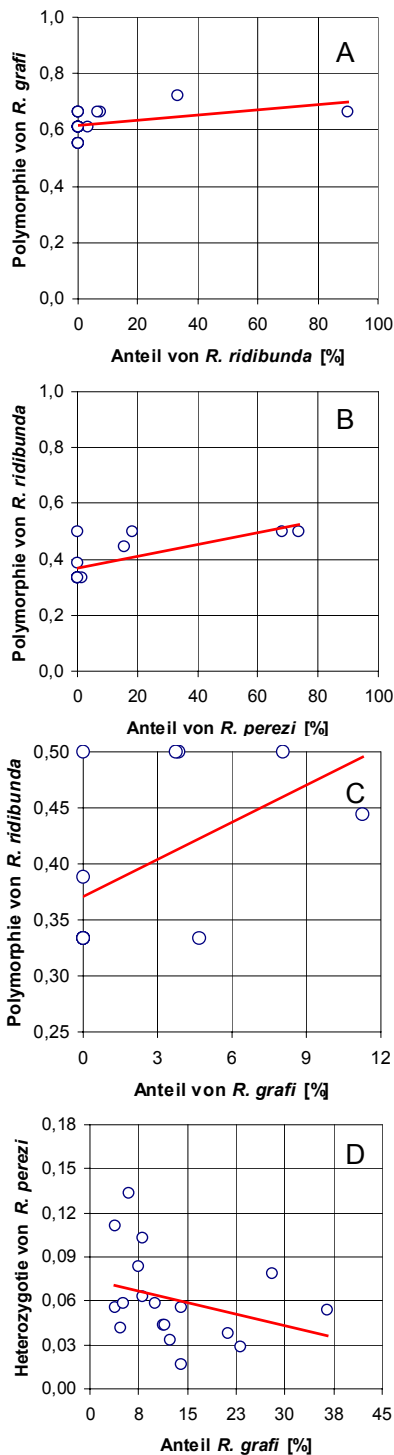


Abb. 4-11: Korrelationen von Polymorphie und Heterozygotie mit dem Anteil eines syntopen Taxons. Vgl. Text.

- *R. grafi* wird mit zunehmendem Anteil von *R. ridibunda* polymorpher ($R = 0,59$; $p < 0,01$; Abb. 4-11 A)
- *R. ridibunda* zeigt eine zunehmend höhere Polymorphie mit zunehmendem Anteil von *R. perezi* ($R = 0,68$; $p < 0,01$; Abb. 4-11 B) und *R. grafi* ($R = 0,53$; $p = 0,07$; Abb. 4-11 C)
- Bei *R. perezi* nimmt bei höherem Anteil von *R. grafi* die Heterozygotie ab ($R = -0,48$; $p < 0,05$; Abb. 4-11 C).

Die übrigen paarweisen Vergleiche erwiesen sich als nicht signifikant.

Hauptkomponentenanalysen zwischen den einzelnen genetischen Parametern über alle Loci, der Stichprobengröße N und dem Anteil der einzelnen Taxa bestätigen, daß die Polymorphie von *R. grafi* durch die Stichprobengröße N und die relative Häufigkeit von *R. ridibunda* (Faktorladungen: $N = -0,73$; $P = 0,86$; $\%Rid = 0,84$; $\%Per = -0,09$) beeinflusst wird.

Im Falle von *R. ridibunda* zeigte die Hauptkomponentenanalyse, daß nur die Polymorphie durch die unabhängigen Faktoren beeinflusst wird (Faktorladungen: $N = -0,97$; $P = 0,83$; $\%Gra = 0,89$; $\%Per = 0,83$).

Die Hauptkomponentenanalyse für die genetischen Parameter von *R. perezi* zeigten in keinem Fall einen Haupteinflussfaktor.

Bei Hauptkomponentenanalysen mit den genetischen Parametern der diagnostischen Loci ergab

sich nur für *R. grafi* ein Zusammenhang zwischen der Heterozygotie mit dem Anteil an *R. ridibunda* und der Stichprobengröße (Faktorladungen: $N = 0,76$; $H_0 = 0,72$; $\%Rid = -0,75$; $\%Per = -0,22$; vgl. auch Appendix 3, 4 und 5).

4.2.3 HARDY-WEINBERG-GLEICHGEWICHT

Die fixierte Heterozygotie in *R. grafi*, die durch die hybridogenetische Fortpflanzung bedingt ist, sollte erwartungsgemäß dazu führen, daß die diagnostischen Loci sämtlich einen Heterozygotenüberschuß zeigen und signifikant vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht abweichen. Im Gegensatz dazu wurden in manchen Populationen an mehreren Loci keine solchen Abweichungen festgestellt (Tab. 4-11). Besonders hervorzuheben sind die Populationen 15 und 21. Population 15 weicht an allen diagnostischen Loci, und Population 21 an sechs diagnostischen Loci (*6pgdh*, *ahh*, *ck*, *αgdh*, *gapdh*, *mpr-2*) von der Erwartung eines nicht vorhandenen HARDY-WEINBERG-Gleichgewichts ab. Weiterhin zeigten die Loci *got-2*, *pgm* und *pgi*, die als nicht diagnostisch für *R. perezi* und *R. ridibunda* eingestuft wurden, in einigen Fällen einen signifikanten Heterozygotenüberschuß.

Für die Parentalarten gilt der umgekehrte Fall, d.h. *R. perezi* und *R. ridibunda* sollten erwartungsgemäß keine Abweichungen vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht zeigen. Dennoch wurden für *R. perezi* in neun Fällen (nach Bonferroni-Korrektur in noch vier Fällen) signifikante Abweichungen gefunden. Wie bei *R. grafi* ist besonders Population 21 betroffen (Tab. 4-11).

Eine wesentlich höhere Zahl signifikanter Abweichungen vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht wurde bei *R. ridibunda* gefunden (21, nach Bonferroni-Korrektur elf Fälle). Besonders häufig sind Abweichungen an den Loci *gapdh*, *ldh-b* und *pgi*. Populationen mit auffällig vielen Abweichungen, wie bei *R. perezi* und *R. grafi*, wurden nicht beobachtet. Alle Populationen, mit Ausnahme der Population 15, wichen mindestens an einem Locus signifikant vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht ab (Tab. 4-11).

Beim Vergleich der signifikanten Abweichungen vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht in PG- und PGR-Populationen zeigt sich, daß in PG-Populationen *R. grafi* nur in drei Fällen von 98 (3,1%; mit Bonferroni-Korrektur 10 von 98 = 10,2%) an diagnostischen Loci keinen signifikanten Heterozygotenüberschuß zeigt. Im Gegensatz dazu weicht *R. grafi* in PGR-Population in sieben von 35 Fällen (20%; mit Bonferroni-Korrektur 14 von 35 = 40%) nicht vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht ab, zeigt also nicht den erwarteten Heterozygotenüberschuß. Für *R. perezi* ergibt sich bei diesem Vergleich ein ähnliches Bild. Hier konnte in drei von 91 Fällen (3,3%; mit Bonferroni-Korrektur 2 von 91 = 2,2%) ein Heterozygotenüberschuß in PG-Populationen beobachtet werden, wohingegen in PGR-Populationen in 11,4% (4 von 35; mit Bonferroni-Korrektur 1 von 35 = 2,9%) der Fälle ein Heterozygotenüberschuß festgestellt werden konnte.

Tab. 4-11: Signifikanz der Tests auf HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht an den polymorphen Loci (BIOSYS v1.7). Fett markierte Werte weichen auch nach populationsweiter Bonferro-ni-Korrektur signifikant von einem HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht ab. PopNr = Populationsnummer (Abb. 2-1). Leere Tabellenfelder entsprechen nicht signifikanten Abweichungen, d.h. der p-Wert lag über 0,05.

	PopNr	N	ck	agdh	gapdh	ldh-b	mpi	mpr-2	pgm	ahh	pgi	6pgdh	got-2	
R. grafi	1	16	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001		< 0,001		
	2	21	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	0,027	< 0,001		0,001		< 0,001		
	4	18	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001		< 0,001				
	5	17	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001		< 0,001	< 0,001	
	7	16	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	0,003	< 0,001	0,047	< 0,001		0,003	
	8	20	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		0,001		< 0,001	< 0,001	
	9	12	0,001	0,001	0,012	0,020	0,001	0,001		0,015		0,001	0,005	
	11	27	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,016		0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	
	12	15	< 0,001	< 0,001	0,005	< 0,001	0,022	0,005	< 0,001	0,003			< 0,001	
	13	16	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001		0,001				
	14	54	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001	0,006	< 0,001	< 0,001	
	15	8	0,008	0,043			0,043	0,043		0,025				
	16	29	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
	17	22	< 0,001	0,043	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	
	18	29	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001	0,006	< 0,001	< 0,001	
	19	37	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001	0,008	< 0,001	< 0,001	
	20	19	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001	0,006	0,002	0,049	
	21	7		0,014		0,004	0,014	0,015						
	22	25	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001	< 0,001	0,045	< 0,001	
	23	25	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		< 0,001		< 0,001	< 0,001	
	24	18	< 0,001	< 0,001	0,037	0,001	0,001	< 0,001		< 0,001		< 0,001	0,001	
	R. perezi	1	10											
		2	9											
		3	37			0,001								0,032
4		19												
6		4			0,021							0,021		
7		10												
8		8												
9		13												
11		18												
13		18	0,002		0,027									
14		5												
15		2												
17		3												
18		7												
19	7													
20	5													
21	6	< 0,001										0,009		
23	10								< 0,001					
24	6													
R. ridibunda	6	24			< 0,001									
	10	22					< 0,001							
	15	5												
	17	2										0,046		
	19	4						0,007						
	21	8				0,050		0,002						
	25	27			< 0,001	0,028					< 0,001			
	26	27				0,027					< 0,001			
	27	20			0,050						< 0,001	0,019		
	28	28									0,003			
	29	28				0,007					< 0,001	0,038		
	30	28				0,023					< 0,001			
31	29			< 0,001										

4.2.4 INTROGRESSION

Innerhalb der einzelnen Taxa wurden, bezogen auf die diagnostischen Genorte, verschiedene rekombinierte Multilocusgenotypen gefunden, die fremde Allele zeigten: 87 *R. grafi* (18,8% der Taxonteilprobe), 83 *R. perezi* (41,5%) und 208 *R. ridibunda* (81,9%). Damit zeigten fast drei Viertel aller Tiere rekombinierte Genotypen (378 = 41,3%).

Die höchste mittlere Introgression an diagnostischen Loci des PG-Komplexes (PG-Introgression) wurde mit 6,20 ($\pm 0,42$) in *R. ridibunda* nachgewiesen und ist signifikant höher als die PG-Introgression in *R. perezi* ($2,92 \pm 0,43$; $t = 5,4$; $p < 0,001$) und *R. grafi* ($0,63 \pm 0,10$; $t = 16,6$; $p < 0,001$). Signifikant ist der Unterschied auch zwischen *R. grafi* und *R. perezi* ($t = 7,1$; $p < 0,001$; Abb. 4-12). Die totale Introgression über die Loci *6pgdh*, *ahh*, *ck*, *pgi*, *gapdh*, *α gdh*, *got-2*, *ldh-b* und *mpr-2* unterscheidet sich signifikant zwischen *R. grafi* (2,06) und *R. perezi* (4,70; $t = 5,5$; $p < 0,001$) und ebenfalls zwischen diesen beiden Taxa und *R. ridibunda* (9,18; $t > 6,6$; $p < 0,001$; Abb. 4-12).

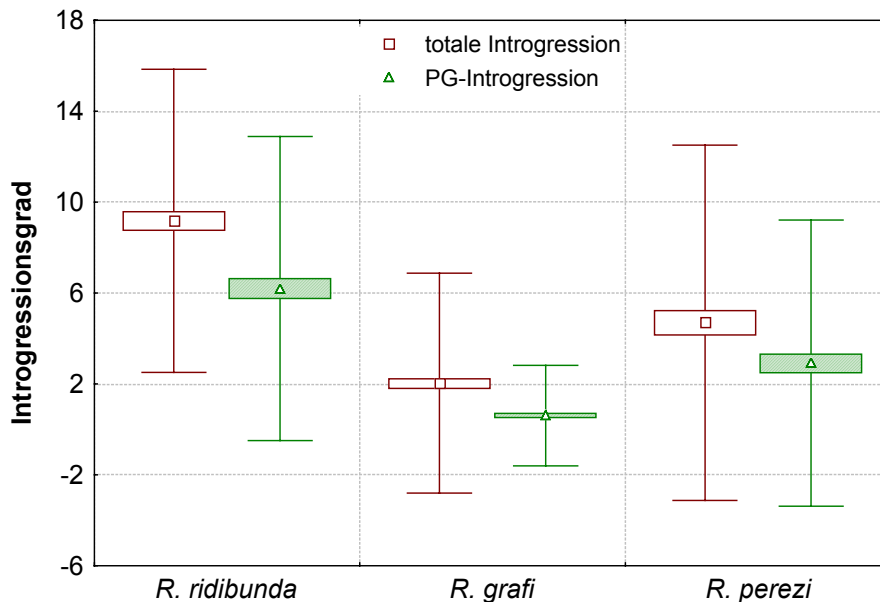


Abb. 4-12: PG-Introgression und totale Introgression von *R. perezi*, *R. grafi* und *R. ridibunda*. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardfehler (Box), und die Standardabweichung (Whisker).

Bei allen Taxa wurde ein Maximum an Introgression für beide Berechnungen im Gebiet 2 nachgewiesen. Die geringste gebietsweise Introgression für *R. perezi* und *R. grafi* wurde in Gebiet 6, für *R. ridibunda* in Gebiet 1 gefunden (vgl Tab. 4-12.).

Tab. 4-12: Unterschiede in der Introgression der einzelnen Wasserfroschtaxa in den Gebieten 1 - 6. Angegeben sind die Introgressionswerte über die diagnostischen Loci des PG-Komplexes und die totale Introgression (vgl. Text) mit den jeweiligen Standardfehlern.

PG- Introgression	Gebiet					
	1	2	3	4	5	6
<i>R. ridibunda</i>	7,21±0,38	17,37±1,44	13,69±2,50		12,83±1,52	
<i>R. grafi</i>		4,03±0,77	1,74±0,21	1,75±0,57	3,26±0,49	0,71±0,33
<i>R. perezi</i>		7,62±2,53	4,63±0,80	1,25±0,25	1,82±0,90	0,85±0,36
Totale Introgression						
<i>R. ridibunda</i>	9,36±0,40	16,89±1,16	14,38±1,92		16,33±1,71	
<i>R. grafi</i>		8,68±1,73	2,90±0,36	2,00±0,71	5,35±0,80	0,81±0,39
<i>R. perezi</i>		6,35±4,60	5,75±0,80	1,11±0,11	3,54±1,29	1,41±0,41

Tab. 4-12 zeigt, daß in Gebieten mit syntopem Vorkommen von *R. ridibunda*, *R. perezi* und *R. grafi* im Vergleich mit den übrigen Gebieten die Introgression höher ist. Es scheint deshalb, daß die Populationszusammensetzung auf das Ausmaß an Introgression einen Einfluß hat. Aus dieser Überlegung lassen sich vier Hypothesen ableiten:

- (1) Die Introgression nimmt mit größerer Entfernung zu PGR-Populationen ab;
- (2) Die Introgression von *R. grafi* und *R. perezi* nimmt durch das begrenzte Vorkommen von *R. ridibunda* nach Süden hin ab;
- (3) Die Höhe der Introgression ist abhängig vom Anteil der verschiedenen Taxa in einer Population;
- (4) Die Introgression ist in PGR-Populationen im Vergleich zu anderen Populationssystemen höher.

Für *R. grafi* zeigten Rangkorrelationen nur für Hypothese 2 eine signifikante nach Süden gerichtete Abnahme der totalen Introgression an ($R = -0,60$; $p < 0,01$; Abb. 4-13 A). Ferner konnte für die totale Introgression eine tendenzielle Abnahme mit zunehmender Distanz zu PGR-Populationen festgestellt werden ($R = -0,39$; $p = 0,08$; Abb. 4-13 B).

Der t-Test zum Vergleich der PG-Introgression bei *R. grafi* in PG- bzw. PGR-Population (Hypothese 4) ist ebenfalls nur als Tendenz zu werten (PG: 0,58; PGR: 0,91; $t = 1,26$; $p = 0,13$), wohingegen die totale Introgression in beiden Populationssystemen hoch signifikant verschieden ist (PG: 1,29; PGR: 3,04; $t = 3,6$; $p < 0,001$; Abb. 4-15 B).

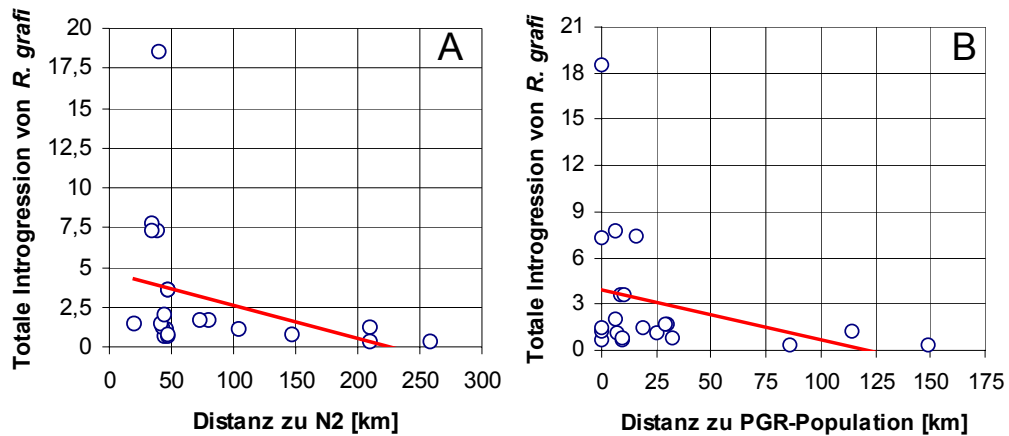


Abb. 4-13: Korrelation zwischen Introgressionswerten von *R. grafi* und der Distanz zum Nullpunkt N2 der Population (A) bzw. der Distanz zur nächsten PGR-Population (B).

Eine Hauptkomponentenanalyse für *R. grafi* mit den Introgressionswerten, dem Anteil der Parentalarten, der Distanz zum Nullpunkt N2 und zur nächstgelegenen PGR-Population ergab eine Abhängigkeit der totalen Introgression von der Distanz zum Nullpunkt N2 und zur nächsten PGR-Population. Die PG-Introgression von *R. grafi* zeigt keine Abhängigkeit (Appendix 6).

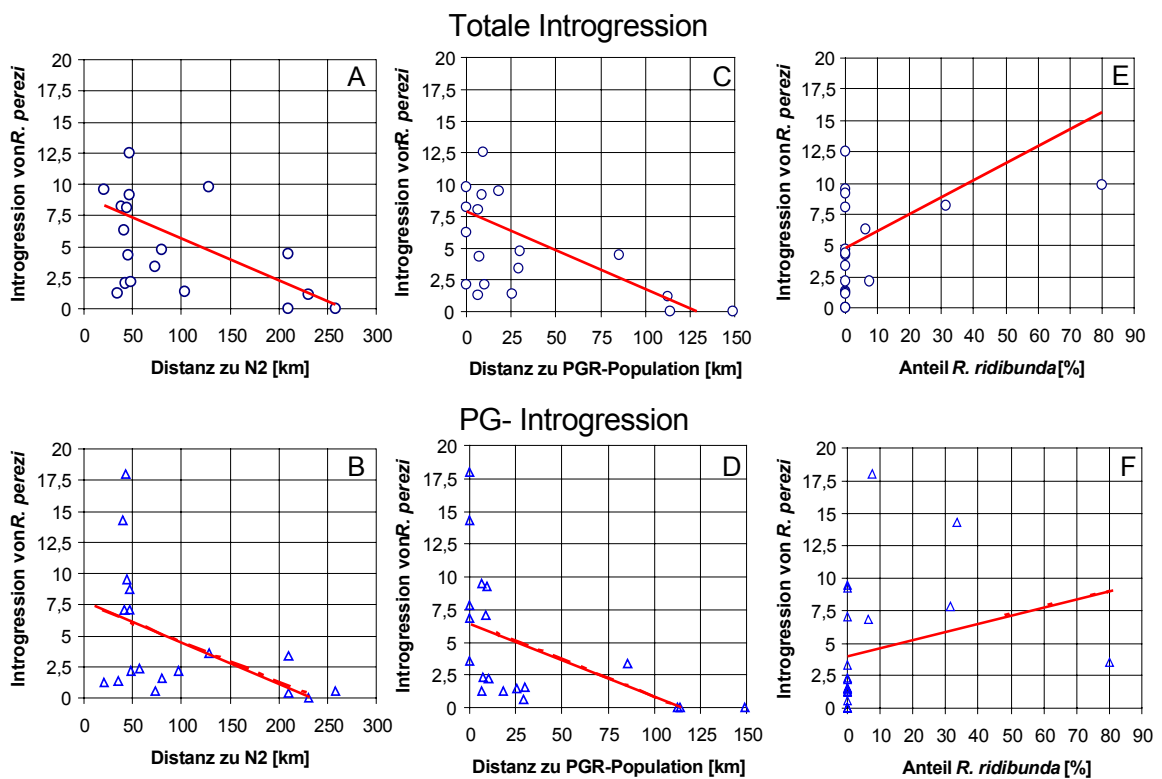


Abb. 4-14: Korrelation zwischen Introgressionswerten von *R. perezi* und der Distanz zum Nullpunkt N2 der Population (A, B), der Distanz zur nächsten PGR-Population (C, D) und dem Anteil von *R. ridibunda* (E, F).

Bei der Analyse der Introgression von *R. perezi* zeigten sich signifikante Abhängigkeiten mit dem Anteil an *R. ridibunda* (PG-Introgression: $R = 0,57$; $p < 0,01$; Abb. 4-14 B; total: $R = 0,44$; $p < 0,05$; Abb. 4-14 A), der Entfernung zu PGR-Populationen (PG-Introgression: $R = -0,77$; $p < 0,001$; Abb. 4-14 D; total: $R = -0,56$; $p < 0,01$; Abb. 4-14 C) und eine Abnahme der Introgression nach Süden (PG-Introgression: $R = -0,51$; Abb. 4-14 F; total: $R = -0,47$; $p < 0,05$; Abb. 4-14 E) für beide der berechneten Introgressionswerte.

In PG-Populationen erreicht *R. perezi* eine mittlere Introgression von 2,53 (total: 3,90), das entspricht etwa einem Drittel der Introgression in PGR-Populationen (PG-Introgression: 7,96; total: 10,53). Der durchgeführte t-Test konnte die Signifikanz des Unterschiedes zeigen ($t > 3,8$; $p < 0,001$; Abb. 4-15 A). Die Hauptkomponentenanalyse für *R. perezi* und den verschiedenen Faktoren zeigte einen Zusammenhang für beide Introgressionswerte mit der Distanz zum Nullpunkt N2 und zur nächsten PGR-Population (Appendix 7).

