

„Auswirkungen des Klimawandels auf die klein- und
großräumige genetische Populationsstruktur von
Makrozoobenthos in Rhein, Main und Mosel“

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz



Dennis Hidde
geb. in Neuwied

Mainz, Mai 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klimawandel allgemein	1
1.2 Auswirkungen auf ökologische Systeme	1
1.3 Neozoen	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit	5
2. Material und Methode	9
2.1 Tierarten und Untersuchungsgebiete	9
2.1.1 Biologie und Verbreitung von <i>Dreissena polymorpha</i>	9
2.1.2 Biologie und Verbreitung von <i>Dikerogammarus villosus</i>	13
2.1.3 Untersuchungsgebiet	15
2.2 Stichprobennahme	20
2.2.1. Stichprobennahme Bruttig-Fankel	20
2.3 Gewebe-Entnahme und DNA – Extraktion	22
2.3.1 <i>Dreissena polymorpha</i>	22
2.3.2 <i>Dikerogammarus villosus</i>	22
2.4 Die AFLP-Methode	23
2.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	24
2.5.1 Prinzip der Polyacrylamidgel – Elektrophorese.....	24
2.5.2 Der Geleffekt.....	25
2.5.3 Vorbereitung der Proben	26
2.5.4 Durchführung der Gel – Elektrophorese	26
2.5.5 Auswertung der Gele.....	27
2.6 Methoden der statistischen Auswertung.....	28
2.6.1 Verwendete Computerprogramme	28
2.6.1.1 Paup 4.0b10 (PPC/AltiVec)	28
2.6.1.2 AFLP-SURV 1.0 (VEKEMANS 2002)	28
2.6.1.3 PYLIP 3.66 (Felsenstein 2006)	29
2.6.1.4 BAPS 3.2 (Bayesian Analysis of Population Structure)	30
2.6.1.5 Microsoft EXCEL 2007 V. 12.0.6024.5000	30
2.6.1.6 DistCalc V. 1.2 (LOHNINGER 2002).....	30
2.6.1.7 TFPGA V1.3 (Miller 1997).....	31
2.6.2 Verwendete Statistik	31
2.6.2.1 t-Test.....	31
2.6.2.2 ANOVA.....	31
2.6.2.3 F-Test.....	31
2.6.2.4 Binomialtest.....	32
2.6.2.5 F_{ST}	32

Inhaltsverzeichnis

3. Ergebnisse	33
3.1 Kleinräumige Untersuchungen	33
3.1.1 Analyse auf Basis von Individuen.....	33
3.1.2 Analyse auf Basis von Subpopulationen.....	37
3.1.2.1 Bruttig-Fankel.....	43
3.2 Mittel- und großräumige Untersuchungen.....	45
3.2.1. Ergebnisse Admixture-Analyse	45
3.2.1.1 <i>Dreissena polymorpha</i>	45
3.2.1.2 <i>Dikerogammarus villosus</i>	49
3.2.2 Phenogramme aus AFLPSurv	51
3.2.2.1 <i>Dreissena polymorpha</i>	51
3.2.2.2 <i>Dikerogammarus villosus</i>	54
4. Diskussion	58
4.1 Kleinräumige Untersuchungen	58
4.1.1 Analyse auf Basis von Individuen.....	58
4.1.2 Analyse auf Basis von Subpopulationen.....	59
4.1.2.1 Wright's Fixations-Index F_{ST}	62
4.1.2.2 Bruttig-Fankel.....	63
4.2 Mittel- und großräumige Untersuchungen.....	65
4.2.1 Admixture-Analyse	65
4.2.2 Phenogramme aus AFLPSurv	67
4.2.2.1 <i>Dreissena polymorpha</i>	67
4.2.2.1 <i>Dikerogammarus villosus</i>	69
4.3 Eignung der Spezies als Modellorganismen.....	70
4.4 Auswirkungen des Klimawandels auf die zukünftige genetische Struktur von Makrozoobenthos	73
5. Zusammenfassung	77
6. Literaturverzeichnis	79
7. Anhang	90

1. Einleitung

1.1 Klimawandel allgemein

In den letzten Jahrzehnten wurde eine deutliche und schnelle Veränderung des globalen Klimas beobachtet. Es wird allgemein angenommen, dass eine der wesentlichen Ursachen dafür menschliche Aktivitäten sind. Die Eintragung von Treibhausgasen und Aerosolen durch die Verbrennung fossiler Brennstoffe in die Atmosphäre sowie die mit intensiver Landnutzung einhergehende Abholzung von Waldgebieten sind die Hauptverursacher des Treibhauseffekts, der eine globale Erwärmung verursacht (VITOUSEK 1992): Es wird prognostiziert, dass im Zeitraum von 1990 bis 2100 die globale durchschnittliche Oberflächentemperatur um bis zu 5,8°C steigen wird (IPCC 2001); bereits in den letzten 100 Jahren stieg die Temperatur um 0,6°C (WALTHER *et al.* 2002). Insbesondere ist eine Verschiebung von gegebenen Klimazonen in Nordrichtung und (in alpinen Gebieten) höhere Höhenstufen zu beobachten. Abhängig vom lokalen Klima werden noch zusätzliche Veränderungen wie wärmere Winter, erhöhte Niederschlagsmengen und häufigeres Auftreten von Extremereignissen eintreten (IPCC 2001). Damit gehen gravierende Umweltveränderungen einher, die starke Auswirkungen auf die Fauna und Flora unseres Planeten haben.