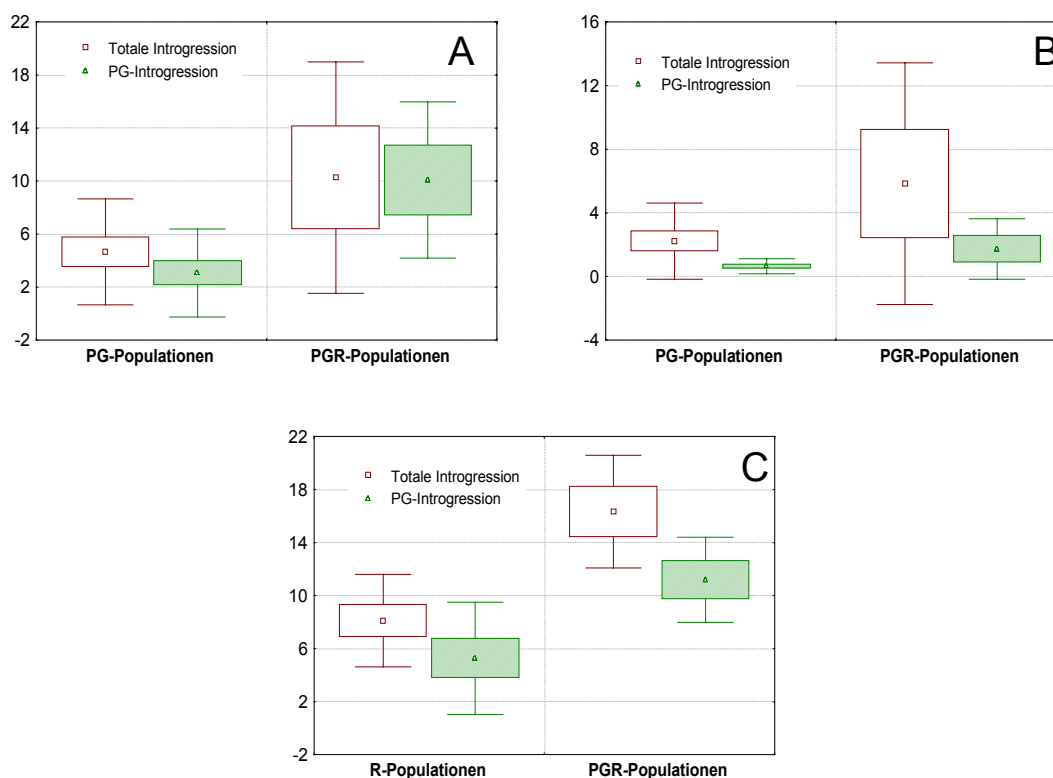


Abb. 4-15: Vergleich der Introgressionswerte von *R. perezi* (A), *R. grafi* (B) und *R. ridibunda* (C) in den unterschiedlichen Populationssystemen. Box: Mittelwert \pm Standardfehler; Whisker: Standardabweichung.

Die Introgression von *R. ridibunda* nimmt mit dem Anteil von *R. grafi* (PG-Introgression: $R = 0,60$; Abb. 4-16 B; total: $R = 0,67$; $p < 0,05$; Abb. 4-16 A) und *R. perezi* (PG-Introgression: $R = 0,67$; $p < 0,05$; Abb. 4-16 D; total: $R = 0,70$; $p < 0,01$; Abb. 4-16 C) zu. Gefunden wurde ferner eine signifikante Zunahme der Introgression von Norden nach Süden (PG-Introgression: $R = 0,63$; Abb. 4-16 F; total: $R = 0,64$; $p < 0,05$, Abb. 4-16 E) und ein signifikanter Unterschied der Höhe der mittleren Introgression in R- und PGR-Populationen (PG-

Introgression: $I_R = 5,13$; $I_{PGR} = 11,15$; $t = 5,8$; total: $I_R = 8,10$; $I_{PGR} = 14,33$; $p < 0,001$; Abb. 4-15 C). Die Hauptkomponentenanalyse mit den Faktoren für *R. ridibunda* (Introgressionswerte, Anteil an *R. grafi* und *R. perezi*, der Distanz zu N1) zeigt einen Einfluß aller Faktoren auf die Introgression von *R. ridibunda* (Appendix 8).

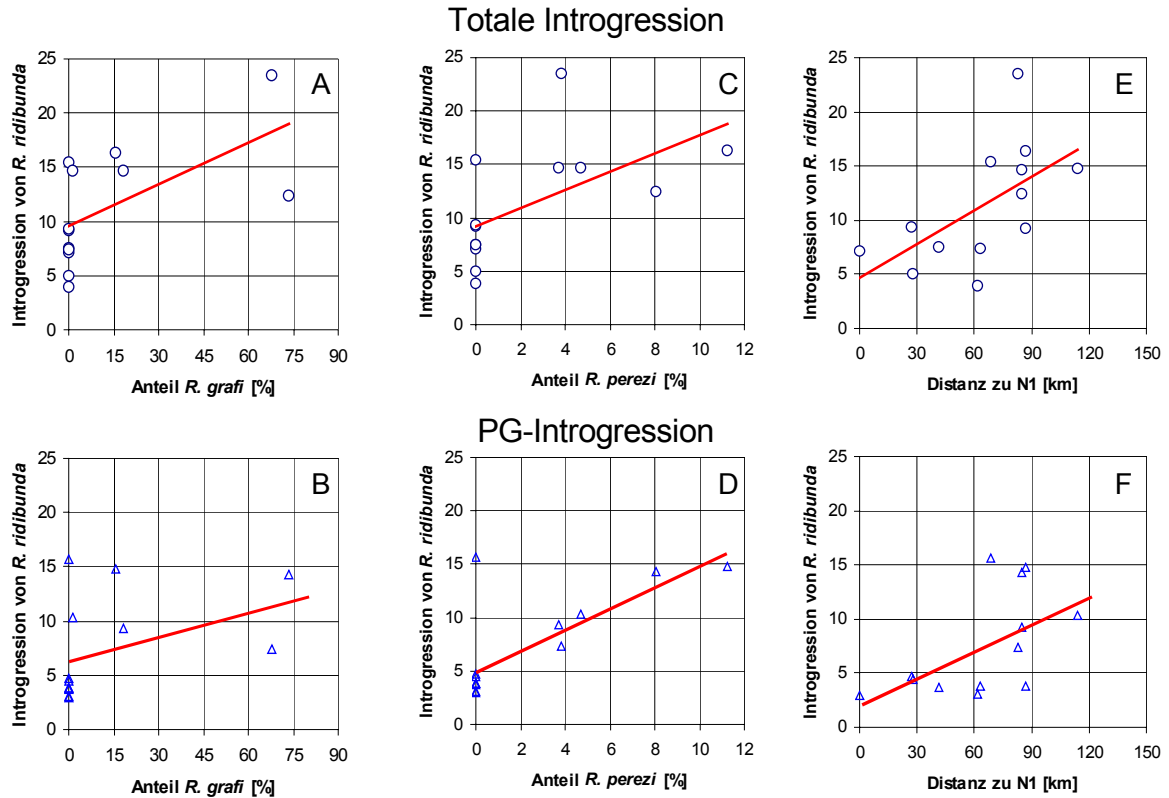


Abb. 4-16: Korrelation zwischen Introgressionswerten von *R. ridibunda* und dem Anteil von *R. grafi* (A, B) bzw. *R. perezi* (C, D) und der geographischen Position der Population (E, F).

Bei der Analyse der Populationszusammensetzungen stellte sich heraus, daß in natürlichen Populationen der Anteil an Py- und Rx-Gameten durch den Hybriden erhöht worden sein könnte. Hieraus läßt sich ableiten, daß in *R. perezi*-Männchen und *R. ridibunda*-Weibchen die Introgression bei Syntopie mit *R. grafi* höher sein muß als im jeweiligen komplementären Geschlecht. Ein t-Test zeigte keine Signifikanz der Unterschiede an, dennoch ist festzustellen, daß die Introgression in *R. ridibunda*-Weibchen (13,08) größer ist als in *R. ridibunda*-Männchen (11,52; $t = 0,62$; $p > 0,05$) und in *R. perezi*-Männchen (3,63) größer als in *R. perezi*-Weibchen (3,00; $t = 0,38$; $p > 0,05$).

4.2.5 DER EINFLUSS DER INTROGRESSION AUF DIE GENETISCHE VARIABILITÄT

Die hohe genetische Variabilität der einzelnen Taxa ist z.T. auf Inkorporation von Fremdallelen und damit direkt auf Introgressionsereignisse zurückzuführen. Aus diesem Grund wurden Korrelationsanalysen zwischen den einzelnen genetischen Parametern (über alle Loci) und der populationsweisen Introgression der einzelnen Taxa durchgeführt. Dabei deuten bei *R. perezii* die Korrelationen darauf hin, daß nur die Heterozygotie signifikant durch sowohl die PG-Introgression ($R = 0,54$; $p < 0,05$; Abb. 4-17 A) als auch die totale Introgression ($R = 0,56$; $p < 0,05$; Abb. 4-17 B) beeinflusst werden.

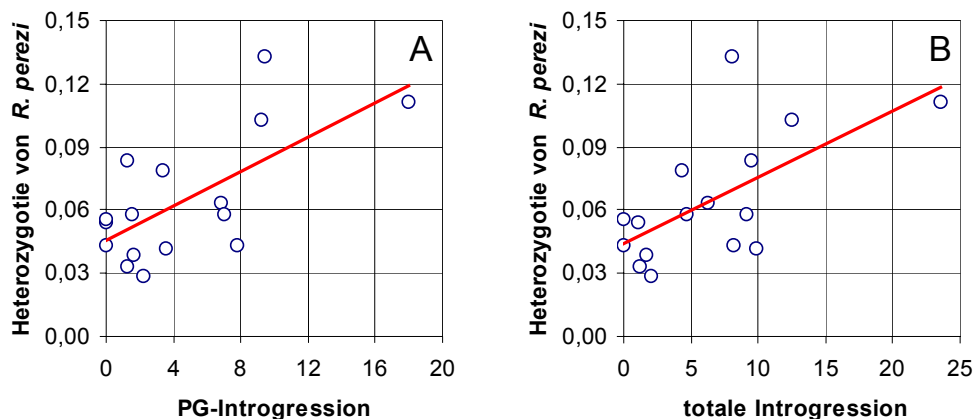


Abb. 4-17: Korrelationen der Heterozygotie von *R. perezii* mit der PG-Introgression (A) und der totalen Introgression (B).

Eine Hauptkomponentenanalyse unter Berücksichtigung der einzelnen genetischen Parameter von *R. perezii* und der Entfernung zum Nullpunkt N2, der Entfernung zu PGR-Populationen und den beiden Introgressionswerten zeigte hingegen keine Zusammenhänge (Appendix 9).

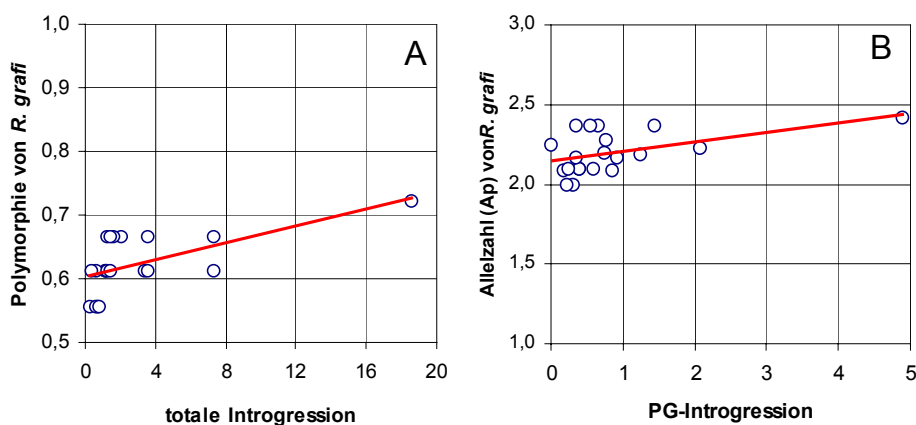
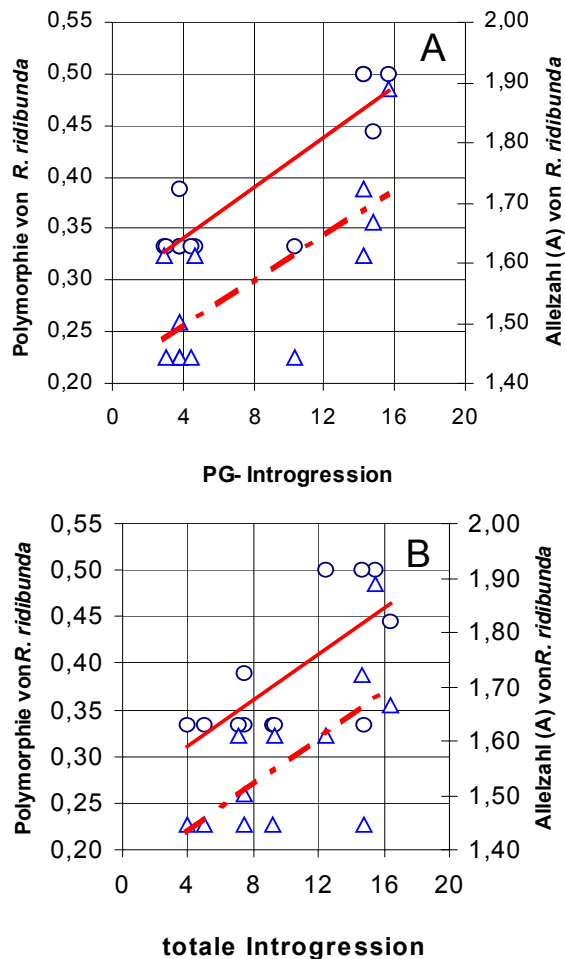


Abb. 4-18: Korrelation zwischen der Polymorphie und der totalen Introgression (A) und der Allelzahl (A_p) und der PG-Introgression (B) bei *R. grafi*.

Beim Hybriden *R. grafi* konnte nur zwischen der Polymorphie und der Totalintrogression ($R = 0,67$; $p < 0,05$; Abb. 4-18 A) und dem Parameter Ap mit der PG-Introgression ($R = 0,46$; $p < 0,05$; Abb. 4-18 B) ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte nur im Falle der Polymorphie einen Zusammenhang mit dem relativen Anteil von *R. ridibunda*, der Distanz zu N2 und PGR-Populationen und beiden Introgressionswerten (Appendix



trogessionswerten (Appendix 10).

Die Parentalform *R. ridibunda* zeigte signifikante Korrelationen für die Parameter P und A ($R > 0,61$; $p < 0,05$; Abb. 4-19) für beide Introgressionswerte. Die Hauptkomponentenanalyse für *R. ridibunda* verdeutlicht einen Zusammenhang zwischen der Polymorphie und dem relativen Anteil von *R. perezi*, der Distanz zu N1 und den beiden Introgressionswerten (Appendix 11).

Abb. 4-19: Korrelationen zwischen der Polymorphie bzw. Allelzahl und der PG-Introgression (A) und der totalen Introgression (B). Die Trendlinie für die Allelzahl ist gestrichelt dargestellt.

4.2.6 DIAGNOSTISCHE AUSSAGEKRAFT

Die diagnostische Aussagekraft der einzelnen Loci ist direkt auf die Introgressionsereignisse zurückzuführen. Da die Taxonzuordnung auf der Anzahl der taxonspezifischen Genotypen im Multilocusgenotyp eines Tieres basiert, ergibt der prozentuale Anteil an unerwarteten Genotypen an einem Locus bezogen auf das Taxon ein Maß für die diagnostische Aussagekraft der einzelnen Loci (Fehlerrate).

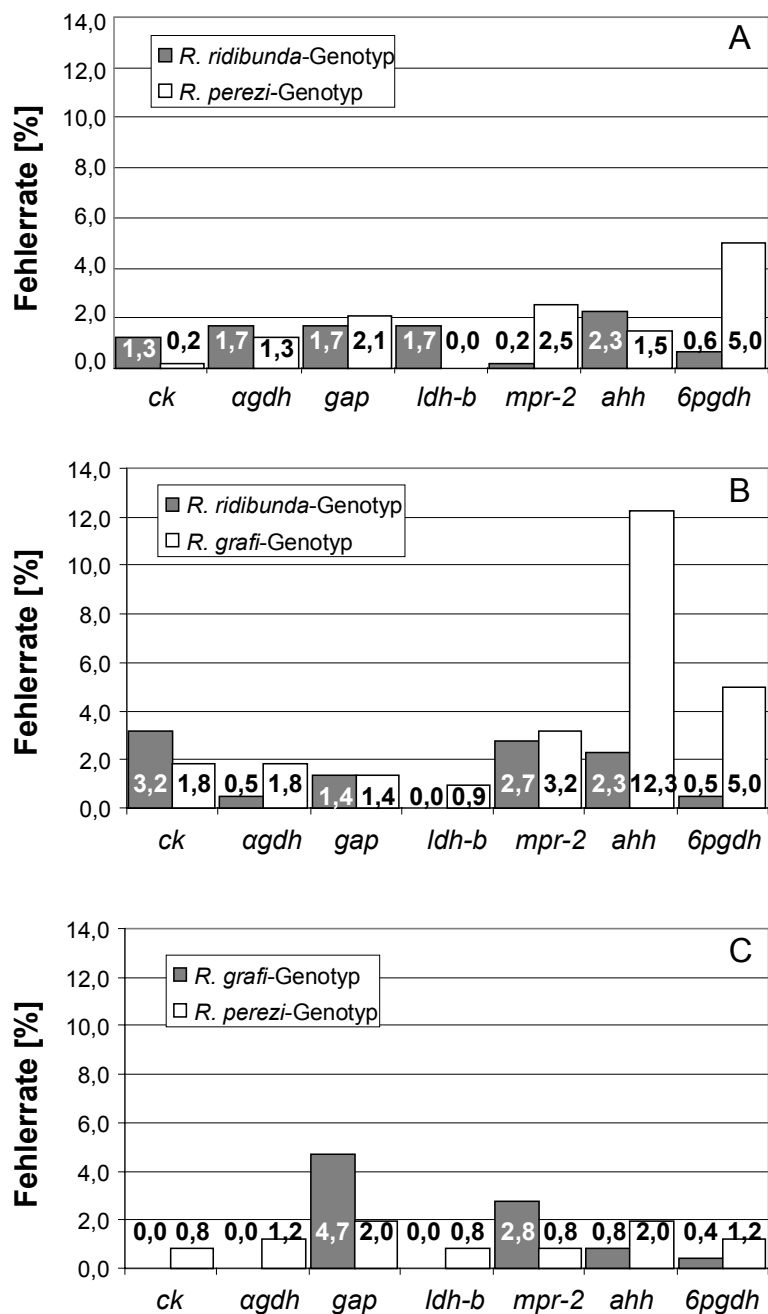


Abb. 4-20: Fehlerrate der diagnostischen Loci bei *R. grafi* (A), *R. perezi* (B) und *R. ridibunda* (C).

Über alle Taxa zeigt der Locus *Idh-b* mit 3,4 die geringste Fehlerrate, alle anderen Loci zeigen eine zumindest doppelt so hohe Fehlerrate. Die höchste Aussagekraft bei *R. grafi* hat Locus *ck* (Fehlerrate 1,5; Abb. 4-20 A), bei *R. perezi* der Locus *Idh-b* (0,9; Abb. 4-20 B) und auch bei *R. ridibunda* zeigen die Loci *ck* und *Idh-b* die geringste Fehlerrate (0,8; Abb. 4-20 C).

Betrachtet man die Fehlerraten der einzelnen Loci im nördlichsten bzw. südlichsten Gebiet stellt man fest, daß im Gebiet 6 alle Werte für *R. grafi* und *R. perezi*, mit Ausnahme des Locus *ck* bei *R. grafi*, und im Gebiet 1 für *R. ridibunda* wesentlich niedriger sind. Sechs der sieben für das PG-System diagnostischen Loci weisen im Gebiet 6 für *R. perezi* keine Fehlerrate mehr auf. Das gleiche gilt für drei Loci von *R. grafi*. Ferner sind in fast allen Fällen die Fehlerraten der einzelnen Loci im Süden kleiner als in der Gesamtbetrachtung (Abb. 4-20; Tab. 4-13).

Tab. 4-13: Fehlerrate der diagnostischen Loci im Gebiet 6 für *R. grafi* und *R. perezi* und im Gebiet 1 für *R. ridibunda*.

			<i>ck</i>	<i>αgdh</i>	<i>gapdh</i>	<i>Idh-b</i>	<i>mpr-2</i>	<i>ahh</i>	<i>βpgdh</i>
Gebiet 6	<i>R. grafi</i>	<i>R. ridibunda</i> -Genotyp	0,0	1,8	0,0	1,8	0,0	3,6	0,0
		<i>R. perezi</i> -Genotyp	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>R. perezi</i>	<i>R. ridibunda</i> -Genotyp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
		<i>R. grafi</i> -Genotyp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	2,7
Gebiet 1	<i>R. ridibunda</i>	<i>R. grafi</i> -Genotyp	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	1,1
		<i>R. perezi</i> -Genotyp	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,5

4.2.7 PLANIMETRIE

Für die planimetrische Vermessung der Erythrocyten wurden insgesamt 442 Blutaussstriche analysiert. Es wurden 244 *R. grafi*, 150 *R. perezi* und 48 *R. ridibunda* untersucht. Die Erythrocytenflächen (EF) der einzelnen Taxa weichen im Mittel signifikant voneinander ab ($t > 3,2$; $p < 0,01$). Dabei zeigt *R. perezi* ($184,91 \mu\text{m}^2$) die geringste und *R. ridibunda* ($205,79 \mu\text{m}^2$) die größte Fläche. *R. grafi* nimmt mit $193,50 \mu\text{m}^2$ Erythrocytenfläche eine mittlere Stellung zwischen den beiden Parentalarten ein (Abb. 4-21; Abb. 4-22). Dabei zeigt *R. grafi* (Min. = $138,90 \mu\text{m}^2$; Max. = $246,51 \mu\text{m}^2$) keine signifikanten Unterschiede zwischen der kleinsten Fläche von *R. perezi* ($138,99 \mu\text{m}^2$; $t = -0,034$; $p > 0,05$) und der größten Fläche von *R. ridibunda* ($253,97 \mu\text{m}^2$; $t = -1,44$; $p > 0,05$). Es konnte allerdings kein Tier nachgewiesen werden, das besonders große Erythrocyten gezeigt hätte, wie sie für Triploide (EF $> 350 \mu\text{m}^2$, Uzzell und Berger 1975) beschrieben wurden.