1.2 Auswirkungen auf ökologische Systeme

Eine Vielzahl neuerer Studien zeigt, dass Auswirkungen des sich verändernden Klimas auf ökologische Systeme bereits nachweisbar sind (MCCARTHY 2001): Die Verschiebung der Klimazonen führt für viele Spezies aus gemäßigten Klimazonen zu einer Ausdehnung besiedelbarer Habitate nordwärts und in höher gelegene Gebiete, wobei sie in Konkurrenz mit subarktischen und arktischen sowie montanen Arten treten, deren Lebensraum dadurch schrumpft; meist sind nämlich die speziell angepassten Spezies dieser Habitate den Invasoren unterlegen und werden durch sie verdrängt, was im Extremfall zu schneller Extinktion führt (PARMESAN 2006).

Frühere Arbeiten wiesen bereits auf die Möglichkeit einer mikroevolutionären Anpassung von Tier- und Pflanzenarten an den Klimawandel hin (HOLT 1990); seitdem häufen sich die Hinweise anhaltender Veränderungen, die eng mit den veränderten Klimabedingungen korrelieren.

Ein sehr gut untersuchter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Phänologie vieler Pflanzen und Tiere. Diese beschreibt im Jahresablauf periodisch wiederkehrende Entwicklungsgänge, die vom Einfluss der Witterung und des Klimas abhängen. Hier sind in allen gut untersuchten marinen, limnischen und terrestrischen Gruppen Veränderungen festzustellen, die einen starken Zusammenhang mit den beobachteten lokalen Klimaänderungen zeigen (PARMESAN 2006).

BRADSHAW & HOLZAPFEL (2006), MCCARTHY (2001) und PARMESAN (2006) führen eine ganze Reihe von Beispielen auf, in denen Tier- und Pflanzenarten bedingt durch ansteigende Temperaturen früher in die Fortpflanzungsphase eintreten; viele Vogelspezies (so z.B. *Sylvia atricapilla* oder *Parus Major*) brüten früher im Jahr, die gut untersuchten Kirschbäume in Japan blühen seit 1952 immer früher (MENZEL & DOSE 2005). Viele weitere Arbeiten mit Meeresfischen (LECOMPTE *et al.* 2004), Fröschen (BEEBEE 1995), Insekten (BRADSHAW & HOLZAPFEL 2001, LEVITAN & ETGES 2005) und anderen Arthropoden (LLEWELLYN *et al.* 2003) zeigen, dass der Klimawandel tiefgreifende Auswirkungen auf die verschiedensten Spezies hat.

Obwohl die rein phänologischen Untersuchungen im Vordergrund stehen (PARMESAN 2006), gibt es auch Arbeiten, die sich mit den genetischen Auswirkungen beschäftigen (DAVIS *et al.* 2005). RÉALE *et al.* (2003) untersuchten eine Rothörnchen-Population (*Tamiasciurus hudsonicus*) in Kanada und fanden eine Vorverlegung der Brutphase um 18 Tage innerhalb von 10 Jahren. Hierbei spielt - wie auch bei den Vögeln - die frühere Nahrungsverfügbarkeit eine Rolle. Genauere Analysen zeigten, dass phänotypische Plastizität, also die reine Anpassungsfähigkeit der einzelnen Individuen, nur zu 62% für die deutliche Vorverlegung verantwortlich zu machen war; zu 13% war der Grund in „mikroevolutionärer Veränderung“ zu suchen (BERTEAUX *et al.* 2004).

Direkte Vergleiche von *Drosophila*-Populationen in Nord-Amerika zeigten, dass bestimmte Genotypen, die an wärmere Umweltbedingungen adaptiert waren, im Jahr 2002 in New York Genotyp-Frequenzen erreichten, wie sie noch 1946 im weit südlicher gelegenen Missouri zu finden waren (LEVITAN & ETGES 2005). Hier gelang also der Nachweis, dass die Klimaerwärmung einen direkten Einfluss auf die genetische Struktur von großen, gut untersuchten Populationen hat.

Für limnische Systeme sind solche Arbeiten rar (PARMESAN 2006); ein Grund dafür ist möglicherweise darin zu suchen, dass offensichtliche ökologische Auswirkungen in diesen

Habitaten noch nicht so ausgeprägt wie in terrestrischen und auch schwerer zu beobachten sind.

Ganz allgemein lässt sich sagen, dass in den gemäßigten Klimazonen die oben genannten Konsequenzen des Klimawandels, wie der Trend zu wärmeren Wintern mit erhöhtem Niederschlag, heißeren Sommern und häufiger auftretenden Extremwetter-Ereignissen, unmittelbare Auswirkungen auf hydrologische Systeme haben wird (WATSON *et al.* 1998). Modelle zur Abschätzung der Konsequenzen des Klimawandels auf diese hydrologischen Systeme wurden bereits entwickelt (LEAVESLEY 1994); neuere Arbeiten befassen sich mit der genauen Analyse und Vorhersage der Veränderungen in Bezug auf die Abflussregime einzelner Flüsse (ARORA & BOER 2001) sowie möglicher Extremereignisse wie Überflutungen oder Niedrigwasser (MIDDELKOOP *et al.* 2001).

In diesem Zusammenhang interessant ist der Rhein: durch die wärmeren Winter geht der Niederschlag in alpinen Gebieten seltener als Schnee nieder bzw. schmilzt schneller. Zudem steigt die Gesamtniederschlagsmenge in den Wintermonaten, sodass die Pegelstände des Rheins im Winter immer öfter Höchstwerte erreichen. Heißere und trockenere Sommer führen zu einer erhöhten Evapotranspiration; die geringeren im Winter gefallenen Schneemengen verursachen in den Sommermonaten zusätzlich eine Abnahme an Schmelzwasser aus den Alpen, so dass es zu extrem niedrigen Wasserständen kommen kann (MIDDELKOOP *et al.* 2001). Dies steht im Kontrast zum bisher vorherrschenden Abflussregime des Rheins (Abb.3), bei dem in den Sommermonaten durch Schmelzwasser aus den Alpen eine hohe Abflussmenge gewährleistet ist. KWADIJK & ROTMANS (1995) postulieren eine Änderung des Abflussregimes im Rhein weg von einem schmelzwasser-dominierten zu einem überwiegend grundwassergespeisten Fluss. Anders als bei den grundwassergespeisten Flüssen Mosel und Main werden die schwankenden Pegelstände nicht durch Staustufen abgemildert werden können, da diese über weite Bereiche des Rheins nicht vorhanden sind.

Stark schwankende Abflussmengen und extreme Pegelstände sind also zu erwarten und werden häufiger und schwerwiegender sein als in der Vergangenheit. Die Auswirkungen solcher Extremereignisse auf lotische Ökosysteme waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (POFF 1991, CARPENTER *et al.* 1992), drangen jedoch nicht bis zur genetischen Ebene einzelner Spezies vor. Anders als bei terrestrischen Populationen ist hier also die Möglichkeit eines Effekts der gegenwärtigen Klimaveränderungen auf die genetische Struktur bestimmter Spezies nicht gut untersucht.

1.3 Neozoen

Die veränderten Klimabedingungen können einer der Faktoren sein, die zu einer Verbreitung invasiver Spezies in ein neues Gebiet beitragen. Hauptsächlich jedoch sind absichtliche oder zufällige Verschleppungen durch den Menschen der Grund für eine Neubesiedlung; in Flusssystemen sind hier vor allem die Schifffahrt und die Erschließung neuer Schifffahrtswege, z.B. der Bau von Kanälen, zu nennen. Eine genaue Beobachtung des Besiedlungsverlaufs solcher Invasionen trägt wesentlich zum Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen bei (WILSON *et al.* 1999, MÜLLER 2001b) und bietet die Möglichkeit zur Beantwortung der unterschiedlichsten Fragen in bezug auf die Auswirkungen auf die genetische Struktur der untersuchten Populationen.

Im Bereich der mitteleuropäischen Flusssysteme kommen viele invasive Spezies mit unterschiedlich langer Besiedlungsdauer vor, deren Einwanderungsrouten aus ihren Ursprungsgebieten bekannt und die z.T. in hohen Abundanzen über verschiedene Flüsse verbreitet sind. Hier bietet sich die Möglichkeit, mit molekulargenetischen Methoden sowohl phylogeographischen Fragestellungen nachzugehen, als auch genetische Adaptationsvorgänge an unterschiedliche Umweltbedingungen zu untersuchen.

Zu den erfolgreichsten Neozoen in deutschen Flüssen zählen Amphipoden (*Gammarus sp.*, *Corophium sp.*) und Mollusken (*Dreissena sp.*). Manche sind bereits seit vielen Jahrzehnten eingewandert (*Dreissena polymorpha*), andere hingegen finden sich erst seit wenigen Jahren (*Dikerogammarus villosus*, NESEMANN *et al.* 1995) oder beginnen erst mit der Besiedlung (*Dreissena rostriformis bugensis*, VAN DER VELDE & PLATVOET 2007). Diese Spezies bieten sich als Untersuchungsobjekt an und sind durch viele Arbeiten gut verstanden (NEHRING 1999; DICK *et al.* 2002; THERRIAULT *et al.* 2005). Durch die gute Datenbasis ist es möglich, mit Hilfe dieser Spezies Fragestellungen im Kontext der oben angeführten klimabedingten Veränderungen zu formulieren.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage untersucht werden, ob sich die Veränderungen der Umwelt bzw. deren abiotischer Faktoren durch den Klimawandel in der genetischen Populations-Struktur zweier Spezies nachweisen lassen.

Als molekulargenetische Methode wurde dazu die Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-Analyse ausgewählt. Diese Methode hat den Vorteil, kein Vorwissen über das Genom der untersuchten Spezies und keine speziell entwickelten Primer zu erfordern, so dass das Verfahren relativ schnell und preiswert angewandt werden kann. Zudem ist es aufgrund der erzielten großen Anzahl an genetischen Markern sehr empfindlich und daher zum Nachweis geringer genetischer Unterschiede gut geeignet. Dies ist in dieser Untersuchung von großem Vorteil, da kleinste Unterschiede räumlich teilweise nahe beieinanderliegender Populationen nachgewiesen werden sollen.