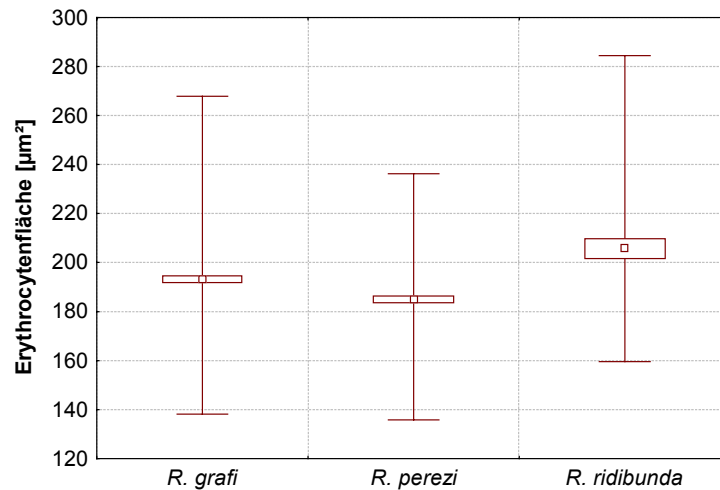


Abb. 4-21: Erythrocytenfläche der untersuchten Taxa. Box: Mittelwert \pm Standardfehler; Whisker: Maximum und Minimum.

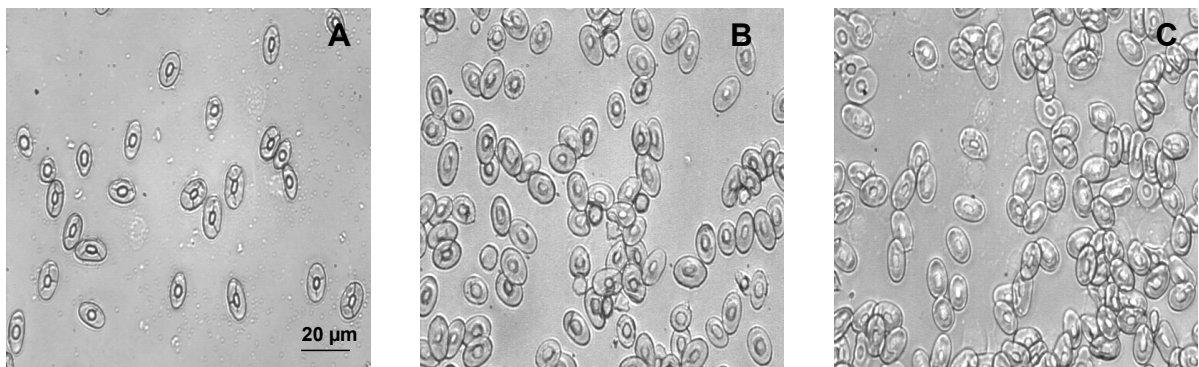


Abb. 4-22: Blutausstriche von *R. perezi* (Tier 7-1; A), *R. grafi* (Tier 9-2; B) und *R. ridibunda* (Tier 10-1; C). Bei genauer Betrachtung ist der leichte Größenunterschied zwischen den Taxa zu erkennen.

Schröder (1996) kritisierte die Planimetrie als für die Ploidiebestimmung von Wasserfröschen unzuverlässig, weil die Erythrocytengröße geographisch stark schwankt und somit nur unsichere Aussagen getroffen werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine geographische Varianz für den populations- und taxonweise berechneten

Mittelwert der Erythrocytenflächen festgestellt werden. So konnte sowohl für *R. grafi* ($R = 0,60$; $p < 0,05$), als auch für *R. perezi* ($R = 0,65$; $p < 0,05$) eine signifikante Zunahme nach Süden hin nachgewiesen werden (Abb. 4-24). Ferner sind andere Einflußfaktoren bekannt. So ist die Größe von Erythrocyten zum einen korreliert mit der Sauerstoffbindungskapazität ihres Hämoglobins und zum anderen mit der Verfügbarkeit von Sauerstoff in unterschiedlichen Habitaten (Tunner und Nopp 1979). Es erscheint deshalb sinnvoll, die mittlere

Erythrocytenfläche eines Taxons einer Population mit den jeweils herrschenden Sauerstoffverhältnissen zu korrelieren. Hierbei konnte nur für den Mittelwert und den Median der Erythrocytenfläche von *R. grafi* ein schwacher Zusammenhang gefunden werden ($R_{\text{Mittelwert}} = -0,55$; $p < 0,1$; $R_{\text{Median}} = -0,62$; $p < 0,05$; Abb. 4-23).

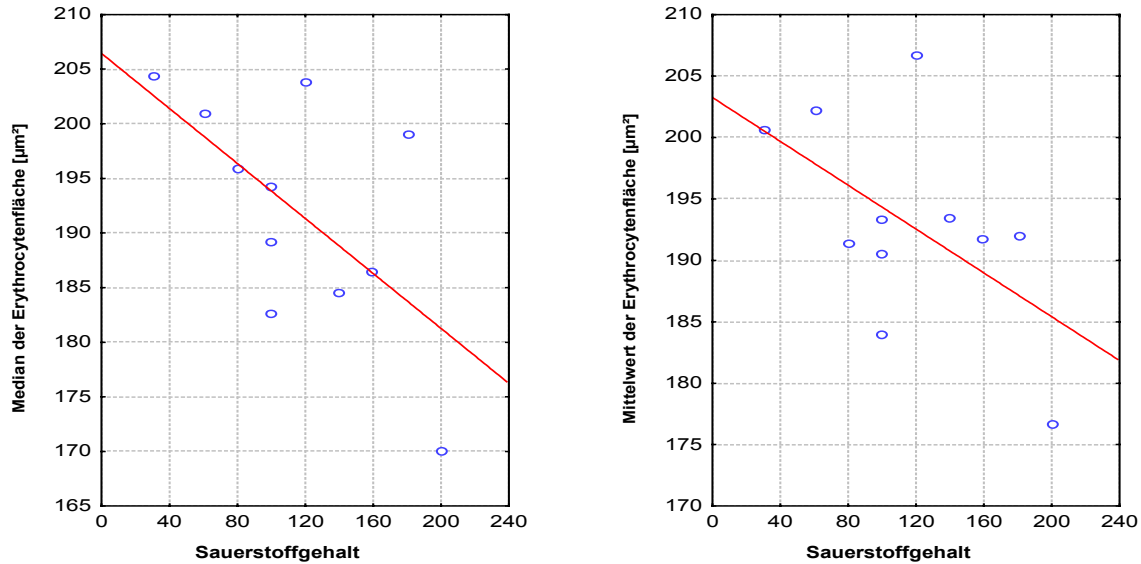


Abb. 4-23: Korrelation des Medians und Mittelwerts der Erythrocytenfläche von *R. grafi* mit dem Sauerstoffgehalt im jeweiligen Gewässer.

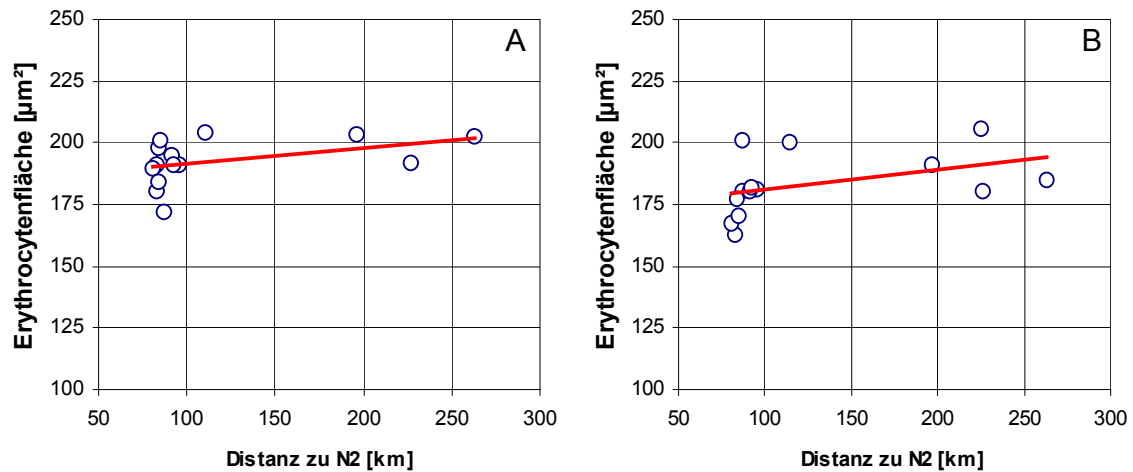


Abb. 4-24. Korrelation der Erythrocytenflächen von *R. grafi* (A) und *R. perezi* (B) mit der Distanz zum Nullpunkt N2.

4.2.8 FLUßZYTOMETRIE

In Übereinstimmung mit der Vermessung der Erythrocyten konnten auch unter den 222 flußzytometrisch untersuchten *R. grafi* keine triploiden Tiere gefunden werden. Dabei lag der mittlere AT-Gehalt in *R. grafi* mit 3,527 pg nur unwesentlich höher als bei *R. perezi* (3,526 pg, 30 untersuchte Tiere). Beide Werte waren allerdings signifikant höher als der mittlere AT-Gehalt von *R. ridibunda* (3,504 pg; $t > 2,6$; $p < 0,01$; 15 untersuchte Tiere; Abb. 4-25). Dabei zeigte der Hybrid *R. grafi* mit 3,61 pg ein Maximum im AT-Gehalt (*R. perezi*: 3,59 pg; *R. ridibunda*: 3,55 pg; Abb. 4-25).

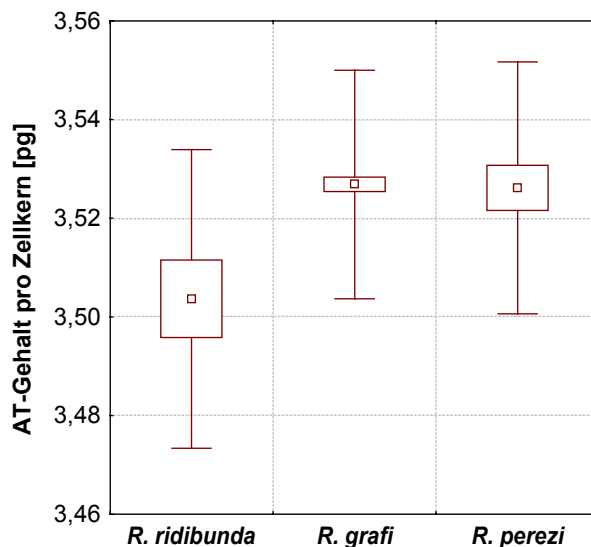


Abb. 4-25: Der AT-Gehalt der untersuchten Taxa. Box: Mittelwert \pm Standardfehler, Whisker: Mittelwert \pm Standardabweichung.

Da Tunner und Heppich-Tunner (1991) Introgression z.T. auf Aneuploidien zurückführen (siehe Kapitel 2), könnte der DNA-Gehalt mit der individuellen Introgression der einzelnen *R. grafi* zusammenhängen. Aus dieser Überlegung heraus wurden der mittlere AT-Gehalt von *R. grafi* ohne Introgression (3,525 pg) gegen den AT-Gehalt von *R. grafi* mit Introgression (3,531 pg) getestet. Der Unterschied ist nicht signifikant.

Da die populationsweite Introgression in Gebiet 2 höher ist als in Gebiet 3, sollte ein t-Test zwischen *R. grafi* aus Gebiet 2 und Gebiet 3 zeigen, ob der Unterschied im AT-Gehalt in Gebiet 2 signifikant ist. Der AT-Gehalt in Gebiet 2 kann zwar als tendenziell höher eingeschätzt werden, der Unterschied zwischen beiden Gebieten ist jedoch nicht signifikant (Gebiet 2: AT = 3,532 pg; Gebiet 3: AT = 3,526 pg; $t = 1,3$; $p = 0,15$). Die Introgressionsbestimmung verdeutlichte auch eine höhere Introgression in PG-Populationen im Vergleich zu PGR-Populationen (s.o.). Daher wurde der AT-Gehalt von *R. grafi* aus PG-Populationen (3,527 pg) mit dem AT-Gehalt von *R. grafi* aus PGR-Populationen (3,526 pg) verglichen. Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

Kapitel 5: DISKUSSION

Bereits in der Einleitung wurden verschiedene Studien genannt, deren Ergebnisse mit der Modellvorstellung der Hybridogenese, wie sie von Schultz (1969) und Tunner (1970) entwickelt worden ist, nicht konform waren. So postulierten bereits Uzzell *et al.* (1977) eine "leaky hybridogenesis", eine nicht perfekte Hybridogenese. Die Ergebnisse der demographischen und genetischen Analyse der vorliegenden Arbeit sind teilweise ebenfalls nicht mit der Theorie der Hybridogenese vereinbar. Erstens entsprachen die Populationszusammensetzungen nicht den aus verschiedenen Modellen berechneten theoretischen Verteilungen, zweitens konnte für *R. ridibunda* eine ungewöhnlich hohe genetische Variabilität gefunden werden und drittens zeigten die Taxa *R. ridibunda*, *R. perezi* und *R. grafi* bei Tests auf HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht nicht die aufgrund der Hybridogenese zu erwartenden Abweichungen bzw. Übereinstimmungen.

5.1 HYBRIDOGENESE UND GESCHLECHTERVERHÄLTNISSE

Die Ergebnisse der Analyse der Populationsstruktur bestätigen stark verschobene Geschlechterverhältnisse in den Taxonteilproben mit einem Überhang an Weibchen in *R. ridibunda* (65,3% Weibchen) und *R. grafi* (88,9% Weibchen) und einem Überhang an Männchen in *R. perezi* (71,2% Männchen; vgl. Tab. 4-2). Solcherart gestörte Geschlechterverhältnisse wurden in der Literatur besonders für den zentraleuropäischen LE-Komplex schon häufig beschrieben (z.B. Berger *et al.* 1988; Berger 1994; Rybacki 1994; Bergen *et al.* 1997). Neben Sammelfehlern (Hotz *et al.* 1994b) durch unterschiedliches Verhalten der Geschlechter (z.B. Paarungsrufe bei Männchen), asynchrones Erscheinen der Geschlechter im Reproduktionsgewässer (Bergen *et al.* 1997) oder Paarungspräferenzen (Abt und Reyer 1993), wird hauptsächlich die Hybridogenese für die Störung des Geschlechterverhältnisses verantwortlich gemacht (Berger 1988b).

Die stark ausgeprägte Störung der Geschlechterverhältnisse ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht auf Sammelfehler zurückzuführen, weil bei *R. ridibunda* und *R. grafi* der Anteil an Weibchen und bei *R. perezi* der Anteil der Männchen in allen Populatio-

nen größer war als der Anteil des komplementären Geschlechts. Eine Umkehrung der Geschlechterverhältnisse oder eine Annäherung an eine bei bisexuellen Arten normalerweise zu erwartende 1:1-Verteilung aufgrund des im Vergleich zu Weibchen früheren Erscheinens von Wasserfrosch-Männchen am Reproduktionsgewässer (Bergen *et al.* 1997) bzw. wegen des auffälligeren Verhaltens (Blanckenhorn *et al.* 1971; Engeler 1994) konnte nicht festgestellt werden. Ein Einfluß des Sammelfehlers auf das beobachtete Geschlechterverhältnis ist jedoch aufgrund des signifikant höheren Anteils an *R. grafi*-Männchen im Frühjahr im Vergleich zu im Sommer beprobten Populationen anzunehmen (Kapitel 4.1.2). Dies könnte durch das am Beginn einer Fortpflanzungsperiode auffälligere Verhalten der Hybrid-Männchen verursacht sein.

Als weitere Ursache für die Verschiebung der Geschlechterverhältnisse wird die Hybridogenese diskutiert (Berger 1988b). Aufgrund seiner hybridogenetischen Gametogenese sollte der Hybrid *R. grafi* in PG-Populationen nur Gameten mit X-Chromosomen produzieren, da das Y-tragende *R. perezi*-Genom vor der Meiose eliminiert wird (Tunner 1970; Berger 1994; Abt und Reyer 1993; Engeler 1994). *R. grafi*-Männchen können aufgrund der durch Kreuzungsexperimente nachgewiesenen rein weiblichen Nachkommenschaft bei Kreuzungen mit *R. perezi*-Männchen und Hybrid-Weibchen (Berger 1994) in PG-Populationen theoretisch nicht auftreten. Damit scheint die Störung des Geschlechterverhältnisses von *R. grafi* direkt durch die hybridogenetische Fortpflanzungsweise hervorgerufen zu werden. Das Auftreten von *R. grafi*-Männchen in manchen PG-Population könnte zwei Ursachen haben; (i) Immigrationereignisse aus nahegelegenen Population mit syntopen *R. perezi*- und *R. ridibunda*-Vorkommen, und (ii) ein geringer Anteil von *R. grafi*-Männchen aus Rückkreuzungen zwischen *R. perezi*-Männchen und *R. grafi*-Weibchen. Da auch *R. grafi*-Männchen in PG-Populationen gefunden wurden, die z.T. mehr als 80 km von der nächsten PGR-Population entfernt sind, sollten Immigrationen in solche Populationen weitestgehend auszuschließen sein. Die postulierte männliche Nachkommenschaft aus Kreuzungen zwischen *R. perezi*-Männchen und *R. grafi*-Weibchen ist daher zu favorisieren, ist aber nicht konform mit den Ergebnissen Bergers (1994). Hybrid-Männchen stellen deshalb grundsätzlich eine Ausnahme dar. Über alle PG-Population, die von *R. ridibunda*-Vorkommen weiter entfernt sind als 80 km (Populationen 1, 2, 4), sind nur 4,8% der *R. grafi* männlich. Bei einem höheren Anteil an *R. grafi*-Männchen und geringer Distanz zu PGR-Populationen ist grundsätzlich davon auszugehen, daß der aus *R. grafi* X *R. perezi*-Kreuzungen entstehende Anteil an *R. grafi*-Männchen durch Immigrationereignisse verstärkt wird. So ist für *R. lessonae* und *R. esculenta* bekannt, daß diese Wasserfroschformen in zehn Tagen 15 Kilometer wandern können (Tunner 1992). Dieser Autor vermutet zudem, daß die Migrationsdistanzen von Wasserfröschen noch größer sind.

Die durch die hybridogenetische Gametogenese gestörte Gametenproduktion des Hybriden (s.o.) kann auch die Geschlechtsverschiebung von *R. ridibunda*, speziell in PGR-

Populationen, erklären. In solchen Populationen verpaaren sich wahrscheinlich auch *R. ridibunda* und *R. grafi*. Da letzteres Taxon nach dem Hybridogenese-Modell nur Rx-Gameten produziert, erhöht die rein weibliche Nachkommenschaft einer solchen Kreuzung den relativen Anteil an *R. ridibunda*-Weibchen. Unterstützt wird diese Hypothese durch den signifikant ansteigenden Anteil von *R. ridibunda*-Weibchen von Norden (Rhône-Nord) nach Süden (Camargue) und zu Gunsten der *R. ridibunda*-Weibchen verschobenen Geschlechterverhältnisse im Gebiet 2 (1:4) und 5 (1:5; Abb. 4-3; Tab. 4-5). In diesen Gebieten sind PGR-Populationen vorherrschend. Eine Erklärungsmöglichkeit für das zu Gunsten von Männchen verschobene Geschlechterverhältnis bei *R. perezi* bietet diese Hypothese allerdings nicht.

Der Vergleich der modellierten (Kapitel 3.7) und beobachteten Verteilungen von PG- und PGR-Populationen ermöglicht weitere Ursachen für das gestörte Geschlechterverhältnis zu finden. So veranschaulichen die starken Abweichungen der beobachteten von den theoretischen Verteilungen bei Annahme von Panmixie (Modell 1), daß es nicht zu zufälligen Paarungen zwischen allen syntopen Wasserfroschtaxa kommt bzw., daß nicht alle der postulierten Genotypen entstehen. Modell 2 berücksichtigt deshalb zusätzlich Ergebnisse von Kreuzungsexperimenten (Berger 1994), die auf Besonderheiten der hybridogenetischen Gametogenese zurückgeführt werden. Das Modell trifft allerdings nur auf den Idealfall einer PG-Population ohne *R. grafi*-Männchen zu. Alle anderen beobachteten Verteilungen zeigten keine Übereinstimmung mit den modellierten Verteilungen (Tab. 4-4). Auch die Erweiterung von Modell 1 um Paarungspräferenzen von Hybrid-Weibchen (Modell 3) führten zu Verteilungen, mit denen die beobachteten Verteilungen nicht übereinstimmten. Die Kombination aller Modelle zu Modell 4 führte zwar zu einer Annäherung der modellierten und beobachteten Verteilungen, eine Übereinstimmung wurde allerdings nicht erreicht. Die Annäherung der Verteilungen legt jedoch den Schluß nahe, daß die in den Modellen berücksichtigten Faktoren zumindest eine untergeordnete Rolle bei der Störung der Geschlechterverhältnisse spielen.

Die Abweichungen der beobachteten von den modellierten Verteilungen beruhen hauptsächlich auf der Unterschätzung von *R. perezi*-Männchen und der Überschätzung der Weibchen von *R. grafi* und *R. ridibunda* in den Modellen. Demnach scheint der Anteil an Py-Gameten am gesamten Gametenpool einer Population größer und der Anteil an Rx-Gameten geringer zu sein als bei den theoretischen Verteilungen geschätzt.

Da anzunehmen ist, daß bei Männchen der echten Arten *R. perezi* und *R. ridibunda* keine Störung der Gametogenese vorliegt, ist davon auszugehen, daß die Gametenhäufigkeit der männlichen und weiblichen Gameten gleich ist. Im Gegensatz dazu sind in somatischen Zellen von *R. grafi*-Männchen das X-Chromosom mit dem *R. ridibunda*-Genom und das Y-Chromosom mit dem *R. perezi*-Genom verbunden. Dadurch besteht theoretisch die Möglichkeit, daß *R. grafi*-Männchen mindestens zwei verschiedene Gametentypen produzieren

können und bei erfolgreicher Fortpflanzung mit *R. perezi* und *R. ridibunda* eine Verschiebung der Geschlechterverhältnisse der Parentalarten verursachen. Frühere Untersuchungen am LE-Komplex bekräftigen das gemeinsame Auftreten von Gameten beider Parentalformen im gleichen Hybridogen (hier *R. esculenta*; Kawamura und Nishioka 1986; Vinogradov *et al.* 1990, 1991). Ferner wurde aufgrund genetischer Daten angenommen, daß die Meiose bei den heterogametischen *R. esculenta*-Männchen gestörter zu sein scheint als bei Weibchen dieses Taxons (Graf und Müller 1979; Kawamura und Nishioka 1986). Die Überschätzung des Anteils an *R. ridibunda* in PGR-Populationen unter Verwendung der Modelle in Kapitel 3.7 könnte auch ein Resultat des ungenauen Letalfaktors (50%; Annahme 4) sein. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß eine Erhöhung des prozentualen Anteils letaler Nachkommen aufgrund des 18:1-Verhältnisses bei Hybrid-Weibchen X *R. ridibunda*-Männchen-Kreuzungen (Berger 1994; Modell 1, Kapitel 3.7) den Anteil der *R. ridibunda*-Weibchen wesentlich stärker beeinflussen würde. Der Anteil von *R. ridibunda* an der Gesamtpopulation verringert sich dann zwar, das Geschlechterverhältnis wird sich aber zu Gunsten von *R. ridibunda*-Männchen verschieben und dann nicht mehr den beobachteten Geschlechterverhältnissen entsprechen. Computersimulationen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden sind aber geplant.