Dazu werden Populationen bzw. Subpopulationen der Spezies *Dreissena polymorpha* PALLAS 1771 sowie *Dikerogammarus villosus* SOWINSKI 1894 untersucht. Diese Spezies bieten sich an, da sie im Untersuchungsgebiet zuverlässig abundant sind, und weil sie sich hinsichtlich vieler wichtiger Eigenschaften unterscheiden, die einen direkten Vergleich interessant machen. Zunächst ist hier die stark unterschiedliche Besiedlungsdauer im Untersuchungsgebiet zu nennen: *D. polymorpha* wanderte bereits im 19. Jahrhundert ein (Kap. 2.1.1), während *D. villosus* erst vor wenigen Jahren folgte und dabei eine andere Einwanderungsrouten nutzte (Kap. 2.1.2). Des Weiteren unterscheiden sich beide stark in ihrer Fortpflanzungs- und Verbreitungsstrategie (Kap.2.1).

Da die Erwärmung des Klimas und die damit einhergehende Veränderung der Umwelt relativ schleichend erfolgt, ist ein *direkter* Nachweis von Effekten auf die genetische Struktur von Populationen nur über einen Analysezeitraum von vielen Jahren oder Jahrzehnten möglich. Dies hätte den Rahmen und die Möglichkeiten der vorliegenden Arbeit gesprengt. Das Problem wurde gelöst, indem Entnahmestellen mit Umweltparametern ausgewählt wurden, die die postulierten Entwicklungen widerspiegeln, die aufgrund des Klimawandels zu erwarten sein werden. Diese Vorgehensweise hat den weiteren Vorteil, dass so mögliche Veränderungen im Genpool über die Zeit ausgeschlossen werden können, die dann evtl. nicht im Zusammenhang mit dem Klimawandel stehen.

Wie beschrieben, werden Extremereignisse wie Hochwasser häufiger vorkommen, und durch erhöhten Niederschlag wird sich die Strömungsgeschwindigkeit speziell in den Wintermonaten sowohl in den schmelzwasser – wie auch in den grundwassergespeisten Flüssen erhöhen; damit einher geht eine stärkere Verwirbelung des Wassers mit erhöhter Sauerstoffanreicherung. Im Kontrast dazu stehen Perioden mit niedrigen Wasserständen, langsamer Strömungsgeschwindigkeit und geringem Sauerstoffgehalt. Diese gegensätzlichen abiotischen Faktoren können theoretisch zu einem selektiven Druck führen, der sich auf die genetische Struktur auswirkt.

Um diese Umweltbedingungen möglichst exakt nachvollziehen zu können, wurden die Entnahmestellen in den Flüssen unmittelbar unterhalb und oberhalb von Staustufen gewählt. Hier trifft man im Abstand von nur wenigen Metern auf kontrastierende Bedingungen in bezug auf Strömungsgeschwindigkeit und Durchwirbelung, wobei alle anderen Faktoren (Wasserqualität, Temperatur, pH-Wert, Substrat, Verunreinigung usw.) unverändert bleiben. Dadurch erweist es sich als ideales „Modell“ zur Nachbildung der gesuchten Umweltbedingungen.

Finden sich hier signifikante Unterschiede in der genetischen Struktur, so lässt sich schlussfolgern, dass diese Unterschiede durch die kontrastierenden Strömungsverhältnisse verursacht sein müssen. Dadurch ließen sich direkte Schlussfolgerungen auf die Auswirkungen zukünftiger klimatischer Veränderungen ziehen. Da der Selektionsdruck bei *D. polymorpha* aufgrund ihrer Fortpflanzungsstrategie immer nur auf die aktuelle Generation wirken kann (Juvenile werden als Larven immer flussabwärts verdriftet, siehe Kap.2.1.1), erwartet man hier weniger signifikante Auswirkungen als bei *D. villosus*, der über mehrere Generationen in einem Habitat verweilen kann und zudem den kürzeren Reproduktionszyklus hat (Kap.2.1.2).

Sind keine Muster erkennbar, so kann dies darauf zurückzuführen sein, dass die phänotypische Plastizität der Spezies groß genug ist, um sämtliche untersuchten Umweltbedingungen abzudecken, also kein Selektionsdruck wirkt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass ständige Neubesiedlung (Migration) in großer Zahl vorhandene lokale Muster verdeckt. Diese Möglichkeit besteht vor allem bei *D. polymorpha*, deren Larven in hoher Zahl angeschwemmt werden können.

Eine der tiefgreifendsten Vorhersagen zukünftiger Auswirkungen des Klimawandels speziell für den Rhein ist seine Änderung des Abflussregimes von schmelzwasser- zu grundwasserdominiert. Dies wird neben den besprochenen Effekten weitere Konsequenzen

für die Wasserqualität wie z.B. die Belastung mit Stickstoff durch die Landwirtschaft oder die Konzentration von Mineralstoffen usw. haben. Daher bietet es sich an, die Populationen von grundwassergespeisten Flüssen mit denen aus dem Rhein zu vergleichen. Hierzu wurden die Flüsse Main und Mosel ausgewählt, die beide in den Rhein münden. Ein Vergleich dieser Populationen zeigt, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Flüssen mit divergenten Abflussregimen besteht. Ist das der Fall, so sollten sich die Populationen der grundwassergespeisten Flüsse ähnlicher sein als im Vergleich mit denen aus dem Rhein; hierbei würde es sich also um eine Adaptation an das Abflussregime handeln. Im Folgenden wird diese Hypothese als „Adaptations-Szenario“ bezeichnet.

Eine Alternative dazu ist, dass die großräumige Populations-Struktur einem Muster folgt, welches auf die bekannten Einwanderungsrouten zurückgeführt werden kann. Wie in Kap. 2.1 ausführlich beschrieben, wanderte *D. polymorpha* hauptsächlich über eine nördliche Einwanderungsrouten den Rhein entlang ein und besiedelte von dort aus die Mosel und den Main; erst kürzlich begann eine Besiedlung über eine südliche Einwanderungsrouten über den Main-Donau-Kanal. Diese Route stand auch *D. villosus* offen, über die er zuerst den Main, anschließend den Rhein und zuletzt die Mosel erreichte. Wäre die genetische Struktur mit diesen geographisch-historischen Gegebenheiten in Übereinstimmung zu bringen, würde das auf eine Dominanz dieser Phylogeographie über die Adaptation an die Abflußsregime hinweisen. Diese Hypothese trägt im Weiteren daher die Bezeichnung „phylogeographisches Szenario“.

Aufgrund der langen Besiedlungsdauer von *D. polymorpha* steht zu vermuten, dass die Populationen lange genug Zeit hatten, um sich an die divergenten Umweltbedingungen der verschiedenen Abflussregime anzupassen. Wenn also überhaupt eine Adaptation stattfindet, so ist es wahrscheinlich, dass das phylogeographische Szenario keinen großen Einfluss mehr auf die genetische Struktur hat; in diesem Fall wird bei *D. polymorpha* ein Muster erwartet, das dem Adaptations-Szenario entspricht.

Die schnelle und erst kürzlich erfolgte Ausbreitung von *D. villosus* (Kap.2.1.2) ließ der potentiellen Ausbildung eines Musters nach dem Adaptations-Szenario weit weniger Zeit; das Ergebnis der Untersuchung erlaubt unter Umständen Aufschluss über die Geschwindigkeit, mit der sich eine solche Anpassung ausbilden kann. Auch im Hinblick auf das phylogeographische Szenario ist die Spezies ein interessantes Untersuchungsobjekt: durch die hohe Geschwindigkeit und den großen anthropomorphen Anteil an der Verbreitung ist auch die Möglichkeit der Ausbildung einer genetischen Struktur nach dem phylogeographischen

Szenario nicht so ausgeprägt. Die vorliegende Untersuchung wird versuchen zu zeigen, ob sich unter diesen Umständen überhaupt ein großräumiges Muster nachweisen lässt und wenn ja, welches von beiden den Einfluss des anderen dominiert.

Das Gesamtbild, welches sich aus diesen Analysen ergibt, wird Vorhersagen über die bisherigen und zukünftigen Auswirkungen des Klimawandels auf das Makrozoobenthos in den untersuchten Flüssen ebenso erlauben wie in Flüssen, in denen vergleichbare Änderungen postuliert werden bzw. bereits zu beobachten sind. Des Weiteren wirft es ein Licht auf die Verbreitungsstrategie der untersuchten Spezies; hier sind vor allem der Aspekt der äußerst schnellen Verbreitung von *D. villosus* und der anthropomorphe Anteil daran interessant. So kann unter Umständen zur Klärung der Frage beigetragen werden, wie groß die Rolle des Menschen bei der Verschleppung der Spezies über weite Entfernungen, meist durch Schifffahrt, ist. Dies kann wertvolle Hinweise zur weiteren Verbreitung dieser und anderer Neozoen liefern.

2. Material und Methode

2.1 Tierarten und Untersuchungsgebiete

2.1.1 Biologie und Verbreitung von *Dreissena polymorpha*



Abb. 1: *Dreissena polymorpha*, versch. Phänotypen

Foto: C. Braun 2007

Die Zebrauschel *Dreissena polymorpha* PALLAS 1771 (Abb.1) gehört zu der Familie der Dreissenidae (GRAY 1840) (Dreikantmuscheln), einer Ordnung der Eumellibranchiata (KINZELBACH 1992; JUNGBLUTH 1996). Sie kommt sowohl in lenticischen (stehenden) als auch lotischen (fließenden) Süßwasser-Gewässern vor (NEUMANN & JENNER 1992) und kann sich in ihren Subspezies auch in oligo- bis mesohalinen Gewässern ansiedeln (ORLOVA 2002). Sie ernährt sich filtrierend.