An dieser Stelle sollte noch auf Population 5 eingegangen werden. Diese zeigt zwei Besonderheiten, (i) besteht sie nur aus *R. grafi*, (ii) sind alle *R. grafi* männlichen Geschlechts. Das folgende Szenario ist vorstellbar. Die dortige genetische Linie von *R. grafi* schließt das *R. ridibunda*-Genom aus und zeigt aus diesem Grund einen Männchen-Überschuß, wie er von RE-Populationen bekannt ist (Günther und Plötner 1988). Zur Klärung des Genomausschlusses bedarf es jedoch einer Analyse der Spermatoiden, die bisher nicht möglich war. Das gänzliche Fehlen von Weibchen könnte auch auf einen Sammelfehler infolge der geringen Stichprobengröße (17 Tiere) und das auffällige Fortpflanzungsverhalten der Männchen zurückgeführt werden. Letzteres könnte aufgrund der geringen Zahl an Weibchen in besonderem Maße auffällig sein und zu einer bevorzugten Beprobung von Männchen geführt haben. Beobachtungen beim Fang der Tiere bestätigen deren extremes Fortpflanzungsverhalten. Die Männchen stellten oft erst einige Zeit nach dem Fang ihre Paarungsrufe ein.

Besonders cytogenetische Analysen könnten Aufschluß über die tatsächlichen Vorgänge in der Gametogenese des Hybridogens geben. Es ist jedoch anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und früherer Arbeiten (Kawamura and Nishioka 1986; Vinogradov *et al.* 1990, 1991) davon auszugehen, daß der Hybridogen fähig ist, Gameten mit beiden elterlichen Genomen zu produzieren. Hierdurch nimmt er direkt Einfluß auf das Geschlechterverhältnis der Parentalformen, indem er den relativen Anteil an Py-Gameten erhöht und gleichzeitig den relativen Anteil Rx-Gameten in einer Population erniedrigt.

5.2 HYBRIDOGENESE UND GENETISCHE VARIATION

Die für die Hybridogenese typische fixierte Heterozygotie von *R. grafi* sollte im Vergleich zu den Parentalformen zu einer viel höheren genetischen Variabilität führen. Der Vergleich der einzelnen Taxa zeigt jedoch, daß besonders *R. ridibunda* eine unerwartet hohe genetische Variabilität aufweist und bei der Allelzahl sogar den Hybriden übertrifft (Tab. 4-10). Diese hohe genetische Variabilität von *R. ridibunda* führten Pagano *et al.* (1997) auf die rezente Einführung von *R. ridibunda* aus unterschiedlichen osteuropäischen Gebieten zurück.

Die vorliegende Studie zeigt jedoch eine geographische Variation in der Ausprägung der genetischen Variabilität aller untersuchten Taxa. In Gebieten mit syntopen Vorkommen von *R. grafi* und *R. perezi* ist die genetische Variabilität signifikant höher als in Gebieten mit reinen *R. ridibunda*-Populationen (Abb. 4-7, 4-8 und 4-9). Die genetische Variabilität von *R. ridibunda* könnte demnach im Zusammenhang mit der Anwesenheit der beiden anderen Wasserfroschtaxa stehen. Die Hauptkomponentenanalyse zeigt aber nur im Falle der Polymorphie einen Einfluß der relativen Häufigkeit von *R. grafi* und *R. perezi* (Appendix 2). Unterstützt wird die Hypothese durch die signifikant höhere Polymorphie und Heterozygotie von *R. ridibunda* in PGR-Population im Vergleich zu reinen R-Populationen (Abb. 4-10). Zudem entsprechen die Genotypverteilungen in einigen Populationen nicht dem HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht. Abweichungen an diagnostischen Loci des PG-Komplexes konnten besonders in Gebieten gefunden werden, in denen *R. perezi*, *R. grafi* und *R. ridibunda* syntop vorkamen. In den nördlichen Populationen wurden bei *R. ridibunda* verstärkt Abweichungen an den Loci *gapdh*, *ldh-b* und *pgi* gefunden (Tab. 4-11). Diese Loci sind alle diagnostisch für *R. ridibunda* und *R. lessonae*, weshalb die Abweichung vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht auch auf einen Einfluß des LE-Komplexes, der im Norden des Rhônetales nachgewiesen wurde (Pagano *et al.* 1997), hinweisen könnte.

Ähnliche Annahmen können auch in bezug auf die genetische Variabilität von *R. perezi* aufgestellt werden. So nehmen die Heterozygotie und die Allelzahl signifikant nach Süden hin ab. Dieser Zusammenhang ist um so erstaunlicher, wenn man beachtet, daß *R. perezi* in der Camargue wahrscheinlich seine nördlichste Verbreitungsgrenze erreicht hat und aufgrund von Gründereffekten eher eine geringe genetische Variabilität zu erwarten gewesen wäre, die in Richtung des Refugialraums Iberische Halbinsel (also nach Süden) steigt. Ferner sind sowohl die Heterozygotie, als auch die Polymorphie von *R. perezi* in PGR-Populationen höher als in PG-Populationen (Abb. 4-9), und die Allelzahl polymorpher Loci (Ap) nimmt mit zunehmender Distanz zu PGR-Populationen ab (4-10C). Wie für *R. ridibunda* konnten ebenfalls Abweichungen von der HARDY-WEINBERG-Erwartung gefunden werden. Mit Ausnahme von Population 3 zeigten sich solche Abweichungen insbesondere bei Population in Gebieten in denen auch *R. ridibunda* nachgewiesen werden konnte. In Übereinstimmung mit der unterschiedlichen Heterozygotie und Polymorphie wurden Abwei-

chungen vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht besonders in PGR-Populationen festgestellt (Kapitel 4.2.3). Ein Einfluß von *R. ridibunda* scheint deshalb sehr wahrscheinlich, kann aber durch die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse nicht belegt werden.

Aufgrund der hybridogenetischen Fortpflanzung und der damit verbundenen fixierten Heterozygotie an für den PG-Komplex diagnostischen Genorten, ist bei *R. grafi* ein Heterozygotenüberschuß zu erwarten. Die fehlende Abweichung von einer HARDY-WEINBERG-Verteilung von *R. grafi*-Genotypen in manchen Populationen hingegen deutet auf einen Einfluß der An- bzw. Abwesenheit der Parentalformen, speziell von *R. ridibunda* hin. So ist die Anzahl nicht signifikanter Abweichungen vom HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht in PGR-Populationen größer als in PG-Populationen (Kapitel 4.2.3). Ferner sind, wie bei *R. perezi*, besonders solche Populationen betroffen, die in Gebieten liegen, in welchen auch *R. ridibunda* nachgewiesen wurde. Darüber hinaus zeigen die Korrelationen auch, daß *R. grafi* mit zunehmender relativer Häufigkeit von *R. ridibunda* polymorpher wird (Abb. 4-11A). Die Hauptkomponentenanalyse verdeutlicht zweifelsfrei den Einfluß von *R. ridibunda* auf die Polymorphie von *R. grafi*.

5.3 INTROGRESSION

5.3.1 INTROGRESSION BEI DEN EINZELNEN TAXA

Die Allelfrequenztabellen (Appendix 10 und 11) zeigen, daß in allen Taxa untypische Allele, d.h. Allele eines anderen Wasserfroschtaxons, in unterschiedlichen Häufigkeiten gefunden wurden. Es bleiben dabei solche Allele bzw. Elektromorphe unberücksichtigt, die bekanntermaßen sowohl bei *R. perezi*, als auch bei *R. ridibunda* vorkommen. Zudem wurden grundsätzlich solche Elektromorphen als gemeinsam eingestuft, die in Referenzproben beider Taxa nachgewiesen wurden. Das bedeutet, daß diese Elektromorphen im Genpool weit voneinander entfernter Populationen bereits auftraten und deshalb nicht unmittelbar unter dem Einfluß der Anwesenheit einer der untersuchten Arten inkorporiert werden können.

Die genetische Variabilität von *R. ridibunda* kann aus diesem Grund nicht nur auf rezente, anthropogene Einführungen aus unterschiedlichen europäischen Gebieten zurückgeführt werden, sondern muß zusätzlich aus der Inkorporation von Fremdallelen in den eigenen Genpool hergeleitet werden. Rekombinationsprozesse und damit zu Introgressionsereignisse zwischen den Genpools von *R. perezi* und *R. ridibunda* müssen stattgefunden haben.

Bei der Bestimmung der Introgression für *R. ridibunda*, *R. grafi* und *R. perezi* fallen mehrere Ergebnisse auf: (i) *R. ridibunda* zeigt mit Abstand den höchsten Anteil rekombinierter Genotypen und auch die höchste Introgression der drei Taxa, (ii) der Hybrid *R. grafi* zeigt den geringsten Anteil rekombinierter Genotypen und die geringste Introgression (Abb. 4-

13), (iii) die Höhe der Introgression variiert geographisch und (iv) die Introgression von *R. perezi* und *R. grafi* nimmt nach Süden und bei *R. ridibunda* nach Norden hin ab (Tab. 4-12; Abb. 4-14).

Folgende Fragen werden durch diese Ergebnisse aufgeworfen:

Wie kann es zu einem Genaustausch zwischen *R. perezi* und *R. ridibunda* kommen?

Wieso ist die Introgression in *R. ridibunda* am höchsten und im Hybriden am niedrigsten?

Woraus läßt sich eine geographische Variation der Introgressionshöhe herleiten?

5.3.2 HYBRIDOGENESE UND INTROGRESSION

Reine hemiklonale Linien, die aus perfekter Hybridogenese entstanden sind, sollten zu drei Wasserfroschformen führen, die anhand der diagnostischen Loci klar voneinander zu trennen sind. Genfluß zwischen den Genpools der beiden Elterntaxa sollte durch den prämeiotischen Genomausschluß während der hybridogenetischen Gametogenese nicht auftreten. Introgressionsereignisse lassen sich deshalb mit dem vorgeschlagenen Modell der Hybridogenese (Schultz 1969, Tunner 1970) nicht vereinbaren.

Eine einfache Erklärung für Introgression wäre die Fehlinterpretation der allozymatischen Bandenmuster. Dabei könnten verschiedene Allele die gleiche elektromorphe Eigenschaft zeigen, d.h. sie können anhand der Elektrophorese nicht voneinander getrennt werden und dann als gemeinsame Allele fehlinterpretiert werden. Der Anteil solcher homoplastischen Elektromorphe sollte mit zunehmender genetischer Distanz ebenfalls zunehmen, da die Wahrscheinlichkeit einer durch Elektrophorese nachweisbaren Mutation größer wird. Da es sich bei der Gattung *Rana* (*Pelophylax*) um eine junge Gattung handelt, sind die genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Arten relativ gering (Beerli 1994, Plötner 1998), homoplastische Elektromorphe könnten also auftreten. Homoplastische Elektromorphe sollten jedoch nur an einzelnen Loci auftreten und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit gefunden, simultan an allen Loci. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen, daß Fehlinterpretation aufgrund von homoplastischen Elektromorphen aufgetreten sind.

Andere Autoren (z.B. Hoare und Beaumont 1995) sehen bei Auftreten von Nullallelen die Möglichkeit einer Fehlinterpretation von Allozymbanden. Speziell bei der Interpretation von Allozymbanden monomerer Enzyme können genetisch heterozygote Tiere durch die phänotypisch homozygote Ausprägung falsch bestimmt werden. Der Nachweis von Nullallelen ist nur dann möglich, wenn bei homozygoten Tieren Ausfälle zu finden sind. Solche „blanken“ Enzymmuster wurden bisher weder in *R. lessonae* noch *R. ridibunda* gefunden, obwohl intensive Studien am LE-Komplex in Frankreich (Pagano, pers. Mitt. 1999) und in Deutschland (z.B. Schröder 1997) durchgeführt worden sind. Auch die vorliegende Studie

konnte für das Auftreten von Nullallelen im Genpool von *R. perezi* keinen Hinweis finden. Eine Fehlinterpretation aufgrund von Nullallelen scheint deshalb unwahrscheinlich.

Vinogradov *et al.* (1990) stellten eine weitere Hypothese für interspezifischen Genfluß in hybridogenetischen Wasserfroschkomplexen vor. Diese Autoren postulierten einen für die Hybridogenese verantwortlichen Faktor (hybridogenesis inducing factor) bzw. Faktorenkomplex, der bei einem Ungleichgewicht Rekombinationsereignisse ermöglicht. Ein solches Ungleichgewicht könnte in Frankreich durch eine Vermischung verschiedener genetischer *R. ridibunda*-Linien zustande gekommen sein, die sich in ihrer Fähigkeit zur Induktion von Hybridogenese unterscheiden. Solche Linien sind z.B. vom Balkan bekannt und könnten durch Einführung von *R. ridibunda* in das Rhôneetal und andere Regionen Frankreichs auftreten. In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß *R. lessonae*-*R. ridibunda*-Kreuzungen aus dem Südwesten von Kroatien zu nicht-hybridogenetischen, sterilen *R. esculenta* führten (Uzzell und Tunner 1983; Hotz *et al.* 1985). Es wäre somit zu erwarten, daß die Introgression in französischen Wasserfroschkomplexen (PG- und LE-Komplex) größer ist als in Gebieten, in denen nur natürliche *R. ridibunda*-Linien auftreten. Ein diesbezüglicher Vergleich bereits vorhandener Datensets aus unterschiedlichen Gebieten ist jedoch wegen der Verwendung unterschiedlicher Elektrophoresemethoden z.Z. nicht möglich.

Eine weitere Erklärung für Introgression in hybridogenetischen Komplexen könnte der Zeitpunkt der Genomeliminierung liefern. Crossing-over-Ereignisse zwischen den homologen Chromosomen der beiden Parentalgenome können dann auftreten, wenn die Genomeliminierung nicht vor dem Pachytän der Meiose stattfindet. Wenn zumindest ein Teil der Genomeliminierung auf Nucleus like bodies (NLBs), kleine zellkernähnliche Zellorganellen, zurückgeführt werden kann, dann würde der Eliminierungsprozeß wegen des geringen Volumens und der geringen Häufigkeit der NLBs (Ogielska pers. Mitt. 1998) längere Zeit in Anspruch nehmen und damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Crossing-over-Ereignissen erhöhen.

Schröer (1997) postulierte gelegentliche Mendel'sche (zufällige) Segregation neben hemiklonaler Gametogenese in Wasserfroschpopulationen und vertrat die Auffassung, daß das Auftreten frei rekombinierter Gameten populationsspezifisch sei und von einer ganzen Reihe abiotischer und biotischer Faktoren abhängt. In seinem Modell ist *R. esculenta* bzw. der Hybridogen fähig, sowohl *R. ridibunda*-Gameten, als auch nicht-*R. ridibunda*-Gameten und frei rekombinierte Gameten zu produzieren und sich somit mit allen Wasserfroschformen erfolgreich fortzupflanzen. Dies könnte auch die verschiedenen Populationssysteme des LE-Komplexes erklären, welche dann lediglich auf unterschiedlichen Produktionsfrequenzen der verschiedenen Gametentypen durch den Hybriden basieren würden. Dabei treten neben LE-Populationen auch RE-Populationen auf, in deren Hybriden nicht hauptsächlich das *R. lessonae*-, sondern das *R. ridibunda*-Genom eliminiert wird. Schon in frü-

heren Studien (Günther 1975a; Günther und Plötner 1988; Vinogradov *et al.* 1990, 1991; Polls Pelaz 1994) wurde die Möglichkeit diskutiert, daß der Hybrid Gameten beider Elternarten produziert. Die Auskreuzung der Parentalarten aus Hybrid x Hybrid- bzw. Hybrid X Parentalform-Kreuzungen böte dann eine Möglichkeit des Genflusses zwischen dem nicht-*R. ridibunda*-Elter und *R. ridibunda* (Berger *et al.* 1994). Dabei ist das Auftreten von *R. lessonae*-Gameten eher als Ausnahme anzunehmen, d.h. der Anteil der *R. lessonae*-Gameten an der gesamten Gametenproduktion der Hybriden ist gering. So produzierte von acht ostdeutschen Tieren nur ein *R. esculenta*-Männchen Gametentypen beider Elternarten (Vinogradov *et al.* 1991). Eine genauere Bestimmung des Anteils der einzelnen Gametentypen im gesamten Genpool einer Population steht z.Z. noch aus.

In der Diskussion über Introgressionsmöglichkeiten wurden von Tunner und Heppich-Tunner (1991) auch Aneuploidien in Hybridgameten angenommen und nachgewiesen. Introgressionsnachweise mit Proteinelektrophorese im Hybriden basieren dann auf Enzymen, die auf einem überzähligen Chromosom kodiert sind. Es ist jedoch zu erwarten, daß solche Chromosomen durch das Ungleichgewicht in den Chromosomensätzen Fehler bei der Chromosomenpaarung verursachen und während der nächsten Meiose oder postzygotisch verloren gehen. In der nächsten Generation dürften solche überzähligen Chromosomen deshalb keinen Einfluß auf den Genpool haben. Unterstützt wird diese Hypothese auch durch Flußzytometriedaten dieser Arbeit (s.u.).

5.3.3 ERWEITERUNGEN DES URSPRÜNGLICHEN MODELLS DER HYBRIDOGENESE

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und auch die Ergebnisse früherer Arbeiten (z.B. Uzzell *et al.* 1977; Schröer 1997; Pagano und Schmeller, im Druck) zu erklären, muß die ursprüngliche Modellvorstellung der Hybridogenese durch folgende Annahmen erweitert werden; (i) Rekombinationsprozesse zwischen den beiden Elterngenomen finden statt, (ii) es werden von *R. grafi* Gameten mit beiden rekombinierten Genomen produziert, (iii) diese Gameten werden erfolgreich fortgepflanzt, (iv) der Anteil an produzierten P-Gameten variiert geographisch in Abhängigkeit von biotischen und abiotischen Faktoren (Abb. 5-1).

Theoretisch können zwei verschiedene Wege zu rekombinierten Gameten führen.

Zum einen könnten Hybrid-Gameten wahrscheinlich keine typischen frei rekombinierten Gameten darstellen, da davon ausgegangen werden muß, daß die hybridogenetische Gametogenese „versucht“ abzulaufen. Das heißt, daß auch in rekombinierten Gameten keine zufällige Verteilung der mütterlichen und väterlichen Chromosomen erfolgt, wie sie für eine Mendel'sche Segregation gefordert werden müßte. Eine völlig zufällige Aufteilung der Chromosomen im Hybriden hätte zudem eine wesentlich höhere Introgression zur Folge, als in der vorliegenden und auch anderen Arbeiten nachgewiesen werden konnte.

Zum anderen könnte die Hybridogenese in nur einzelnen Männchen gestört sein. Dies würde dann auch die rein hybridogenetischen Oocyten erklären, die in dieser Arbeit gefunden wurden (Kapitel 4.2.1).

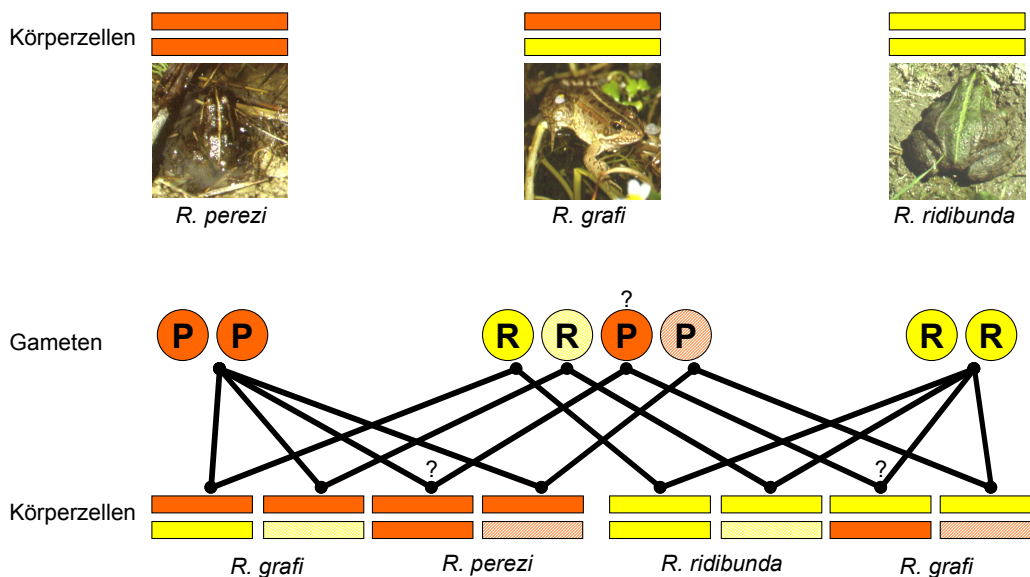


Abb. 5-1: Kreuzungsschema für Paarungen zwischen *R. grafi* und seinen beiden Elternarten bei Annahme der Produktion von Gameten mit nicht rekombinierten Genom von *R. ridibunda* (R: gelb) und *R. perezi* (P: orange) und rekombinierten Genomen (schraffiert). Vgl. Text.

Das hier vorgeschlagene Hybridogenese-Modell ermöglicht Genfluß zwischen *R. perezi* und *R. ridibunda*, wenn zumindest ein Teil der im Hybrid produzierten Gameten rekombinierte Genome beider Elternarten enthalten. Der Hybrid produziert dann vier Gametentypen: (i) unrekombinierte *R. ridibunda*- und (ii) unrekombinierte *R. perezi*-Gameten und (iii) rekombinierte *R. ridibunda*- und (iv) rekombinierte *R. perezi*-Gameten, die bei erfolgreicher Rückkreuzung mit den beiden Parentaltaxa zu sieben unterschiedlichen Geno- und drei verschiedenen Phänotypen führen (Abb. 5-1). Alternativ kann auch postuliert werden, daß der Hybrid nur drei Gametentypen produziert. Dabei würden von *R. grafi* keine reinen *R. perezi*-Gameten, die für eine nachweisbare Rekombination in *R. perezi* nicht notwendig sind, produziert. Daraus resultiert, daß bei Kreuzungen zwischen dem Hybrid und den Parentalformen nur sechs Genotypen entstehen würden (Abb. 5-1). Reine *R. perezi* sind dann bei *R. grafi* X *R. perezi*-Kreuzungen und reine *R. grafi* bei *R. grafi* X *R. ridibunda*-Kreuzungen nicht möglich. Das letztere Modell steht allerdings im Widerspruch mit der bei der Diskussion der Geschlechterverhältnisse postulierten Erhöhung des Py-Gameten-Anteils durch den Hybriden. Würden nur rekombinierte P-Gameten produziert, müßte durch die Höhe der geforderten Py-Gameten-Produktion eine höhere als die beobachtete Introgression in *R. perezi* erwartet werden.