Ein interessanter Aspekt von *D. polymorpha* ist ihre häufige Verwendung als Bioindikator, z.B. als Frühwarnsystem von Wasserverschmutzungen. Zusätzlich zur Analyse von verschiedenen Gewebeteilen in bezug auf die Bioakkumulation verschiedener Schadstoffe wie z.B. Schwermetallen (LUSCHÜTZKY 2005; CAMUSSO *et al.* 2000; MERSCH *et al.* 1992) wird *D. polymorpha* auch lebend eingesetzt: Man nutzt die Tatsache, dass *D. polymorpha* sehr

empfindlich und durch Schließen ihrer Schalen auf neu auftretende Schadstoffbelastungen reagiert. RAJAGOPAL *et al.* (2003) zeigten, dass Chlorzugabe von 1mg/l Wasser eine sofortige Reaktion bei *D. polymorpha* hervorrief und die Schalen erst wieder geöffnet wurden, als die Chlorzugabe gestoppt wurde. Im Budapester Wasserwerk in Ungarn beispielsweise wird die Schalenöffnungsweite von mehreren Exemplaren von *D. polymorpha* permanent überwacht und bei auffälligem Verhalten (z.B. Schließen der Schalenhälften über längere Zeit) durch einen angeschlossenen Computer ein Alarm ausgelöst.

Dreissena polymorpha wird vier bis fünf, in Einzelfällen bis zu zehn Jahre alt (STANCZYKOWSKA 1977). Sie können dabei eine Schalenlänge von mehr als vier cm erreichen (eig. Beob.) Sie hat im Allgemeinen ein charakteristisches Streifen-Zickzack-Muster, jedoch kommen auch einheitlich dunkle oder helle Individuen vor. Selbst bei einem Individuum können die Muster von Jahr zu Jahr stark variieren (MARSDEN *et al.* 1995). Diese Variabilität ihrer Zeichnung hat ihr den Artnamen eingebracht. Eine Besonderheit von *Dreissena* sind die Byssusfäden, mit denen sie sich an das Substrat anheftet. Diese Byssusfäden werden von einer Byssusdrüse abgesondert, welche 100-200 Fäden produziert. Diese werden im Allgemeinen nicht mehr gelöst (obgleich *D. polymorpha* zum Auflösen und Neubilden der Byssusfäden in der Lage ist), so dass sie den Umweltbedingungen im einmal gewählten Habitat dauerhaft ausgesetzt ist.

Die Fortpflanzungszeit beginnt im Frühjahr durch einen Anstieg der Wassertemperaturen auf über 12°C und ist in drei Phasen gegliedert: Die erste Gametenabgabe vollzieht sich im April/Mai, die zweite beginnt vier Wochen später und endet Anfang August, die dritte August bis Ende September. Dabei entlassen die getrenntgeschlechtlichen Tiere ihre Gameten frei ins Wasser, wobei enorme Quantitäten erreicht werden: Die Weibchen geben bis ca. 1 Million Eier während eines Ablegevorgangs (SPRUNG 1991) ins Wasser ab, die Männchen bis zu 10 Milliarden Spermien. NEUMANN *et al.* (1993) berichten von 3 Ablegevorgängen pro Jahr zwischen Mai und September zu je 300.000-400.000 Eiern bei Individuen aus dem Fühlinger See bei Köln. Nach einer kurzen Ruhephase mit einer vorübergehenden Verkleinerung der Gonaden beginnen sie bereits November/Dezember bei einer Temperatur von unter 8-10°C wieder zu reifen. *Dreissena* ist damit ein r-Strategie, der schnell und effektiv neue Gebiete besiedeln kann. (Das war z.B. 1999 an der Nordküste Australiens der Fall: Innerhalb von maximal 6 Monaten hatte *Dreissena polymorpha* ein komplettes Hafengebäck besiedelt und konnte nur durch massiven Gifteinsatz im gesamten Hafengebiet an einer weiteren Verbreitung gestoppt werden (MALAKOFF 1999)).

Nach der Befruchtung entwickelt sich eine freischwimmende Larve (Trochophora→Veliconcha→Pediveliger), welche bis zu 4 Wochen lang verdriftet wird und in Flüssen mehrere hundert Kilometer zurücklegen kann (NEUMANN *et al.* 1992). Die Dauer des Larvenstadiums variiert je nach Temperatur und Nahrungsangebot. Am Ende dieses Stadiums wächst *Dreissena polymorpha* zu einer kleinen Muschel von ca. 220 µm Länge heran (NEUMANN & JENNER 1992). Diese heftet sich dann mit ihren Byssusfäden an ein geeignetes Substrat, z.B. Steinbrocken in Ufernähe, Holzpfähle o.ä. Hierbei ist die Strömungsgeschwindigkeit ein wichtiger Faktor, da eine starke Strömung die Anheftung erschwert. Auch eine Anheftung an driftende Makrophyten und dadurch eine weitere Verbreitung ist möglich (HORVATH & LAMBERTI 1996). Am Ende des Geburtsjahres messen die Muscheln 0,5 bis maximal 12 mm (Sprung, 1992). Bereits bei einjährigen Tieren mit einer Schalenlänge von 9 mm setzt die Geschlechtsreife ein (SPRUNG 1992).

Nach KINZELBACH (1992) ist *Dreissena polymorpha* seit dem späten Pliozän (ca. 14 Mio. Jahre) aus dem Euxinischen Becken am Schwarzen Meer bekannt. Während des Mindel-Riss-Interglazials breitete sie sich in den Unterläufen der angrenzenden Flusssysteme, vor allem im Dnepr und zur Weichsel aus. Von dort aus konnte sie sich bis in die Niederlande und sogar nach England ausbreiten, allerdings starb sie in der Würm/Weichsel Eiszeit in allen Gebieten nordwestlich des Dneprbeckens wieder aus. Eventuell haben sich jedoch einzelne kleine Populationen im nördlichen Zentraleuropa halten können (THIENEMANN, 1950) und so die Wiederbesiedlung Europas vereinfacht, die im frühen 19. Jahrhundert begann. Am Ende des 19. Jahrhunderts hatte sie die meisten Flüsse West- und Zentraleuropas besiedelt und war bis in die Mündungsgebiete der Baltischen und der Nordsee vorgedrungen. Begünstigt wurde diese Ausbreitung wahrscheinlich durch den Bau mehrerer Kanäle zu dieser Zeit (JADZEWSKI, 1980). *D. polymorpha* standen zwei Einwanderungswege offen: Zum einen eine nördliche Route über die Flüsse und Kanäle Dnieper, Prypet, Bug, Weichsel und den Mittelland-Kanal zum Rhein und zum anderen die südliche Route, welche die Donau hinauf führt. Bereits 1826 wurde *D. polymorpha* zum ersten Mal im Rhein bei Rotterdam nachgewiesen, 1855 war sie im Main zu finden, 1868 erstmals in der oberen Donau (THIENEMANN, 1950). Durch den Bau des Main-Donau-Kanals und dessen Eröffnung 1992 wurden die beiden Einwanderungsrouten zusammengeführt (MÜLLER *et al.* 2001a, 2002a). 1986 wurde *D. polymorpha* im Golf von Finnland gefunden, ab 1994 gab es Beobachtungen in Irland (ORLOVA 2002, POLLUX *et al.* 2003, ASTANEI *et al.* 2005). In Kontinentaleuropa ist sie westlich bis Frankreich verbreitet (KINZELBACH 1992) und wird wahrscheinlich in naher Zukunft Spanien besiedeln (MINCHIN *et al.* 2002).

Entscheidend für den Invasionserfolg von *D. polymorpha* waren anthropogene Einflüsse, da sie durch Holzflöße und Schiffe schnell und weit verbreitet wurden. Als Larven können sie im Ballastwasser von größeren Schiffen über große Strecken und mehrere Flüsse verschleppt werden, ebenso als adulte Tiere, die sich mit den Byssus-Fäden an Schiffskörper anheften (auch z.B. an kleineren, leicht über Land zu transportierenden Sportbooten). So konnte *D. polymorpha* ein weit größeres Verbreitungsgebiet als vor der letzten Eiszeit erreichen; sie ist nun nicht nur in ganz Europa incl. Großbritannien zu finden, sondern auch in abgeschlossenen Systemen wie z.B. alpinen und subalpinen Seen (BINELLI *et al.* 1997) und seit 1988 gar in den Great Lakes von Nord-Amerika (HEBERT *et al.* 1989; GARTON & HAAG 1991; MAY *et al.* 2006). Hier und natürlich auch in Europa stellen sie bei zu hoher Populationsdichte ein Problem dar, denn sie besiedeln erfolgreich Wasserleitsysteme und andere Zu- und Ableitungen z.B. von Wasserkraftwerken und verstopfen diese, wodurch sie Millionenschäden verursachen können. Wenn Trinkwassersysteme betroffen sind, kommen noch die Probleme der Verunreinigung des Wassers durch abgestorbene Tiere hinzu. Speziell in den Großen Seen Nordamerikas können sie geradezu erstaunliche Besiedlungsdichten erreichen, wo sie bereits zu einem ernststen Problem geworden sind.

2.1.2 Biologie und Verbreitung von *Dikerogammarus villosus*



Abb. 2: *Dikerogammarus villosus*

Foto: C. Braun 2007

Der Große Höckerflohkrebs *Dikerogammarus villosus* SOWINSKI 1894 (Abb.2) ist eine weitere erfolgreiche invasive Spezies aus dem pontokaspischen Raum. Er gehört zur Familie der Gammaridae in der Ordnung Amphipoda. Auch er besiedelt stehende wie Fließgewässer und ist daher in Seen, Kanälen und Flüssen zu finden. *Dikerogammarus villosus* besiedelt die Unterseite von Steinen und besonders deren Ritzen, ist aber auch an Pflanzenmaterial zu finden. Bei Störungen im Habitat ist er auch freischwimmend zu finden. Dies gibt ihm einen großen Vorteil gegenüber *D. polymorpha*, welche diese Möglichkeit als adultes Individuum nicht hat.

D. villosus wird 20 mm und im pontokaspischen Raum bis zu 30mm lang (NESEMAN *et al.* 1995) und zeigt eine stark variable Morphologie (PJATAKOVA & TARASOV 1996) und Färbung (NESEMAN *et al.* 1995, DEVIN *et al.* 2001, MÜLLER *et al.* 2002b). Er ernährt sich räuberisch z.B. von anderen, kleineren Gammariden, häufig von *Corophium curvispinum* und auch von anderen Benthosorganismen (DICK *et al.* 2002). Interessant ist, dass *D. polymorpha* in ihrer Verbreitung durch *Corophium curvispinum* durch Überwucherung und Verschlammung von geeignetem Substrat behindert wird; Insofern begünstigt das Vorkommen von *D. villosus* indirekt auch *D. polymorpha* (HAAS *et al.* 2002, VAN RIEL *et al.* 2006). Umgekehrt bietet *D.*

polymorpha viele Vorteile für *D. villosus*; so schafft sie z.B. durch dichte Besiedlung Verstecke sowohl für *D. villosus* als auch dessen potentielle Beute (DEVIN *et al.* 2003).