5.3.4 WARUM IST INTROGRESSION IN DEN EINZELNEN TAXA UNTERSCHIEDLICH STARK AUSGEPRÄGT?

Es ist auffällig, daß rekombinierte *R. grafi* in Populationen, die weit von bekannten *R. ridibunda*-Vorkommen entfernt liegen (z.B. Population 1, 2, 4 und 9; Abb. 3-1), einen Überschuß an *R. ridibunda*-, aber nicht an *R. perezi*-Genotypen zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen rekombinierte *R. grafi* in Gebieten mit Vorkommen beider Elternarten rekombinierte Genotypen sowohl von *R. ridibunda*, als auch von *R. perezi*. Daraus läßt sich ableiten, daß rekombinierte *R. grafi* mit einer Überzahl an *R. perezi*-Genotypen in Gebieten ohne *R. ridibunda* einen verringerten oder u.U. gar keinen Reproduktionserfolg haben. Folgende Erklärungsmöglichkeiten sind dabei denkbar:

- (i) der Erkennungsmechanismus, wahrscheinlich basierend auf Interaktionen zwischen Zentromerregionen der Chromosomen und Proteinen (Bucci *et al.* 1990; Raghianti *et al.* 1995), versagt durch das vermehrte Auftreten von *R. perezi*-Genen in rekombinierten R-Gameten, da dies zu Erkennungsschwierigkeiten des *R. ridibunda*-Genoms führt. Bei geringer Rekombination des *R. perezi*-Genoms ist hingegen eine Trennung der beiden elterlichen Genome noch möglich. Experimentelle Belege zwischen der „Güte“ der Erkennung und dem Introgressionsgrad liegen z.Z. nicht vor.
- (ii) *R. grafi* produziert in PG-Populationen fast nur oder ausschließlich R-Gameten. Die rekombinierten *R. grafi* sind dann direkt auf Kreuzungen zwischen rekombinierten *R. perezi*, und „normalen“ *R. grafi* zurückzuführen. Die *R. perezi* stammen dabei von genetischen Linien ab, die direkten Kontakt mit *R. ridibunda*-Linien hatten. Durch den hohen Anteil an im Hybrid produzierten R-Gameten können neue Rekombinationen nicht oder nur ganz selten in den *R. perezi*-Genpool gelangen.

Beide Punkte stehen nicht im Widerspruch mit der Diskussion der Geschlechterverhältnisse, weil die zu Gunsten von *R. grafi*-Weibchen verschobenen Geschlechterverhältnisse in südlichen Populationen einen höheren relativen Anteil von Rx-Gameten erfordern. Ein sich daraus ableitender Punkt wäre ein veränderbarer Anteil P-Gameten in der hybridogenetischen Gametogenese. Eine zu hohe Frequenz, insbesondere in PG-Populationen, würde schnell dazu führen, daß *R. perezi* den Hybriden verdrängt. In PG-Populationen müßte der Hybrid zur Erhaltung seiner Linie vermehrt oder sogar ausschließlich R-Gameten produzieren. Dies würde dann zu der beobachteten geringeren Introgression in PG-Populationen im Vergleich zu PGR-Populationen sowohl in *R. perezi*, als auch in *R. grafi* führen, weil rekombinierte *R. perezi*-Genome bei der Gametogenese ausgeschlossen werden. In flußzytometrischen Arbeiten (Borkin *et al.* 1987; Vinogradov *et al.* 1988, 1990) konnte in Übereinstimmung mit dieser Hypothese für LE-Populationen keine Amphispermie, d.h. das Auftreten von Gameten mit beiden Elterngenomen, bei *R. esculenta* festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten unterstützen somit die Hypothese über die unterschiedliche

Gametenproduktion in Abhängigkeit von der Syntopie der Elternarten, wie sie auch von Schröder (1997) postuliert wurde.

Die geringe Introgression in *R. grafi* könnte ein Indiz für eine frequenzabhängige Inkompatibilität der beiden Genome sein, d.h. die hybridogenetische Linie bleibt nur bis zu einem gewissen Grad der Introgression erhalten. In diesem Fall hätten solche *R. grafi* einen größeren Fortpflanzungserfolg, deren Parentalgenome nicht oder nur wenig rekombiniert sind. So wurde von Günther (1973, 1975a) das Absterben vieler *R. esculenta*-Zygoten als Selektion gedeutet, die während der Gametogenese, Befruchtung oder Embryogenese ein Überleben „unbalancierter“ *R. esculenta* verhindert. Hier könnte z.B. der Eliminierungsmechanismus der Hybridogenese gestört sein und zu Aneuploidien in den Gameten führen, die dann entweder gleich verlorengehen oder in frühen Entwicklungsstadien zum Absterben des Keimes führen. Gestützt wird diese Hypothese auch durch eine Vielzahl von Entwicklungsstörungen, die bei dem Hybrid des LE-Komplexes nachgewiesen und als *R. esculenta developmental syndrome* zusammengefaßt wurden (Ogielska 1994a, vgl. auch Kapitel 2). Ferner konnten Günther *et al.* (1979) in Populationen Ostdeutschlands, mit bis zu 25% rekombinierten Tieren, nicht-hybridogenetische *R. esculenta* finden (vgl. auch Günther und Hähnel 1976).

Bei beiden Elternarten, *R. perezi* und *R. ridibunda*, kann sich eine Rekombination im Genpool weiter ausbreiten, sollte es zu einer erfolgreichen Fortpflanzung mit dem Hybriden gekommen sein, also ein rekombinierter Gamet vom Hybrid stammend mit einem elterlichen Gameten verschmolzen sein, weil es sich bei *R. perezi* und *R. ridibunda* um echte Arten handelt. Während der Gametogenese dieser Taxa werden demnach die väterlichen und mütterlichen Chromosomen nach Mendel'scher Segregation zufällig auf die Gameten verteilt. Die rekombinierten Chromosomen können dadurch an die nächste Generation weitergegeben werden und bei ausbleibendem Verlust der Merkmale, der durch z.B. genetische Drift oder Selektion verursacht werden kann, im Genpool akkumulieren.

Die unterschiedlich hohe Introgression von *R. perezi* in den beiden Populationssystemen PG und PGR kann durch unterschiedliche Anteile an P- und R-Gameten im gesamten Gametenpool einer Population erklärt werden. In PG-Populationen sind solche Hybride bevorzugt, die nur sehr wenig oder keine rekombinierten P-Gameten produzieren, weil das für die Erhaltung der Hybridlinie notwendige *R. perezi*-Genom in hoher Frequenz vorhanden ist. In PGR-Populationen, in welchen neben *R. perezi* auch die zweite Elternart *R. ridibunda* syntop vorkommt, sind *R. grafi*, die einen der beiden möglichen Gametentypen produzieren, nicht benachteiligt. Sowohl P-Gameten, bei Kreuzung mit *R. ridibunda*, als auch R-Gameten, bei Kreuzung mit *R. perezi*, können zu einem Fortpflanzungserfolg führen. Dies könnte vor allem für die reproduktiv benachteiligten *R. grafi*-Männchen zutreffen, die in PGR-Populationen sich nicht oder nur selten mit *R. grafi*- (Präferenz der Weibchen) und *R. perezi*-Weibchen (Präferenz der *R. grafi*-Männchen aufgrund der KRL) verpaaren. Diese

Männchen würden sich dann vermehrt mit *R. ridibunda*-Weibchen verpaaren (Engeler 1994) und hätten bei Produktion von P-Gameten einen erhöhten Fortpflanzungserfolg, da der Verlust von Nachkommen durch Inkompatibilität der Genome verringert wird. Daß Kreuzungen zwischen *R. ridibunda* und *R. grafi* zu vitaler Nachkommenschaft führen müssen (vgl. auch Blankenhorn *et al.* 1971, Günther 1973), beweist der signifikante Anstieg des Weibchenanteils von *R. ridibunda* von Norden nach Süden (Abb. 4-3), der auf den erhöhten Anteil von Rx-Gameten durch die Präsenz von *R. grafi* im Süden zurückzuführen ist.

Die erhöhte Introgression in *R. grafi* in PGR-Populationen (Abb. 4-15B) ist direkt auf die Introgression der Elternarten zurückzuführen, denn je mehr rekombinierte Parentalgenome in einer PGR-Population vorkommen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Primärhybridisierung zwischen rekombinierten Elternarten und der Entstehung rekombinanter *R. grafi*. Dabei kommt es zu einer Art Feedback-Effekt besonders zwischen *R. ridibunda* und *R. grafi*. Der höhere Anteil an R-Gameten von *R. grafi* und die damit größere Wahrscheinlichkeit einer nachweisbaren Introgression im *R. ridibunda*-Genpool erhöht durch die Primärhybridisierung ebenfalls wieder den Anteil rekombinierter *R. grafi*. Dies gilt auch zwischen *R. perezi* und *R. grafi*. Dabei ist die Introgression im Hybriden direkt auf die hohe Introgression in *R. ridibunda* zurückzuführen. Dieser Einfluß wird ebenfalls deutlich anhand der Korrelation des Introgressionsgrads mit der Entfernung zu PGR-Populationen (Abb. 4-14), da zu erwarten ist, daß die Konnektivität zweier Populationen mit zunehmender geographischer Distanz abnimmt und die Migrationsfähigkeit von Wasserfröschen auf wenige Kilometer beschränkt ist (Tunner 1992). Dies führt durch den geringen Reproduktionserfolg von rekombinierten *R. grafi* zu einer allmählichen Verringerung der Anzahl rekombinierter Tiere mit zunehmender Distanz zu *R. ridibunda*-Vorkommen. Ferner bleibt aufgrund der Infertilität stark rekombinierter *R. grafi* die Introgression hinter den Elternarten zurück, d.h. die Mehrheit der rekombinierten *R. grafi* ist direkt auf Primärhybridisierungen zwischen rekombinierten Tieren der beiden Elternarten zurückzuführen.

R. perezi zeigt unmittelbar keinen Hauptfaktor in bezug auf die Introgression. Da aber zwischen dem Anteil von *R. ridibunda*, der Distanz zu PGR-Populationen und der geographischen Lage der Population offensichtliche Beziehungen bestehen, ist auch hier anzunehmen, daß die Anwesenheit von *R. ridibunda* den Hauptfaktor darstellt (Appendix 5). Diese Abhängigkeit könnte aber auch indirekter Natur sein, wenn man postuliert, daß die Syntopie von *R. ridibunda* den Fortpflanzungserfolg solcher *R. grafi* erhöht, die neben R-Gameten auch P-Gameten produzieren.

Die im Vergleich zum komplementären Geschlecht leicht erhöhte Introgression in *R. ridibunda*-Weibchen und *R. perezi*-Männchen unterstützt die Hypothese, daß vor allem in *R. grafi*-Männchen Gameten mit den Genomen beider Elternarten produziert werden. Dabei läßt sich Introgression bei Rückkreuzung des Hybriden mit den Elternarten zuerst in *R. ri-*

dibunda-Weibchen und *R. perezii*-Männchen nachweisen. Erst in nachfolgenden Generationen können rekombinierte Gene durch die zufällige Aufteilung der väterlichen und mütterlichen Chromosomen bei Paarungen zwischen Tieren gleicher Art im komplementären Geschlecht auftreten. Die zufällige Aufteilung väterlicher und mütterlicher Chromosomen mag auch der Grund für die fehlende Signifikanz der Unterschiede zwischen den Geschlechtern eines Taxons sein (vgl. Kapitel 4.2.4).

Durch die Interaktionen zwischen den einzelnen Taxa eines hybridogenetischen Komplexes erklärt sich auch die große geographische Variation der Ausprägung der Introgression (Tab. 4-12). Die Introgression wird hauptsächlich dann limitiert, wenn die hybridogenetische Gametogenese des Hybriden zu stark durch Rekombinationsprozesse gestört wird und im schlimmsten Fall zu einer Extinktion der Hybridlinie führt. Eine solche Extinktion könnte sich in Population 3 ereignet haben, in der *R. perezii* ein stark zu Gunsten von Männchen verschobenes Geschlechtsverhältnis zeigt, wie es sonst in PG und PGR-Population gefunden wurde. Nur bei Syntopie von *R. perezii* und *R. ridibunda* kann demnach eine hoch rekombinierte Hybridlinie durch Primärhybridisierungen erhalten bleiben.

5.3.5 DER EINFLUSS DER INTROGRESSION AUF DIE GENETISCHE VARIABILITÄT

Die Regressions- und Hauptkomponentenanalysen (Kapitel 4.2.5) zeigen eine durch die Introgression bedingte Erhöhung der genetischen Variabilität aller untersuchten Taxa. Die Abgrenzung der einzelnen Taxa wird mit zunehmender Introgression schwerer, da sich die Genpools der beiden Parentalformen durch die Inkorporation von Fremdallelen annähern. Ob es zu einer völligen Durchmischung der beiden Genpools bei langer Syntopie der drei Wasserfroschtaxa eines hybridogenetischen Komplexes kommt, ist aufgrund der postulierten frequenzabhängigen Inkompatibilität des Hybriden eher unwahrscheinlich. In solchen Gebieten wird jedoch eine Zuordnung einzelner Tiere durch die verringerte diagnostische Aussagekraft der einzelnen Loci erschwert (vgl. Abb. 4-20; Tab. 4-13), weshalb eine möglichst hohe Zahl potentiell diagnostischer Loci analysiert werden sollte, um die Wahrscheinlichkeit einer falschen Zuordnung gering zu halten.

5.4 ALTERSANALYSE

Die Ergebnisse der exakten Altersanalyse erstaunten zuerst, weil viele der Tiere eine unerwartet niedrige Anzahl an Hibernationslinien zeigten. Eine genauere Untersuchung der Knochenquerschnitte und ein Vergleich mit vorhandenen Schnitten von *Hyla arborea* und *Mertiensiella luschani* zeigte jedoch die Großporigkeit der Wasserfroschknochen, besonders beim Hybriden *R. grafi* und dem noch größer werdenden *R. ridibunda* (Abb. 4-6).

Auffällig ist auch der große Anteil an Tieren, die bereits im ersten Lebensjahr geschlechtsreif geworden sind (Tab. 4-6). Dies mag auf die weit ausgedehnte Fortpflanzungsphase, die nach eigenen Beobachtungen von Ende Februar bis Anfang November dauert, zurückzuführen sein. Dabei bilden sich verschiedene Subkohorten an Jungtieren (Díaz-Paniagua

1990; Esteban *et al.* 1996), wobei vermehrt solche Tiere, die am Anfang der Brutsaison metamorphisierten, im selben Jahr auch die Geschlechtsreife erreichen können.

In Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit (Esteban *et al.* 1996) konnte festgestellt werden, daß besonders die ersten beiden Altersklassen bei *R. perezii* stark vertreten waren und adulte Männchen sich in etwa gleichen Anteilen im ersten und zweiten Lebensjahr befanden und auf den oben erwähnten Subkohorten basieren. Literaturdaten aus skelettochronologischen Studien an anderen Wasserfröschen der Gattung *Rana* (*Pelophylax*) konnten nicht gefunden werden, ein Vergleich ist deshalb nicht möglich. Die Ergebnisse zeigen, daß bei *R. grafi* im Gegensatz zu *R. perezii* die Weibchen früher geschlechtsreif werden als die Männchen, da fast alle adulten *R. grafi*-Männchen (83%) sich in ihrem zweiten Lebensjahr befanden, aber nur 5,6% früher geschlechtsreif wurden. Bei *R. grafi*-Weibchen hingegen wurden etwa gleiche Anteile geschlechtsreifer Tiere in den beiden ersten Lebensjahren gefunden. Dabei fällt auf, daß die ältesten Tiere ausschließlich männlich waren, obwohl der Anteil adulter Weibchen im dritten Lebensjahr etwas höher lag, als der der Männchen. Da die älteren Männchen in nur einer einzigen Population (Population 5) gefunden wurden, ist eine geographische oder ökologisch bedingte Varianz des Höchstalters der Geschlechter nicht auszuschließen, zumal in allen übrigen Populationen die Männchen im Mittel ein geringeres Alter als die syntopen Weibchen erreichten (Tab. 4-6). Die *R. ridibunda*-Teilprobe ist in bezug auf die einzelnen Altersklassen sehr homogen, d.h. fast alle Tiere waren etwa zwei Jahre alt. Auch hier konnten Tiere nachgewiesen werden, die wie bei den beiden anderen Taxa, schon in ihrem ersten Lebensjahr geschlechtsreif geworden waren. Die homogene Altersstruktur mag auf die geringe Anzahl untersuchter Populationen zurückzuführen sein (Tab. 4-6).

Im Vergleich mit Arbeiten an den Braunfröschen *R. sakuraii* (Kusano *et al.* 1995) und *R. italica* (Guarino *et al.* 1995) erzielten die hier untersuchten Ranidentaxa ein wesentlich geringeres Alter. Dies mag das Resultat zweier Faktoren sein, (i) die biologische Lebenserwartung in der Gattung *Rana* (*Pelophylax*) ist geringer als bei anderen Raniden, (ii) die Turnover-Rate ist aufgrund von ökologischen Faktoren (Räuberdruck, suboptimale Habitate, Habitatänderungen u.a.) in den untersuchten Populationen sehr hoch und verringert die mittlere Lebenserwartung aller Taxa. Einen deutlichen Hinweis zeigen die gebietsweisen gemittelten Alter der einzelnen Taxa nicht, dies kann aber durch die für diese Fragestellung eventuell zu geringe Stichprobengröße verursacht worden sein.

Beim direkten Vergleich der beiden Taxa *R. perezii* und *R. grafi* zeigte sich, daß in vier der fünf Populationen *R. grafi* einen leichten Altersvorteil gegenüber *R. perezii* zu haben scheint. Dies kann auf Heterosiseffekte beim Hybriden hinweisen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die beprobten Habitate für beide Taxa nicht im selben Maße optimal waren. So erreichte *R. perezii* in Population 1, welche näher am Verbreitungszentrum

von *R. perezi* lag und u.U. für dieses Taxon bessere Lebensbedingungen bot, ein höheres Alter als syntope *R. grafi* (Tab. 4-7).

Die Kopf-Rumpf-Länge (KRL) ist bei allen untersuchten Taxa mit dem Alter signifikant korreliert (Abb. 4-5). Jedoch fallen die unterschiedlichen Steigungen der Trendlinien bei den einzelnen Taxa auf. *R. perezi* zeigt, ähnlich der Studie von Esteban *et al.* (1996), eine nur schwach ausgeprägte Beziehung. Damit stimmt überein, daß auch die massivere Knochenstruktur der *R. perezi*-Knochen im Vergleich mit den großporigen Knochen von *R. grafi* und *R. ridibunda* (Abb. 4-7). Auch Hotz *et al.* (1994b) stellten eine höhere Wachstumsrate bei *R. grafi* im Vergleich mit *R. perezi* fest.

Die oben aufgestellte Hypothese, daß das geringere Alter von *R. perezi* auf suboptimale Habitate in der Camargue und das höhere Alter im Süden (Pyrenäen) auf besseren Habitatbedingungen zurückzuführen ist, wird durch den Befund unterstützt, daß die Wachstumsrate von *R. perezi* im Süden größer ist als in der Camargue (vgl. auch Lizana *et al.* 1987). Dies wird auch belegt durch die signifikant geringere KRL der ein- und zweijährigen Männchen in Camargue-Populationen und die größere KRL in Population 1 (Kapitel 4.1.4, S. 37). Die relativ stabile Wachstumsrate von *R. grafi* in allen untersuchten Gebieten könnte jedoch auch auf eine größere Adaptationsfähigkeit von *R. grafi* aufgrund seiner genetischen Ausstattung hinweisen. Die Daten der Altersanalyse belegen nicht zweifelsfrei ein auf Heterosis-Effekten basierendes höheres Alter von *R. grafi* im Vergleich zu syntop vorkommenden Elternart *R. perezi*. Die Altersanalyse legt jedoch den Schluß nahe, daß der Hybrid aufgrund seiner hohen genetischen Variabilität eine höhere Entwicklungsstabilität in verschiedenen Umwelten zeigt (z.B. Hotz *et al.* 1999).

5.5 PLOIDIEGRAD UND DNA-GEHALT

In der vorliegenden Studie konnten triploiden Tiere festgestellt werden (Kapitel 4.2.7). Die Kritik von Schröer (1996), daß die Planimetrie eine für die Ploidiebestimmung aufgrund von geographischen Variationen und anderen Einflußfaktoren ungeeignete Methode sei, kann auf Basis der vorliegenden Arbeit unterstützt werden, da auch in der vorliegenden Studie eine geographische Varianz der Erythrocytenfläche nachgewiesen wurde. So nimmt die Fläche bei *R. perezi* und *R. grafi* nach Süden signifikant zu (Abb. 4-25). Ferner konnte vornehmlich der Sauerstoffgehalt des bewohnten Gewässers als eine Einflußgröße herausgestellt werden (Abb. 4-26). Darüber hinaus wurde bereits früher festgestellt, daß die Erythrocytenfläche mit zunehmender Kopf-Rumpf-Länge bei Amphibien zunimmt (Uzzell *et al.* 1975). Im Gegensatz dazu gilt es aber festzustellen, daß die Ergebnisse der Planimetrie mit der wesentlich exakteren Methode der Flußzytometrie konkordant sind, d.h. auch bei der exakten DNA-Bestimmung keine triploiden Hybriden gefunden wurden.

Die Analyse der Flußzytometriedaten zeigte einen unerwartet hohen DNA-Gehalt in *R. grafi*. Der beobachtete Unterschied im AT-Gehalt zwischen rekombinierten und nicht rekombi-

nierten *R. grafi*-Individuen (Kapitel 4.2.8) veranschaulicht, daß der hohe DNA-Gehalt wahrscheinlich auf Chromosomenfragmente zurückzuführen ist, die durch fehlerhafte Eliminierung des *R. perezi*-Genoms im Gameten verblieben bzw. durch die NLBs noch nicht aus dem Zellkern entfernt worden sind (Tunner und Heppich-Tunner 1991). Gestützt wird diese Hypothese auch durch die geographische Variabilität des DNA-Gehaltes, der besonders im Gebiet 2 bei *R. grafi*, in welchem alle Taxa eine sehr hohe Introgression zeigen, höher ist als in Gebiet 3. Da Aneuploidien grundsätzlich auf Fehler während der Meiose zurückzuführen sind (z.B. Tunner und Heppich-Tunner 1991) würde durch diesen Befund die oben diskutierte Hypothese der frequenzabhängigen Inkompatibilität des Hybriden unterstützt werden.

5.6 VERBREITUNG DER TAXA

Aufgrund von Literaturdaten (Berger 1988a, Arano *et al.* 1993; Hotz *et al.* 1994b, Pagano *et al.* 1997) wurde am Anfang dieser Untersuchung davon ausgegangen, daß hauptsächlich die Taxa der beiden hybridogenetischen LE- und PG-Komplexe gefunden werden würden. Im Kontrast dazu wurden erstaunlich viele *R. ridibunda* in Rhône-nahen Gewässern nachgewiesen. Da es sich bei *R. ridibunda* in der Camargue u.U. um rezente anthropogene Einführungen handeln könnte (Grossenbacher 1988; Hotz *et al.* 1994b), wurden entlang der Rhône weitere Wasserfroschpopulationen beprobt. In keiner dieser Populationen konnten *R. esculenta* und *R. lessonae* nachgewiesen werden. Sie bestanden ausschließlich aus *R. ridibunda* und einem geringen Anteil nicht definierbarer hoch rekombinanter Tiere. Da in früheren Studien nördlich des hier untersuchten Gebietes der LE-Komplex zweifelsfrei nachgewiesen worden ist (Pagano *et al.* 1997) scheint sich *R. ridibunda* besonders im südlichen Rhône-tal ausgebreitet zu haben und ähnlich wie in der Schweiz (Grossenbacher, pers. Mitt. 1998) den LE-Komplex aus solchen Habitaten zu verdrängen, die *R. ridibunda* optimale Lebensbedingungen bieten. Die genetische Analyse zeigte, daß neben der Inkorporation von Fremdallegen auch viele verschiedene *R. ridibunda*-typische Allele im Genpool dieser Art auftraten. Eine Einführung dieser Art aus unterschiedlichen europäischen Ländern in das Rhône-tal und andere Gebiete Frankreichs ist deshalb anzunehmen.

Die in der Camargue gefundenen *R. esculenta* und *R. lessonae* sind wahrscheinlich die Reste früherer LE-Populationen, die noch nicht vollständig aus den für *R. ridibunda* Optimalhabitaten verdrängt wurden. Arbeiten von Reyer *et al.* (pers. Mitt., 1997) belegen eindeutig eine Verdrängung des Hybriden bei optimalen Lebensbedingungen durch eine der beiden Elternarten, in Frankreich wahrscheinlich besonders durch eingeführte *R. ridibunda*-Linien, und stützen somit die Hypothese. Daß LE-Populationen entlang der Rhône schon über einen langen Zeitraum bestanden haben müssen, zeigt die morphologische Anpassung von *R. esculenta* an typischerweise von *R. ridibunda* besiedelten Habitaten (Pagano und Joly 1998).

Weniger spekulativ als die vorherige Diskussion ist die Bestätigung einer nach Süden gerichteten Ausbreitung des PG-Komplexes, wie sie schon früher postuliert worden war (Berger 1988a; Arano *et al.* 1993; 1994). Gezeigt wird diese Ausbreitungsrichtung durch den zunehmenden Anteil von *R. perezi* nach Süden und den geringeren Anteil von *R. grafi* in südlichen Populationen im Vergleich mit Populationen in der Camargue (Abb. 4-1A; Abb. 4-2). Die Daten der vorliegenden Studie erlauben es nicht, die nördliche Ausbreitungsgrenze von *R. perezi* exakt zu bestimmen, da aber weder hier noch in anderen Studien (Arano *et al.* 1993, 1994; Pagano *et al.* 1997) *R. perezi* nördlich des Rhônedeltas nachgewiesen wurden, besteht dringender Überprüfungsbedarf durch weitere Untersuchungen. Aufgrund der vorgestellten Daten wird das Rhônedelta als nördliche Verbreitungsgrenze des PG-Komplexes angesehen. Die von Hotz *et al.* (1994b) nachgewiesene nach Osten gerichtete Ausbreitung kann durch die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, auch wenn eine exakte Beschreibung der östlichen Ausbreitungsgrenze nicht möglich ist.

Die rezente Ausbreitung des LE-Komplexes im Rhôneetal (Pagano *et al.* 1997) und der hohe Anteil an *R. ridibunda*-Weibchen in den Populationen 30 und 31 (Abb. 4-3) läßt es möglich erscheinen, daß die R-Populationen im Norden des Untersuchungsgebietes auch auf Einflüsse von *R. esculenta* zurückgehen. Aufklärung über eine Kontaktzone und die rezente Ausbreitung des LE- und PG-Komplexes im Süden Frankreichs könnten Proben aus dem Binnenland liefern, in dem es Habitate geben sollte, die *R. ridibunda* nicht besiedeln kann (Sauerstoffarmut) und sich somit LE-, PG- oder LE-PG-Populationen einstellen können.

Kapitel 6: SCHLUßFOLGERUNG

Die Diskussion über die Entstehung der Hybridogenese wurde bislang hauptsächlich aus der Sicht des Hybriden (*R. esculenta*) und unter der Annahme perfekter Hybridogenese geführt (z.B. Günther 1983; Günther und Plötner 1988; Schmidt 1993; Hotz *et al.* 1994a). Beide Parentalformen scheinen in die Hybridogenese zu investieren, da je nach Populationsystem die Gameten einer Parentalform verloren gehen (z.B. Günther 1983; Schmidt 1993). Der Frage, warum die beiden Parentalarten in ein solches Fortpflanzungssystem investieren, obwohl es scheinbar ein genetisches Faß ohne Boden darstellt (Berger *et al.* 1994), wurde bisher nicht intensiv nachgegangen.

Günther (1983) vertrat die Auffassung, daß das genetische Material von *R. ridibunda* im ökologisch sehr plastischen Hybriden über pessimale Zeiten und in ungünstigen Habitaten konserviert werden würde. Hierbei wurde jedoch der anderen Elternart kaum Beachtung geschenkt. Gelegentliche Auskreuzungen scheinen kaum ein Selektionsvorteil zu sein, der insbesondere den nicht-*R. ridibunda*-Elter für seinen scheinbaren Gametenverlust „entlohnt“. Auch Berger *et al.* (1994) stellen den Hybriden in den Mittelpunkt der Diskussion der evolutiven Aspekte. Sie führen morphologische Daten, molekulare Daten und die Chromosomenanalyse während der Meiose als Belege dafür an, daß der Hybrid (*R. esculenta*) keine genetische Brücke darstellt, sondern eher ein Loch, in das genetisches Material zwar hineingesteckt, aber nur in den seltensten Fällen wieder herausgeholt werden kann. Ich halte diese Erklärungen aber eher für sekundäre Symptome der hybridogenetischen Fortpflanzungsweise, die mit der Entstehung nichts zu tun gehabt haben müssen.

Die Entstehung der Hybridogenese könnte völlig andere Ursachen gehabt haben. Dazu soll nachfolgend ein mögliches Szenario entwickelt werden.

Bei Wasserfröschen besteht ein Zusammenhang zwischen der Kopf-Rumpf-Länge und der Fertilität der Weibchen. Ein Männchen, das sich mit einem großen Weibchen verpaart, hat durch die höhere Fertilität des großen Weibchens u.U. einen höheren Fortpflanzungserfolg, als Männchen, die sich mit kleinen Weibchen verpaaren. Es ist für Männchen also grund-

sätzlich ein Vorteil sich mit den größten Weibchen zu verpaaren (Hotz *et al.* 1992). Bei einem möglichen Kontakt von *R. ridibunda* und *R. lessonae* im Randareal ihres Ausbreitungsgebiets würden sich demnach *R. lessonae*-Männchen bevorzugt mit *R. ridibunda*-Weibchen verpaaren. Da es sich bei beiden Taxa um echte Arten handelt, führten Antihybridisierungsmechanismen wahrscheinlich zur Sterilität des Hybriden (Remington 1968). Solche Antihybridisierungsmechanismen sind gegenwärtig z.B. noch in rezenten Wasserfroschpopulationen des Donaudeltas wirksam (Günther *et al.* 1991; vgl. auch Berger *et al.* 1994).

Aufgrund des Paarungsverhaltens (Abt und Reyer 1993; Engeler 1994) könnte ein solcher Verlust bei *R. lessonae* auf die mit großem Paarungspotential ausgestatteten Männchen beschränkt gewesen sein. Die geringen Kosten der Spermienproduktion (Trivers 1962) hätten auf das Überleben solcher Männchen nur einen geringen Nachteil, weil Männchen sich mehrmals pro Jahr verpaaren können (Engeler 1994). Das im Vergleich zu Weibchen größere Paarungspotential der Männchen wird durch die Kreuzungsexperimente von Berger *et al.* (1994) bestätigt. Die kostenintensivere Produktion von Oocyten und der wichtigere Reproduktionserfolg der Weibchen der eigenen Art wurde durch die Hybridisierungen nicht vermindert. Für *R. lessonae*-Männchen bestand deshalb kein unmittelbarer Selektionsdruck zwischen den Weibchen der unterschiedlichen Formen zu unterscheiden.

Im Gegensatz dazu müßte sich der Gametenverlust auf *R. ridibunda* wesentlich drastischer ausgewirkt haben, da durch die Größe dieses Taxons dessen Weibchen von allen syntopen Wasserfrosch-Männchen zur Paarung bevorzugt werden sollten. In diesem Fall würden die kostenintensiveren Oocyten durch nachteilige Paarungen verlorengehen. Eine Aufhebung der Isolationsmechanismen hätte eine Verringerung des Verlusts der R-Gameten zur Folge. Zwei Möglichkeiten wären denkbar: (i) *R. ridibunda*-Weibchen erkennen einen falschen Paarungspartner (präzygotischer Mechanismus), (ii) die Sterilität des Hybriden wird aufgehoben (postzygotischer Mechanismus).

Die Aufhebung der Hybridsterilität hätte für *R. ridibunda* den Vorteil verlorene Gameten wieder zurückzugewinnen und die durch die externe Befruchtung verursachten Schwierigkeiten einer Partnererkennung zu umgehen. Sterilität beruht häufig auf Chromosomenfehlpaarungen, die während der Meiose zur Aberration von Gameten führen können. Ein Mechanismus, der diese Fehlpaarungen vermeidet würde dann die Fertilität des Hybriden ermöglichen.

Ein solcher Mechanismus könnte die Inaktivierung des nicht-*R. ridibunda*-Genoms in der Keimlinie des Hybriden sein. Zur Wiederherstellung eines aktiven diploiden Chromosomensatzes könnte dadurch ein Reparaturmechanismus in Gang gesetzt werden, der die aktiven (*R. ridibunda*-) Chromosomen dupliziert. Da diese Chromosomen identisch sind treten keine Chromosomenfehlpaarungen auf und die Fertilität des Hybriden ist hergestellt.

Der Vorgang der Inaktivierung eines gesamten Genoms könnte eine Weiterentwicklung der Bildung eines Barr-Körperchens (inaktives X-Chromosom; vgl. Lyon 1961) sein. Die Inaktivierung des X-Chromosoms zur Gendosisregulierung konnte in Organismen mit XX/XY-Geschlechtsdeterminierung, wie sie für die hier untersuchten Wasserfrösche ebenfalls angenommen wird (Berger *et al.* 1994), nachgewiesen werden. Gegenwärtige Versuche unterstützen die Möglichkeit der Inaktivierung von Autosomen, wenn ein Teil des für die X-Inaktivierung verantwortlichen Gens auf diese übertragen wird (Lee *et al.* 1999). Ferner liegen sowohl der Zeitpunkt der Inaktivierung eines X-Chromosoms, als auch der postulierten Genomeliminierung (Ogielska 1994b) in einem sehr frühen Entwicklungsstadium.

Darüber hinaus postulierten Raghianti *et al.* (1995), daß Heterochromatin bei der Genomerkennung eine bedeutende Rolle spielen könnte. Das Barr-Körperchen stellt bei weiblichen Säugetieren genau solches Heterochromatin dar. Auch die geringere Frequenz der Chiasmatabildung im Hybriden im Vergleich mit *R. ridibunda* bzw. *R. lessonae* (Guerrini *et al.* 1997) stehen im Einklang mit der Inaktivierung des gesamten Genoms, weil durch die inaktivierende Kondensation der Chromosomen Crossing-over nicht möglich sind. Zudem konnte Ogielska (1994b) feststellen, daß in den NLBs Chromosomenbruchstücke aus dem Zellkern transportiert werden. Bei einer möglichen Inaktivierung der einzelnen Chromosomen könnte es sich hier schlicht um einen Verdauungsmechanismus zur „Säuberung“ des Zellkerns handeln.

Der nicht signifikante Unterschied zwischen dem AT-Gehalt von *R. perezi* und *R. grafi* beruht dann auf inaktiven Chromosomen, die als „Balast“ im Zellkern verblieben sind. Die in männlichen Hybriden viel häufiger auftretenden Unregelmäßigkeiten bei der Genomeliminierung (Graf und Müller 1979; Kawamura und Nishioka 1986) könnten durch die geringe Größe des Y-Chromosoms und den damit verbundenen unbalancierten Chromosomensatz verursacht werden, der zu einer unvollständigen Inaktivierung des väterlichen Genoms führt.

6.1 SEKUNDÄREFFEKTE DER HYBRIDOGENESE

Alle durch die hybridogenetische Fortpflanzungsweise erzeugten Effekte, wie die durch den interspezifischen Genfluß erhöhte genetische Variabilität, die weite Verbreitung des *R. ridibunda*-Genoms in Europa durch Hybride und das Überwinden für *R. ridibunda* nicht besiedelbarer Habitate, sind nach der oben dargestellten Entstehungshypothese eher als Sekundäreffekte einzustufen und dürften auf die Entstehung der hybridogenetischen Fortpflanzungsweise keinen Einfluß gehabt haben.

Vor allem die erhöhte genetische Variabilität könnte aber die Erhaltung und Verbreitung hybridogenetischer *R. ridibunda*-Genome gefördert haben, weil die Inkorporation von Allelen aus dem Genpool einer anderen Art mit folgenden Vorteilen verbunden ist:

- (i) durch die genetische Variabilität wird die Anpassungsfähigkeit an sich verändernde Umwelten verbessert (Mitton 1997)
- (ii) der Zeitraum einer Anpassung aufgrund von Mutation und Selektion wird aufgrund der Inkorporation von Fremdallelen durch Umgehung der geringen Mutationsrate verkürzt
- (iii) bereits von der Umwelt „getestete“ Allele können in den eigenen Genpool aufgenommen werden.

Dies mag besonders in Populationen im Randareal einer Art eine wichtige Rolle spielen, die durch ihre oft geringe Größe und der daraus resultierenden hohen genetischen Drift (z.B. Gründereffekt) genetisch verarmt sind.

Die Ausbreitung von *R. ridibunda* über riesige Areale Ost- und Mitteleuropas (Berger 1988b) ist u.U. auf die durch die erhöhte genetische Variabilität gewonnene Anpassungsfähigkeit von *R. ridibunda* zurückzuführen. Auch das Ausbreitungsareal von *R. lessonae* ist im Vergleich mit anderen Wasserfröschen sehr viel größer (Günther 1997) und deutet auf eine hohe Anpassungsfähigkeit dieses Wasserfroschtaxons hin, das ebenfalls auf die durch Inkorporation von Fremdallelen einer anderen Art gewonnene höhere genetische Variabilität beruhen könnte.

Die Häufigkeit der postulierten Inkorporation von Fremdallelen wird durch die Abweichung von der erwarteten HARDY-WEINBERG-Verteilung gezeigt. Diese Abweichungen treten speziell in solchen Populationen auf, in welchen alle Wasserfroschtaxa eines hybridogenetischen Komplexes syntop leben. Da sich eine HARDY-WEINBERG-Verteilung innerhalb einer Generation wieder einstellt, deutet das gestörte HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht auf rezente Vorgänge hin, die zu einer permanenten Störung der Allelhäufigkeiten bei den einzelnen Taxa geführt hat. Beachtet man die Vielzahl der Abweichungen von der zu erwartenden HARDY-WEINBERG-Verteilung, ist ein seltenes Auftreten solcher Introgressionsergebnisse kaum anzunehmen. Die Genpools beider Arten werden demnach durch die Introgressionsergebnisse, hauptsächlich in PGR-Populationen, in jeder Generation stark beeinflusst. Dadurch wird der Genpool der beiden Arten ständig verändert und bietet beiden Elternarten die Möglichkeit vorteilhafte Gene aus dem Genpool der anderen Art zu übernehmen und dadurch ihr Anpassungspotential zu vergrößern (Mitton 1997). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß durch die kleine Taxonteilpopulation, speziell in PGR-Population, auch hohe genetische Drift eine Abweichung von der erwarteten HARDY-WEINBERG-Verteilung verursacht.

Kapitel 7: ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine großflächige Untersuchung an südfranzösischen Wasserfröschen durchgeführt. Es wurden 31 Populationen mit 918 Tieren beprobt und mit Referenzproben aus Frankreich, Italien, Polen, Spanien und Slowenien genetisch verglichen. Die Genotypen der Tiere wurden mittels Allozymelektrophorese an sieben diagnostischen Loci bestimmt. Für Teilproben wurde das Alter, die Fläche der Erythrocyten und der DNA-Gehalt bestimmt.

Die wichtigsten Ergebnisse der unterschiedlichen methodischen Ansätze lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Es wurden neben einem großen Anteil von *R. grafi* (452 Tiere), *R. perezi* (200 Tiere) und *R. ridibunda* (254 Tiere) auch ein *R. esculenta* und zwei *R. lessonae* in der Camargue nachgewiesen.
- (2) Es wurden insgesamt sieben unterschiedliche Populationssysteme gefunden, die in ihrer Häufigkeit geographisch variierten. Im Rhônetal überwogen reine *R. ridibunda*-Populationen, während im Rhônedelta neben PGR-Populationen hauptsächlich PG-Populationen nachgewiesen wurden. Im Süden des Untersuchungsgebiets konnten fast ausschließlich PG-Population gefunden werden. Reine *R. grafi*- bzw. *R. perezi*-Populationen waren selten.
- (3) Die Geschlechterverhältnisse der einzelnen Taxa waren stark gestört. Dies gilt besonders für den Hybriden *R. grafi* mit einem Männchenanteil von nur 7,3%. Das Geschlechterverhältnis von *R. ridibunda* ist besonders in PGR-Population zu Gunsten von Weibchen verschoben. Eine Modellierung von Populationen zeigt, daß wahrscheinlich *R. grafi*-Männchen durch eine gestörte Gametogenese für die gestörten Geschlechtsverhältnisse seiner Parentalformen verantwortlich ist.

- (4) Die genetische Analyse zeigt eine unerwartet hohe genetische Variabilität von *R. ridibunda* im Vergleich zu *R. perezi* und eine geographische Varianz der genetischen Variabilität in allen untersuchten Taxa. Die genetische Variabilität zeigte bei allen Wasserfroschformen in der Camargue ein Maximum.
- (5) Die hohe genetische Variabilität geht hauptsächlich, neben Einführung von verschiedenen genetischen *R. ridibunda*-Linien, auf Introgression zurück. Eine erhöhte Introgression wurde in PGR-Populationen nachgewiesen, wobei die Daten darauf hindeuten, daß der Introgressionsgrad vom Anteil der syntopen Wasserfroschtaxa abhängig ist.
- (6) Triploide Hybride, wie sie aus dem LE-Komplex bekannt sind, konnten weder planimetrisch noch flußzytometrisch gefunden werden. Der AT-Gehalt scheint jedoch mit zunehmender Rekombination der Genome der syntopen Elternarten zuzunehmen und unterstützt Aneuploidien im Hybrid *R. grafi*.

Die Ergebnisse machen deutlich, daß vornehmlich Hybrid-Männchen fähig sein müssen, Gameten mit Genomen beider Elternarten in Abhängigkeit mit deren An- bzw. Abwesenheit zu produzieren und damit direkten Einfluß auf das Geschlechterverhältnis zu nehmen. Ferner eröffnet sich so ein Weg für einen Genfluß zwischen den Genpools von *R. perezi* und *R. ridibunda*.

Die Entstehung der Hybridogenese könnte ein Schutzmechanismus von *R. ridibunda* gewesen sein. Ein solcher Schutzmechanismus basiert dann auf die Rückgewinnung von für die Arterhaltung von *R. ridibunda* bedeutsamen R-Oocyten durch die Fertilität der Hybrid-Weibchen, die bei Paarungen zwischen *R. lessonae*-Männchen und *R. ridibunda*-Weibchen vornehmlich entstehen (Berger 1994). Dabei ist der Eliminierungsmechanismus u.U. eine Weiterentwicklung der Inaktivierung eines X-Chromosoms (Barr-Körperchen), wie sie von Säugetierarten bekannt ist, deren Geschlechtsdeterminierung dem XX/XY-Typ folgt.

Der Gametenverlust der nicht-*R. ridibunda*-Art wirkt sich aufgrund der Beschränkung auf die Männchen dieser Art nicht negativ auf dessen Fortpflanzungserfolg aus, weil durch die geringen Kosten einer Spermienproduktion eine erfolgreiche Paarung mit Weibchen der gleichen Art möglich ist.

Die Erhöhung der genetischen Variabilität durch interspezifischen Genfluß und die daraus resultierende größere Anpassungsfähigkeit ist eher als Sekundäreffekt anzusehen, der keinen unmittelbaren Einfluß auf die Entstehung, aber wahrscheinlich auf die Verbreitung der Hybridogenese hatte.

Kapitel 8: LITERATURVERZEICHNIS

ABT, G., UND REYER, H.-U. (1993): Mate choice and fitness in a hybrid frog: *Rana esculenta* females prefer *Rana lessonae* males over their own. Behav. Ecol. Sociobiol. 32: 221-228.

ARANO, B., LLORENTE, G., UND GARCÍA-SERRA, N. (1993): Hybridogenetic processes involving *R. perezii*: distribution of the R-P complex In: 7th Ordinary General Meeting Societas Europaea Herpetologica. 15-19 September 1993, Barcelona, Spain. Program and Abstracts, (Bricall *et al.*, J., eds) p. 38.

ARANO, B., LLORENTE, G., HERRERO, P., UND SANCHIZ, B. (1994): Current studies on iberian water frogs. Zoologica Poloniae 39 (3-4): 365-376.

BEERLI, P. (1986): Seefrösche in einer Tümpelfrosch - Wasserfrosch Population in einem antropogen beeinflussten Habitat. Diplomarbeit, Universität Zürich.

BEERLI, P. (1994): Genetic isolation and calibration of an average protein clock in western Palearctic water frogs of Aegean region. Dissertation, Universität Zürich.

BERGEN, K., SEMLITSCH, R. D., UND REYER, H.-U. (1997): Hybrid female matings are directly related to the availability of *Rana lessonae* and *Rana esculenta* males in experimental populations. Copeia, 1997 (2): 275-283.

BERGER, L. (1988a): On the origin of genetic systems in European water frogs hybrids. Zoologica Poloniae 35 (1-4): 5-32.

BERGER, L. (1988b): Principles of studies of European water frogs. Acta Zool. Cracov 31 (21): 563 - 580.

BERGER, L. (1994): Some peculiar phenomena in European water frogs. Zoologica Poloniae 39 (3-4): 2267-280.

- BERGER, L., UZZELL, T., UND HOTZ, H.** (1988): Sexdetermination and sex ratios in Western Palearctic water frogs: XX and XY female hybrids in the Pannonian Basin. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 140: 220 - 239.
- BERGER, L., UZZELL, T., UND HOTZ, H.** (1994): Postzygotic reproductive isolation between Mendelian species of European water frogs. Zoologica Poloniae 39 (3-4): 209-242.
- BINKERT, J., BORNER, P., UND CHEN, P.S.** (1982): *Rana esculenta* complex: An experimental analysis of lethality and hybridogenesis. Experientia 38: 1283-1292.
- BLANKENHORN, H. J., HEUSSER, H., UND VOGEL, P.** (1971): Drei Phänotypen von Grünfröschen aus dem *Rana esculenta*-Komplex in der Schweiz. Revue suisse de Zoologie, 78: 1242-1247.
- BORKIN, L. J., VINOGRADOV, A. E., ROSANOV, J. M., UND CAUNE, I. A.** (1987): Hemiclonal inheritance in the hybridogenetic complex *Rana esculenta*: evidence from flow DNA-cytometry. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 295: 1261-1264.
- BUCCI, S., RAGGHIANI, M., MANCINO, G., BERGER, L., HOTZ, H., UND UZZELL, T.** (1990): Lambrush and mitotic chromosomes of the hemiclonally reproducing hybrid *Rana esculenta* and its parental species. J. Exp. Zool., 255: 37 - 56.
- CASTANET, J., FRANCILLION-VIEILLOT, F., MEUNIER, F.J. UND DE RICQLES, A.** (1993): Bone and individual aging In: Bone Vol. 7, Bone growth, Hall, B.K. (ed.), CRC Press, Boca Taon, Fla.: 245 - 283.
- DARZYNKIEWICZ, Z., UND CRISSMAN, H.A.** (1990): Methods in cell biology 33, Academic Press Inc. Oxford.
- DIAZ PANIAGUA C.** (1987): Tadpole distribution in relation to vegetal heterogeneity in temporary ponds. Herpetological J., Vol. 1: 167-69.
- DIAZ PANIAGUA C.** (1990): Temporary Ponds as breeding sites of amphibians at a locality in southwestern Spain. Herpetological J., Vol 1: 447-453.
- DUBOIS, A., UND OHLER, A.** (1994): Frogs of the subgenus *Pelophylax* (Amphibia, Anura, genus *Rana*): a catalogue of available and valid scientific names, with comments on name-bearing types, complete synonymies, proposed common names, and maps showing all type localities. Zoologica Poloniae 39: 139-204.
- DUELLMAN, W.E., UND TRUEB, L.** (1986): Biology of amphibians New York, St. Louis, San Francisco.

- EIKHORST, R.** (1988): Die Verteilung von diploiden und triploiden Larven des Teichfrosches *Rana esculenta* Linnaeus, 1758 in einer reinen Bastardpopulation (Anura: Ranidae). Salamandra 24 (1): 59 - 68.
- ENGELER, B.** (1994): Partnerwahl im *Rana lessonae/Rana esculenta* - Hybridkomplex. Diplomarbeit, Universität Zürich.
- ESTEBAN, M., GARCÍA-PARIS, M., UND CASTANET, J.** (1996): Use of bone histology in estimating the age of frogs (*Rana perezi*) from a warm temperate climate area. Canadian J. of Zoology, 74 (10): 1914-1921.
- GRAF, J.D., KARCH, F., UND MORELLION, M.C.** (1977): Biochemical variation in the *Rana esculenta* complex: A new hybrid form related to *Rana perezi* and *Rana ridibunda*. Experientia 33: 1582 - 1585.
- GRAF, J.-D., UND MÜLLER, W.P.** (1979): Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex. Experientia 33: 1574 - 1576.
- GROSSENBACHER, K.** (1988): Verbreitungsatlas der Amphibien der Schweiz. Documenta Faunistica Helvetiae 7: 1-207.
- GUARINO, F.M., ANGELINI, F.C., GIACOMA, C., UND CAVALLOTTO, L.** (1995): Age determination by skeletochronology in low- and high-elevation populations of *Rana italica*. Llorente *et al.* (Eds.). In: Llorente, G.A. (ed.), Scientia Herpetologica: 187-191. Asociacion Herpetologica Espanola Biblioteca, Salamanca (Spanien).
- GUERRINI, F., BUCCI, S., RAGGHIANI, M., MANCINO, G., HOTZ, H., UZZELL, T., UND BERGER, L.** (1997): Genomes of two water frog species resist germ line exclusion in interspecies hybrids. J. of Experimental Zoology, 279 (2), 163-176.
- GÜNTHER, R.** (1973): Über die verwandschaftlichen Beziehungen zwischen den europäischen Grünfröschen und den Bastardcharakter von *R. esculenta* (Anura). Zool. Anz. Leipzig 190: 250 - 285.
- GÜNTHER, R.** (1975a): Untersuchungen der Meiose bei Männchen von *Rana ridibunda* Pall., *Rana lessonae* Cam., und der Bastardform *Rana esculenta* L. (Anura). Biol. Zbl. 94: 277 - 294.
- GÜNTHER, R.** (1975b): Zum natürlichen Vorkommen und zur Morphologie triploider Teichfrösche, "*Rana esculenta*", L., in der DDR (Anura, Ranidae). Mitteilungen aus dem zoologischen Museum in Berlin 51 (1): 145-158.
- GÜNTHER, R.** (1983): Zur Populationsgenetik der mitteleuropäischen Wasserfrösche des *Rana esculenta*-Synkleptons (Anura, Ranidae). Zool. Anz. Jena 211: 43 - 54.

- GÜNTHER, R.** (1990): Die Wasserfrösche Europas (Anura - Froschlurche). Wittenberg Lutherstadt: Die Neue Brehm-Bücherei.
- GÜNTHER, R.** (1996): Die Amphibien und Reptilien Deutschlands. Gustav Fischer Verlag.
- GÜNTHER (1997):** *R. lessonae*; *R. ridibunda*. In: Gasc, J.P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, O., Lescure, J., Martens, H., Marzinez-Rica, J.P., Maurin, H., Olivieri, R., Sofianidou, T., Veith, M., und Zuiderwijk, A. (1997): Atlas of the amphibians and reptiles in Europe Societas Europea Herpetologica & Muséum National d'Histoire Naturelle IEGB/SPN, Paris: 148 und 154.
- GÜNTHER, R., PLÖTNER, J., UND TETZLAFF, I.** (1991): Zu einigen Merkmalen der Wasserfrösche (*Rana esculenta* Komplex) des Donau-Deltas. Salamandra 27: 246 - 265.
- GÜNTHER, R., UND HÄHNEL, S.** (1976): Untersuchungen über den Genfluß zwischen *Rana ridibunda* und *Rana lessonae* sowie die Rekombinationsrate bei der Bastardform *R. esculenta* (Anura, Ranidae). Zool. Anz 197, 23 - 38.
- GÜNTHER, R., UND PLÖTNER, J.** (1988): Zur Problematik der klonalen Vererbung bei *Rana* kl. *esculenta* (Anura). In: Günther, R. and Klewen, R. (eds.): Beiträge zur Biologie und Bibliographie der europäischen Wasserfrösche 1: 23 - 46.
- GÜNTHER, R., UND PLÖTNER, J.** (1994): Morphometric, enzymological and bioacoustic studies in Italian water frogs (Amphibia, Ranidae). Zoologica Poloniae 39: 387-415.
- GÜNTHER, R., UZZELL, T., UND BERGER, L.** (1979): Inheritance patterns in triploid *Rana "esculenta"* (Amphibia, Salientia). Mitt. Zool. Mus. Berlin 55: 35 - 57.
- HARRIS, H., UND HOPKINSON, D.A.** (1976): Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North - Holland, Amsterdam.
- HEBERT, D.N., UND BEATON, M.T.** (1993): Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetat elektrophorese – a practical handbook. Helena Laboratories, Windsor, Ontario.
- HEIDENREICH, A.** (1998): Geodist 1.3, a computer programm for distance measurements. Institut für Zoologie V, Universität Mainz.
- HEPPICH, S., TUNNER, H.G., UND GREILHUBER, J.** (1982): Premeiotic chromosome doubling after genome elimination during spermatogenesis of the species hybrid *Rana esculenta*. Theor. Appl. Genet. 61: 101 - 104.
- HOARE, K., UND BEAUMONT, A.R.** (1995): Effects of an ODH null allele and a GPI low-activity allozyme on shell length in laboratory-reared *Mytilus edulis*. Marine Biology (Berlin) 123 (4): 775 - 780.

- HOTZ, H.** (1983): Genetic diversity among water frog genomes inherited with and without recombination. Dissertation, Universität Zürich.
- HOTZ H., SEMLITSCH R.D., GUTMANN E., GUEX G.-D., UND BEERLI, P.** (1999): Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids. Proc. natl. Acad. Sci. USA, Vol. 96: 2171 - 2176.
- HOTZ, H., BEERLI, P., GUEX, G.-D., SEMLITSCH, R.D., UND UZZELL, T.** (1994a): Clonal diversity and hybrid frequency are not correlated in water frogs. Is the frozen niche model wrong?. Zoologica Poloniae 39 (3-4): 513f.
- HOTZ, H., BEERLI, P., UND SPOLSKY, C.** (1992): Mitochondrial DNA reveals formation of nonhybrid frogs by natural matings between hemiclinal hybrids. Mol. Biol. Evol. 9 (4): 610 - 620.
- HOTZ, H., MANCINO, G., BUCCI-INNOCENTI, S., RAGGHIANI, M., BERGER, L., UND UZZELL, T.** (1985): *Rana ridibunda* varies geographically in inducing clonal gametogenesis in interspecies hybrids. J. of experimental Zoology, 236 (2): 199-210.
- HOTZ, H., UZZELL, T., UND BERGER, L.** (1994b): Hemiclinal hybrid water frogs associated with the sexual host species *Rana perezi*. Zoologica Poloniae 39 (3-4): 243 - 266.
- JUARRANZ, A., UND PATÓN, D** (1990): The use of acridine orange for age-determination of *Rana perezi* based on annual rings in phalanges. Amphibia-Reptilia, 11 (2): 193-196.
- KAWAMURA, T., UND NISHIOKA, M.** (1986): Hybridization experiments among *Rana lessonae*, *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*, with special reference to hybridogenesis. Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol., Hiroshima University 8: 117 -271.
- KOREF-SANTIBAÑEZ, S., UND GÜNTHER, R** (1980): Karyological and serological studies in *Rana lessonae*, *R. ridibunda* and in their hybrid *R. 'esculenta'* (Amphibia, Anura. Genetica, 52/53: 195-207.
- KOTLÍK, P., UND SULOVA, K** (1994): Syntopic occurrence of three taxa of water frogs in Czech Republic. Zoologica Poloniae 39: 417-424.
- KUSANO, T., FUKUYAMA, K., UND MIYASHITA, N.** (1995): Age determination of the stream frog, *Rana sakuraii*, by skeletochronology. J. of Herpetology 29 (4): 625-628.
- LEE, J.T., NAIFUNG, L. UND YOON, H.** (1999): Genetic analysis of the mouse X inactivation center defines an 89kb multifunction domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3836 - 3841.
- LIZANA, M., MELLADO, V.P., UND CIUDAD, M.J.** (1987): Biometry and relation with the ecology of *Rana iberica* and *Rana perezi* in the Sistema Central (Spain). In: Proceedings of the 4th

- Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica, (Gelder, van, J. J., Strijbosch, H., Bergers, & M., P. J., eds) pp. 253-258. Faculty of Sciences Nijmegen.
- LYON, M.** (1961): Nature (Lond.) 190: 372 - 373.
- MANTOVANI, B., UND SCALI, V.** (1992): Hybridogenesis and androgenesis in the stich insect *Bacillus rossius-grandii benazzii* (Insecta, Phasmoidea). Evolution 46: 783 - 796.
- MITTON, J.B.** (1997): Selection in natural populations. Oxford University Press, New York.
- MORAND, A. UND JOLY, P.** (1995): Habitat variability and space utilization by the amphibian communities of the French Upper-Rhone floodplain. Hydrobiologia 300/301: 249-257.
- MORAND, A., JOLY, P., UND PAGANO, A.** (1998): Influence of a gradient of stream charactersitics on morphological variation in water frogs. Alytes, in press.
- MULLER, H.J.** (1964): The relation of recombination to mutational advance. Mut. Res. 1: 2 - 9.
- NOPP, H. UND TUNNER, H.** (1985): Zur Sauerstoffbindung des Blutes von *Rana ridibunda* Pall., *Rana lessonae* Cam., *Rana esculenta* L. (Ranidae, Anura) bei normaler und erniedrigter Sauerstoffspannung. Sitzungsbericht der Östr. Akad. d. Wissenschaften, math.-nat. Klasse 194 (1-5): 125 - 130.
- OGIELSKA, M.** (1994a): *Rana esculenta* developmental syndrome: fates of abnormal embryos from the first cleavage until spontaneous death. Zoologica Poloniae 39: 447-459.
- OGIELSKA, M.** (1994b): Nucleus-like bodies in gonial cells of *Rana esculenta* (Amphibia, Anura) tadpoles - a putative way of chromosome elmination. Zoologica Poloniae 39 (3-4): 461 - 474.
- PAGANO, A., JOLY, P., UND HOTZ, H.** (1997): Taxon composition and genetic variation of water frogs in the Mid-Rhône floodplain. C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life science.
- PAGANO, A., UND JOLY, P.** (1998): Limits of the morphometric method for field identification of water frogs. Alytes 16 (3-4): 15 - 23.
- PAGANO, A., UND SCHMELLER, D.** (1999): Is recombination less negligible than previously described in hybridogenetic water frogs? In: Current studies in Herpétology, (SEH) Chambéry, Miaud C. and R. Guyétant (eds), 9th O.G.Meeting, 25-29 August 1998, Le Bourget du lac, France.
- PATÓN, D., JUARRANZ, A., SEQUEROS, E., PÉREZ-CAMPO, R., LÓPEZ-TORRES, M., UND BARJA DE QUIROGA, G.** (1991): Seasonal age and sex structure of *R. perezii* assessed by sceletochronology. J. of Herpetology 25 (4): 389-394.

- PEARCE, F., UND CRIVELLI, A.J.** (1994): Characteristics of mediterranean wetlands. Tour du Valat, Arles (France), 88 p. (Publications MedWet / Tour du Valat - number 1).
- PLÖTNER, J.** (1998): Genetic diversity in mitochondrial 12S rDNA of western Palearctic water frogs (Anura, Ranidae) and implications for their systematics. *J. Zool. Syst. Evol. Research* 36: 191 - 201.
- PLÖTNER, J., BECKER, C., UND PLÖTNER, K.** (1994): Morphometric and DNA investigations in European water frogs (*Rana kl. esculenta* synklepton (Anura, Ranidae)) from different population systems. *J. Zoological Systematics and Evolutionary Research* 32 (3): 193 - 210.
- PLÖTNER, J., UND KLINKHARDT, M.** (1992): Investigations on the genetic structure and the morphometry of a pure hybrid population of *Rana kl. esculenta* (Anura, Ranidae) in North Germany. *Zoologischer Anzeiger*, 229, 163-184.
- POLLS PELAZ, M.** (1994): Modes of gametogenesis among kleptons of the hybridogenetic water frog complex: an evolutionary synthesis. *Zool. Pol.* 39/3-4: 123-138.
- POLLS PELAZ, M., UND GRAF, J.-D.** (1988): Erythrocyte size as indicator of ploidy level in *Rana kl. esculenta* before and after the metamorphosis. *Alytes* 7 (2): 53 - 61.
- RAGGHINATI, M., GUERRINI, F., BUCCI, S., MANCINO, G., HOTZ, H., UZZELL, T. UND GUEX G.-D.** (1995): Molecular characterization of a centromeric satellite DNA in the hemiclinal hybrid frog *Rana esculenta* and its parental species. *Chromosome Research* 3: 497 - 506.
- REMINGTON, D.** (1968): Suture-zones of hybrid interaction between recently joined biotas. *Evol. Biol.* 2: 321 - 428.
- RYBACKI, M.** (1994): Structure of water frog populations (*Rana esculenta* complex) of the Wolin island, Poland. *Zoologica Poloniae* 39: 345-364.
- SCHMIDT, B.R.** (1993): Are hybridogenetic frogs cyclical parthenogens?. *Trends. Ecol. Evol.* 8: 271 - 273.
- SCHRÖER, T.** (1996): Morphology und Ploidiegrade von Wasserfröschen aus unterschiedlichen Populationssystemen in Nordost-Polen. *Z. für Feldherpetologie* 3: 133-150.
- SCHRÖER, T.** (1997): Untersuchungen zur Populationsgenetik und Ökologie westfälischer Wasserfrösche (Anura: Ranidae). Dissertation, Universität Düsseldorf.
- SCHULTZ, R.J.** (1969): Hybridization, unisexuality and polyploidie in the teleost *Poeciliopsis* (*Poeciliidae*) and other vertebrate. *Amer. Nat.* 103: 605 - 619.
- SMIRINA, E.M.** (1994): Age determination and longevity in amphibians. *Gerontology* 40: 133 - 146.

- SWOFFORD, D.L., UND SELANDER, R.B.** (1989): Biosys-1, release 1.7. a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Illinois Natural History Survey.
- TINTI, F., UND SCALI, V.** (1995): Allozymic and cytological evidence for hemiclinal, all-paternal, and mosaic offspring of the hybridogenetic stick insect *Bacillus rossius-grandii grandii*. J. of Exp. Zool. 273: 149 - 159.
- TRIVERS, R.L.** (1972): Parental investment and sexual selection. In: Campbell, B., Sexual selection and the descent of man, Heinemann, London: 136 - 179.
- TUNNER, H.G.** (1970): Das Serumweißbild der einheimischen Wasserfrösche und der Hybridcharakter von *Rana esculenta*. Verh. Dt. Zool. Ges. 64: 352 - 358.
- TUNNER, H.G.** (1974): Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation. Z. zool. Syst. u. Evol. Forsch. 12: 309 - 314.
- TUNNER, H.G.** (1980): Kreuzungsexperimente mit Wasserfröschen aus österreichischen und polnischen Mischpopulationen (*Rana lessonae* + *Rana esculenta*). Eine Analyse biochemischer und morphologischer Merkmale. Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch. 18, 257 - 297.
- TUNNER, H.G.** (1992): Locomotory behaviour in water frogs from Neusiedlersee (Austria, Hungary), 15km migration of *Rana lessonae* and its hybridogenetic associate *Rana esculenta*. In: Korsos, Z. and Kiss, I. (eds), Proceedings of the 6th Ord. General. Meet. of the S.E.H.: 449 - 452.
- TUNNER, H.G., UND HEPPICH, S.** (1981): Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. Naturwiss. 68: 207 - 208.
- TUNNER, H.G., UND HEPPICH-TUNNER, S.** (1991): Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog. Naturwissenschaften 78: 32 - 43.
- TUNNER, H.G., UND NOPP, H.** (1979): Heterosis in the common European water frog. Naturwissenschaften 66: 268 - 269.
- UZZELL, T.** (1982): Introgression and stabilization in western palearctic species of water frogs. In: Mossakowski, D. and Roth, G. (eds.): Environmental adaptation and evolution, Gustav Fischer Verlag.
- UZZELL, T., BERGER, L., UND GÜNTHER, R.** (1975): Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (Amphibia Salientia). Proc. Acad. Nat. Sci. Phil. 127 (11), 81-91.
- UZZELL, T., GÜNTHER, R., UND BERGER, L.** (1977): *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*: a leaky hybridogenetic system (Amphibia Salientia). Proc. Acad. Nat. Sci. Phil. 128: 147 - 171.

- UZZELL, T., HOTZ, H., UND BERGER, L.** (1980): Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes. *J. Exp. Zool.* 214, 251 - 259.
- UZZELL, T., UND BERGER, L.** (1975): Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta*. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* 127: 13 - 24.
- UZZELL, T., UND TUNNER, H.G.** (1983): An immunological analysis of Spanish and French water frogs. *J. Herpetol.* 17: 320 - 326.
- VINOGRADOV, A. E., ROZANOV, J. M., CAUNE, I. A., UND BORKIN, L. J.** (1988): Eliminacija genoma odnogo iz roditelja do predmeiotičeskog sinteza DNK u hibridogenog vida *Rana esculenta* [Genome elimination of one of the parents in the hybridogenic species *Rana esculenta* prior to premeiotic DNA synthesis]. *Citologija*, 30 (6), 691-698.
- VINOGRADOV, A.E., BORKIN L.J., GÜNTHER R., UND ROSANOV, J.M.** (1990): Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry. *Genome*, Vol. 33: 619-627.
- VINOGRADOV, A.E., BORKIN, L.J., GÜNTHER, R., UND ROSANOV, J.M.** (1991): Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same individual. *Hereditas* 114: 245-251.
- VRIJENHOEK, R.C.** (1993): The origin and evolution of clones versus the maintenance of Sex in *Poeciliopsis*. *J. of Heredity* 94: 388 - 395.

DANKSAGUNG

Neue Fragen aufzuwerfen, neue Möglichkeiten zu finden alte Probleme aus einem neuen Blickwinkel zu betrachten, erfordert schöpferische Vorstellungskraft und macht die wirklichen Fortschritte in der Wissenschaft aus.

Albert Einstein

Dieser wirkliche Fortschritt in der Wissenschaft ist nicht im Alleingang möglich sondern bedarf einer Arbeit im Team, das u.a. hilft die Strapazen, die mit einer wissenschaftlichen Arbeit einher gehen, zu meistern, durch Diskussion eben den neuen Blickwinkel für alte Probleme zu entwickeln und die schöpferische Vorstellungskraft des Einzelnen durch die der gesamten Gruppe zu vergrößern. Ferner benötigt man für eine wissenschaftliche Arbeit Geld, das ohne Verwaltungsaufwand nicht vorhanden gewesen wäre. Aus all diesen Gründen möchte ich mich bei meinen Kollegen, Freunden und meiner Familie bedanken.

Michael Veith und **Alfred Seitz** waren als Betreuer ein starkes Team, besonders herausheben möchte ich, daß mir diese Arbeit ohne eigene Projektgelder möglich gemacht wurde und beide stets zu Diskussionen bereit waren. **Jes Johannesen**, **Evi Griebeler**, **Joachim Kosuch**, **Jutta Schneider** und **Christiane Stürzbecher** waren gute Diskussionspartner und ein Quell neuer Ideen. Ihre Kritik an meiner Arbeit und Auswertung brachten mich häufig zum Grübeln und gaben mir die Möglichkeit neue Sichtweisen zu entwickeln. Besonders bei meinen Büromitbewohnern **Jes „Dr. No“ Johannesen** und **Jutta Schneider** möchte ich mich für die wirklich ständige Diskussionsbereitschaft während der „heißen Phase“ meiner Dissertation bedanken. Für die Bereitschaft von **Oliver "Odd" Lange** mir die Herleitung mathematischer Modelle näherzubringen möchte ich mich an dieser Stelle ebenfalls bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich auch für die tolle Betreuung im Nationalpark Camargue bei **Alain Crivelli**, **Elisabeth Rossecchi** und **Jean-Paul Taris** bedanken. Organisatorisch waren meine Fangaufenthalte immer ein voller Erfolg und das Essen immer ein Ereignis. Meinen Froschfängern **Christiane Jakob**, **Dietmar Bertram** und **Falk Siegenthaler** ist zu

danken für die große Unterstützung. Besonderer Dank gilt hier **Dietmar Bertram**, da die fünf Wochen mit mir und den Wasserfröschen ihm mit Sicherheit nicht nur positiv in Erinnerung bleiben werden, er aber immer tapfer und mit viel Witz durchgehalten hat. Für die flußzytometrische Vermessung eines Teiles meiner Proben und die damit verbundene stundenlange Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei **Mohammed Moustafa** bedanken. Viele Verwaltungsangelegenheiten, Kopierdienste und andere leidige Arbeiten wurden von **Sabine Schmitt** übernommen. **Roland Kuhn** war immer zur Stelle, wenn ich mal wieder meine Ausrüstung zusammenstellte und feststellen mußte, daß etwas fehlte oder repariert werden mußte. Beiden schulde ich dafür großen Dank.

Meinen **Eltern**, **Schwiegereltern** (in spe), meinem **Bruder** nebst Anhang und allen voran meiner Partnerin **Marion Koch** möchte ich für all das Gute danken, das sie mir in den Jahren meiner Promotion haben zuteil werden lassen. In Zeiten, in denen das Geld mal knapp war, durfte ich mich zudem noch über außerplanmäßige Zuwendungen freuen, so daß ich nie in finanzielle Nöte kam.

Zum Schluß möchte ich mich noch bei all den anderen bedanken, die einen kleineren oder größeren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben (**C. Leskovar**, **U. Sinsch**, **T. Heibert**, **D. Klebsch**, **S. Giesen**, **J. Müller**, **A. Pagano**, **M. Ogielska**, **A. „Kiwi“ Kiefer**, **H. Hotz**, den Spaniern um **P. Herrero**, **Fam. T. Müller**, **Fam. A. Orth**, **Ops Orth**, **E. Schuler**, **R. und M. Zardoya**, **N. und M. Vogrin**, den **Köchinnen**, den **Guards** und allen **anderen Mitarbeitern des Tour du Valat** u.a.).

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

NAME:	Dirk Schmeller
ADRESSE:	Ludwigsburger Str. 2 55122 Mainz
ALTER:	29
GEBURTSORT:	Mannheim/Neckarau

AUSBILDUNG

1976 – 1980	Grundschule in 67435 Neustadt 14
1980 – 1990	Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Neustadt
1990 – 1991	Wehrdienst
1991 – 1995	Fachstudium Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, Abschluß Diplom, Schwerpunkte: Zoologie, Botanik, Mikrobiologie und Publizistik Titel der Diplomarbeit: <i>Die genetische Populationsstruktur der Heuschreckenart P. albopunctata (Goeze, 1776) unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Umweltparameter.</i>
1996 – 1999	Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Inst. für Zoologie

APPENDIX

Appendix 1: Ergebnisse der Modellberechnungen der Populationszusammensetzung von PG- Populationen über mehrere Generationen (Gx). PP_{σ} = R. perezi-Männchen, PP_{φ} = R. perezi- Weibchen, RP_{σ} = R. grafi-Männchen, RP_{φ} = R. grafi-Weibchen (vgl. Kapitel 3.7).

	Modell 1									
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
PP_{σ}	13	7	4	2	1	1	1	1	0	0
PP_{φ}	13	7	4	2	1	1	1	1	0	0
RP_{σ}	116	64	96	81	90	104	79	92	86	0
RP_{φ}	122	187	161	179	172	158	184	171	177	0

	Modell 2		Modell 3				
	G1	G2	G1	G2	G3	G4	G5
PP_{σ}	22	22	8	3	1	0	0
PP_{φ}	22	22	8	3	1	0	0
RP_{σ}	0	0	122	82	103	95	0
RP_{φ}	221	220	126	177	160	169	0

	Modell 4								
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
PP_{σ}	15	10	5	3	2	1	1	0	0
PP_{φ}	15	10	5	3	2	1	1	0	0
RP_{σ}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RP_{φ}	234	246	255	259	261	263	264	265	0

Appendix 2: Ergebnisse der Modellberechnungen der Populationszusammensetzung von PGR-Populationen über mehrere Generationen (Gx). $PP\sigma$ = R. perezi-Männchen, $PP\varphi$ = R. perezi-Weibchen, $RP\sigma$ = R. grafi-Männchen, $RP\varphi$ = R. grafi-Weibchen; $RR\sigma$ = R. ridibunda-Männchen, $RR\varphi$ = R. ridibunda-Weibchen (vgl. Kapitel 3.7).

	Modell 1				Modell 2				Modell 3				Modell 4			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
$PP\sigma$	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0
$PP\varphi$	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0
$RP\sigma$	27	3	0	0	5	4	0	0	34	5	0	0	2	5	0	0
$RP\varphi$	26	4	0	0	40	8	0	0	35	8	0	0	50	15	0	0
$RR\sigma$	28	42	58	59	37	52	61	59	20	33	57	59	25	46	61	59
$RR\varphi$	35	69	60	59	33	54	57	59	27	71	61	59	38	51	57	59

Appendix 3: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für R. grafi mit den Faktoren (F) genetische Parameter der Stichprobengröße (N), dem Anteil von R. ridibunda (%_RID) und R. perezi (%_PER). Die genetischen Parameter sind fett markiert. P = Polymorphie, A = Allelzahl, A_p = Allelzahl an polymorphen Loci, H_o = Heterozygotie. Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab. = Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität. (über alle Loci)

genetische Parameter über alle Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
N		-0,73		-0,59		-0,75		-0,79
P		0,86	A	0,53	A_p	0,683	H_o	-0,59
%_RID		0,84		0,92		0,79		0,75
%_PER		-0,09		-0,17		-0,09		-0,15
Erkl. Variab.		2,00		1,49		1,67		1,56
Anteil Ges.		0,50		0,37		0,42		0,39

genetische Parameter über diagnostische Loci						
	F	FL	F	FL	F	FL
N		0,78		0,78		0,76
A		0,53	A_p	0,53	H_o	0,72
%_RID		-0,75		-0,75		-0,75
%_PER		-0,26		-0,26		-0,22
Erkl. Variab.		1,51		1,51		1,70
Anteil Ges.		0,38		0,38		0,42

Appendix 4: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. ridibunda* mit den Faktoren (F) genetische Parameter der Stichprobengröße (N), dem Anteil von *R. grafi* (%_GRA) und *R. perezi* (%_PER). Die genetischen Parameter sind fett markiert. P = Polymorphie, A = Allelzahl, Ap = Allelzahl an polymorphen Loci, Ho = Heterozygotie. Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab. = Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

genetische Parameter über alle Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
N		-0,96		-0,97		-0,94		-0,98
A		0,46	P	0,83	Ap	-0,38	Ho	0,58
%_GRA		0,89		0,89		0,91		0,91
%_PER		0,86		0,83		0,86		0,80
Erkl. Variab.		2,65		3,12		2,61		2,75
Anteil Ges.		0,66		0,78		0,65		0,69

genetische Parameter über diagnostische Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
N		-0,95		-0,95		-0,94		-0,97
A		0,635	P	0,588	Ap	-0,46	Ho	0,24
%_GRA		0,87		0,85		0,91		0,92
%_PER		0,86		0,89		0,85		0,84
Erkl. Variab.		2,81		2,76		2,66		2,55
Anteil Ges.		0,70		0,69		0,66		0,64

Appendix 5: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. perezi* mit den Faktoren (F) genetische Parameter der Stichprobengröße (N), dem Anteil von *R. ridibunda* (%_RID) und *R. grafi* (%_GRA). Die genetischen Parameter sind fett markiert. P = Polymorphie, A = Allelzahl, Ap = Allelzahl an polymorphen Loci, Ho = Heterozygotie. Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab. = Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

genetische Parameter über alle Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
N		-0,19		-0,46		-0,36		0,47
P		0,53	A	-0,20	Ap	0,23	Ho	-0,66
%_RID		-0,83		-0,69		-0,77		0,65
%_GRA		0,90		0,99		0,96		-0,94
Erkl. Variab.		1,82		1,70		1,71		1,96
Anteil Ges.		0,46		0,42		0,43		0,49

genetische Parameter über diagnostische Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
N		-0,41		-0,42		-0,39		-0,50
P		0,25	A	0,33	Ap	-0,31	Ho	0,66
%_RID		-0,72		-0,70		-0,74		-0,61
%_GRA		0,97		0,97		0,96		0,94
Erkl. Variab.		1,70		1,72		1,71		1,94
Anteil Ges.		0,42		0,43		0,43		0,48

Appendix 6: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. grafi* mit den Einzelfaktoren (F) PG bzw.- totale Introgression (Total; fett markiert), der Distanz zum Nullpunkt N2 (GEO), der Entfernung zu PGR-Populationen (RIDPOP) und dem Anteil von *R. perezii* (%_PER) und *R. ridibunda* (%_RID). Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab.= Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

	F	FL	F	FL
%_RID		0,71		-0,70
%_PER		-0,42		0,47
GEO		-0,83		0,82
RIDPOP		-0,84		0,83
PG		0,64	Total	-0,73
Erkl. Variab.		2,48		2,61
Anteil Ges.		0,50		0,52

Appendix 7: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. perezii* mit den Einzelfaktoren (F) PG bzw.- totale Introgression (Total; fett markiert), der Distanz zum Nullpunkt N2 (GEO), der Entfernung zu PGR-Populationen (RIDPOP) und dem Anteil von *R. grafi* (%_GRA) und *R. ridibunda* (%_RID). Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab.= Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

	F	FL	F	FL
%_RID		-0,03		-0,15
%_GRA		-0,44		-0,35
GEO		0,94		0,94
RIDPOP		0,92		0,95
PG		-0,72	Total	-0,73
Erkl. Variab.		2,45		2,45
Anteil Ges.		0,49		0,49

Appendix 8: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. ridibunda* mit den Einzelfaktoren (F) PG bzw. - totale Introgression (Total; fett markiert), der Distanz zum Nullpunkt N1 (GEO), dem Anteil von *R. grafi* (%_GRA) und *R. perezi* (%_PER). Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab. = Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

	F	FL	F	FL
%_GRA		0,76		0,70
%_PER		0,90		0,90
GEO		0,75		0,79
PG		0,88	Total	0,84
Erkl. Variab.	2,72			2,63
Anteil Ges.	0,68			0,66

Appendix 9: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. perezi* mit den Faktoren, genetische Parameter, der Distanz zu N2 (GEO), der Entfernung zu PGR-Populationen (RIDPOP), der PG-Introgression (PG) und der totalen Introgression (Total), dem Anteil von *R. grafi* (%_GRA) und *R. ridibunda* (%_RID). Die genetischen Parameter sind fett markiert. P = Polymorphie, A = Allelzahl, Ap = Allelzahl an polymorphen Loci, Ho = Heterozygotie. Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab. = Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

genetische Parameter über alle Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
P		0,23	A	0,04	Ap	-0,31	Ho	0,67
%_RID		0,11		0,16		0,18		0,05
%_GRA		0,36		0,33		0,31		0,41
GEO		-0,85		-0,86		-0,87		-0,79
RIDPOP		-0,86		-0,89		-0,89		-0,80
PG		0,85		0,85		0,82		0,89
Total		0,86		0,85		0,84		0,88
Erkl. Variab.	3,13			3,10		3,16		3,44
Anteil Ges.	0,45			0,44		0,45		0,49

Appendix 10: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. grafi* mit den Faktoren, genetische Parameter, der Distanz zu N2 (GEO), der Entfernung zu PGR-Populationen (RIDPOP), der PG-Introgression (PG) und der totalen Introgression (Total), dem Anteil von *R. ridibunda* (%_RID) und *R. perezi* (%_PER). Die genetischen Parameter sind fett markiert. P = Polymorphie, A = Allelzahl, Ap = Allelzahl an polymorphen Loci, Ho = Heterozygotie. Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab. = Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

genetische Parameter über alle Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
P		0,70	A	0,60	Ap	0,53	Ho	0,23
%_RID		0,87		0,82		0,83		0,80
%_PER		-0,34		-0,35		-0,36		-0,37
GEO		-0,64		-0,71		-0,67		-0,77
RIDPOP		-0,64		-0,70		-0,67		-0,77
PG		0,71		0,71		0,75		0,67
Total		0,82		0,77		0,78		0,73
Erkl. Variab.		3,36		3,25		3,18		3,00
Anteil Ges.		0,48		0,46		0,45		0,43

Appendix 11: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für *R. ridibunda* mit den Faktoren, genetische Parameter, der Distanz zu N1 (GEO), der PG-Introgression (PG) und der totalen Introgression (Total), dem Anteil von *R. grafi* (%_GRA) und *R. perezi* (%_PER). Die genetischen Parameter sind fett markiert. P = Polymorphie, A = Allelzahl, Ap = Allelzahl an polymorphen Loci, Ho = Heterozygotie. Faktorenladungen (FL) über 0,70 sind rot/fett markiert. Erkl. Variab. = Erklärte Variabilität; Anteil Ges. = Anteil an der Gesamtvariabilität.

genetische Parameter über alle Loci								
	F	FL	F	FL	F	FL	F	FL
P		0,85	A	0,61	Ap	-0,43	Ho	0,58
%_GRA		0,69		0,64		0,67		0,68
%_PER		0,83		0,83		0,86		0,82
GEO		0,72		0,69		0,82		0,73
PG		0,95		0,97		0,90		0,95
Total		0,88		0,92		0,85		0,89
Erkl. Variab.		4,09		3,73		3,57		3,70
Anteil Ges.		0,68		0,62		0,60		0,62

Appendix 10: Allelfrequenzen der polymorphen Loci von *R. grafi*. Angegeben sind die Populationsnummern (1. Zeile; Abb. 3-1) und die Stichprobengröße (N; 2. Zeile).

Population	7	21	13	16	23	17
(N)	16	7	16	29	25	22
CK						
A	.500	.357	.500	.483	.500	.500
B	.500	.643	.500	.517	.500	.500
αGDH						
A	.500	.500	.500	.517	.500	.500
B	.500	.500	.500	.483	.500	.500
GAPD						
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.071	.000	.000	.000	.000
C	.500	.500	.500	.500	.480	.500
D	.500	.429	.500	.481	.520	.500
E	.000	.000	.000	.019	.000	.000
LDH-b						
A	.000	.071	.000	.017	.040	.000
B	.531	.429	.500	.483	.460	.500
C	.000	.000	.000	.017	.020	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.469	.429	.500	.483	.480	.500
F	.000	.071	.000	.000	.000	.000
G	.000	.000	.000	.000	.000	.000
H	.000	.000	.000	.000	.000	.000
MPI						
A	.500	.500	.469	.483	.460	.500
B	.500	.500	.531	.517	.540	.500
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000
MPR-2						
A	.563	.500	.500	.500	.500	.500
B	.000	.000	.000	.034	.000	.000
C	.438	.500	.500	.466	.500	.500
PGM						
A	.000	.071	.000	.000	.000	.000
B	1.000	.929	.969	1.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.031	.000	.000	.000
AHH						
A	.500	.643	.467	.500	.560	.500
B	.500	.357	.533	.500	.440	.500
FH						
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	.980	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.020	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000
PGI						
A	.344	.429	.406	.345	.060	.432
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.656	.571	.594	.655	.940	.568
6PGDH						
A	.000	.214	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.500	.429	.500	.500	.500	.523
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.500	.286	.500	.500	.500	.477
F	.000	.071	.000	.000	.000	.000
GOT 2						
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.563	.500	.563	.655	.600	.523
C	.438	.500	.438	.345	.400	.477
GOT 1						
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
IDH 1						
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.071	.094	.000	.000	.068
C	.000	.000	.031	.000	.020	.000
D	1.000	.929	.875	1.000	.980	.932
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000
IDH 2						
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LPR						
A	.031	.000	.000	.000	.000	.028
B	.938	1.000	.969	.931	.940	.944
C	.031	.000	.031	.069	.060	.028

Population	5	22	1	2	8	12	9
Locus (N)	17	25	16	21	20	15	12
CK							
A	.500	.480	.531	.500	.500	.500	.500
B	.500	.520	.469	.500	.500	.500	.500
αGDH							
A	.500	.500	.531	.500	.500	.500	.500
B	.500	.500	.469	.500	.500	.500	.500
GAPD							
A	.000	.040	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.140	.000	.000	.000	.071	.000
C	.471	.500	.500	.500	.550	.500	.500
D	.500	.300	.500	.500	.450	.429	.458
E	.029	.020	.000	.000	.000	.000	.042
LDHb							
A	.000	.000	.000	.000	.050	.000	.000
B	.500	.500	.500	.500	.450	.500	.583
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.500	.500	.500	.500	.500	.500	.417
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
G	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
H	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
MPI1							
A	.059	.480	.438	.500	.450	.429	.500
B	.941	.520	.469	.500	.550	.536	.500
C	.000	.000	.094	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.036	.000
MPR2							
A	.500	.500	.500	.500	.500	.500	.500
B	.000	.000	.000	.000	.000	.036	.000
C	.500	.500	.500	.500	.500	.464	.500
PGM							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.929	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.071	.000
AHH							
A	.500	.500	.533	.525	.444	.462	.550
B	.500	.500	.467	.475	.556	.538	.450
FH							
A	.000	.000	.000	.024	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	.938	.976	1.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	.063	.000	.000	.000	.000
PGI							
A	.000	.460	.031	.000	.300	.179	.375
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	1.000	.540	.969	1.000	.700	.821	.625
6PGDH							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.500	.696	.500	.500	.475	.571	.500
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.304	.000	.000	.525	.429	.500
F	.500	.000	.500	.500	.000	.000	.000
GOT2							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.500	.500	.750	.786	.500	.500	.542
C	.500	.500	.250	.214	.500	.500	.458
GOT1							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.036	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.964	1.000
IDH1							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.020	.063	.095	.025	.000	.042
C	.000	.340	.156	.000	.025	.143	.000
D	1.000	.640	.781	.905	.950	.857	.958
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
IDH2							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LPR							
A	.029	.000	.063	.000	.000	.000	.000
B	.824	.980	.938	1.000	.950	1.000	.917
C	.147	.020	.000	.000	.050	.000	.083
Population							
Population	24	19	18	15	14	11	20
(N)	18	37	29	8	54	27	19
CK							
A	.500	.500	.500	.500	.500	.481	.500
B	.500	.500	.500	.500	.500	.519	.500
αGDH							
A	.500	.500	.500	.563	.500	.481	.500
B	.500	.500	.500	.438	.500	.519	.500

GAPDH							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.438	.009	.019	.000
C	.389	.541	.500	.500	.500	.500	.500
D	.583	.459	.500	.063	.491	.481	.500
E	.028	.000	.000	.000	.000	.000	.029

LDHb							
A	.028	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.472	.500	.517	.500	.500	.500	.528
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.500	.500	.483	.438	.500	.500	.474
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
G	.000	.000	.000	.063	.000	.000	.000
H	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

MPI1							
A	.444	.473	.500	.438	.491	.426	.500
B	.556	.527	.500	.563	.509	.574	.500
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.028
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

MPR2							
A	.500	.500	.517	.438	.500	.611	.526
B	.000	.000	.000	.000	.019	.000	.000
C	.500	.500	.483	.563	.500	.370	.474

PGM							
A	.000	.014	.000	.063	.009	.000	.000
B	1.000	.986	1.000	.938	.991	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

AHH							
A	.500	.484	.482	.500	.500	.553	.472
B	.500	.516	.518	.500	.500	.447	.500

FH							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	.981	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	.000	.000	.019	.000	.000

PGI							
A	.250	.311	.345	.250	.278	.407	.395
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.750	.689	.655	.750	.722	.593	.605

6PGDH							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.500	.527	.500	.813	.500	.519	.579
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.028
E	.500	.473	.500	.188	.500	.481	.444
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.028

GOT2							
A	.000	.000	.000	.063	.000	.000	.000
B	.556	.608	.534	.688	.519	.556	.474
C	.444	.392	.466	.250	.481	.444	.526

GOT1							
A	.000	.014	.000	.000	.028	.000	.000
B	1.000	.986	1.000	1.000	.972	1.000	1.000

IDH1							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.028	.068	.034	.063	.037	.000	.056
C	.028	.054	.000	.000	.009	.037	.053
D	.917	.878	.966	.938	.954	.963	.947
E	.028	.000	.000	.000	.000	.000	.000

IDH2							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

LPR							
A	.000	.000	.000	.000	.019	.000	.000
B	.972	.946	1.000	.938	.978	.926	1.000
C	.028	.054	.000	.063	.022	.056	.028

Appendix 11: Allelfrequenzen der polymorphen Loci von *R. perezii* und *R. ridibunda*. Angegeben sind die Populationsnummern (1. Zeile; Abb. 3-1) und die Stichprobengröße (N; 2. Zeile)

<i>R. perezii</i> >							
(N)	7	21	23	17	6	3	1
	10	6	10	3	4	37	10

CK							
A	1.000	.958	1.000	1.000	1.000	.932	1.000
B	.000	.042	.000	.000	.000	.000	.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.068	.000

α GDH							
A	.000	.000	.000	.500	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	.500	1.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

GAPD							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.119	.000	.333	.500	.054	.000
C	1.000	.881	1.000	.667	.500	.946	1.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

LDHb							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.167	.000	.000	.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	1.000	1.000	1.000	.833	1.000	1.000	1.000
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
G	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

MPI1							
A	.000	.021	.000	.167	.000	.000	.000
B	1.000	.979	1.000	.833	1.000	.905	.950
C	.000	.000	.000	.000	.000	.095	.050
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

MPR2							
A	.950	.958	1.000	.833	1.000	1.000	1.000
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	.050	.042	.000	.167	.000	.000	.000

PGM							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

AHH							
A	.000	.130	.111	.000	.000	.000	.000
B	1.000	.870	.889	1.000	1.000	1.000	1.000

FH							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.050	.056
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.950	.944
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

PGI							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

6PGDH							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.042	.050	.000	.000	.000	.000
C	.950	.958	.950	1.000	.667	1.000	1.000
D	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
E	.050	.000	.000	.000	.333	.000	.000
F	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

GOT2							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.050	.083	.050	.000	.000	.568	.450
C	.950	.917	.950	1.000	1.000	.432	.550

GOT1							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	1.000	.958	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
C	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
D	.000	.042	.000	.000	.000	.000	.000

IDH1							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
B	.000	.063	.100	.000	.000	.068	.050
C	.000	.000	.150	.000	.000	.000	.056
D	1.000	.938	.750	1.000	1.000	.932	.950
E	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000

IDH2							
A	.000	.000	.000	.000	.000	.095	.000
B	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.905	1.000