Entsprechend der stark räuberischen Lebensweise hat *D. villosus* nicht nur eine für einen Amphipoden große Körperlänge, was ihn anderen Gammariden überlegen macht, sondern auch relativ große und kräftige Mandibeln sowie stark ausgebildete Gnathopoden. *D. villosus* kann sich aber auch von abgestorbenen Pflanzenresten ernähren.

D. villosus ist ebenso wie *D. polymorpha* ein r-Strategie. Er erreicht die Geschlechtsreife bereits in Alter von 2-3 Monaten ab einer Körperlänge von 6-9 mm und vermehrt sich über das ganze Jahr verteilt, wenn auch mit mehreren Schwerpunkten. Im Frühling kann die Wachstumsrate bis zu 2,6 mm in zwei Wochen betragen (DEVIN *et al.* 2004). Das Weibchen trägt maximal ca. 180 befruchtete Eier in ihrer Bruttasche (Marsupium), wo die Juvenilen schlüpfen (STEINMANN 2007). Diese hohe Fekundität macht *D. villosus* anderen, einheimischen *Gammarus*-Arten überlegen.

Wie *Dreissena polymorpha* stammt auch *Dikerogammarus villosus* ursprünglich aus dem pontokaspischen Raum. Vom Mündungsgebiet der Donau aus begann um 1989 eine rasche Verbreitung in der Donau, wo er 1992 das erste Mal in Deutschland nachgewiesen wurde (NESEMANN *et al.* 1995). Von dort aus besiedelte er nach dessen Eröffnung rasch den Main-Donau-Kanal (1993) und den Main (1994). 1995 war er in den Rhein eingewandert, den er im gleichen Jahr bereits bis zum Niederrhein besiedelt hatte (BIJ DE VAATE & KLINK 1995). Schon 1997 war er in der Mosel bis nach Frankreich verbreitet und konnte im Rhein bis nach Basel nachgewiesen werden (NEHRING 2005b). Es fand also eine äußerst schnelle Verbreitung statt, die sich über den Mittellandkanal in den folgenden Jahren fortsetzte und die Spezies bis zur Jahrtausendwende in die Weser, Elbe und Oder führte. Innerhalb von nur zehn Jahren nach der Eröffnung des Main-Donau-Kanals hatte er sich also weitgehend über das gesamte Binnengewässersystem Deutschlands ausgebreitet. 2003 war er in sämtlichen größeren Flüssen in Frankreich zu finden (BOLLACHE *et al.* 2004). Es wird erwartet, dass *D. villosus* einer der nächsten erfolgreichen Invasoren in den nordamerikanischen Great Lakes sein wird (RICCIARDI & RASMUSSEN 1998; BRUIJS *et al.* 2001, BOLLACHE *et al.* 2004, KLEY & MAIER 2006). Wie bereits in Europa, so folgt *D. villosus* eventuell auch hier *D. polymorpha*.

Dies passt zur „Invasional Meltdown Theory“ (SIMBERLOFF & VON HOLLE 1999), die besagt, dass die erfolgreiche Invasion einer Spezies (in diesem Fall *D. polymorpha*) die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Besiedlung durch andere invasive Spezies koevolutiver Herkunft (z.B. *D. villosus*) begünstigt.

2.1.3 Untersuchungsgebiet

Bei der Auswahl des Untersuchungsgebietes wurden mehrere Faktoren berücksichtigt. Zum einen ging es um die Einbeziehung von Flüssen mit verschiedenen Abflussregimen: schmelzwasser- bzw. grundwassergespeist (Adaptations-Szenario). Zum Anderen sollte eine mögliche Nachvollziehbarkeit der bekannten Einwanderungsrouten der beiden Spezies überprüft werden können (phylogeographisches Szenario). Daher wurden die grundwassergespeisten Flüsse Mosel und Main sowie der schmelzwassergespeiste Rhein in die Untersuchung mit einbezogen (Abb.6). Dazu wurde mit Hilfe von tagesgenauen Daten der der mittlere Pegelstand sowie dessen Standardabweichung über mehrere Jahre für alle drei untersuchten Flüsse aufgetragen (Quelle: Bundesanstalt für Gewässerkunde Koblenz). Im Rhein sind die größten Schwankungen im Pegel und auch dessen Höchststände in den Sommermonaten (April bis September) zu beobachten, während bei den grundwassergespeisten Flüssen Main und Mosel die Verhältnisse genau umgekehrt sind (Abb. 3-5). Des Weiteren kann man bei den grundwassergespeisten Flüssen gut erkennen, dass durch die zahlreichen Staustufen versucht wird, einen Minimalpegel zu halten, um die Schifffahrt sicherzustellen. Dies wird vor allem in den Monaten Juli bis September deutlich.

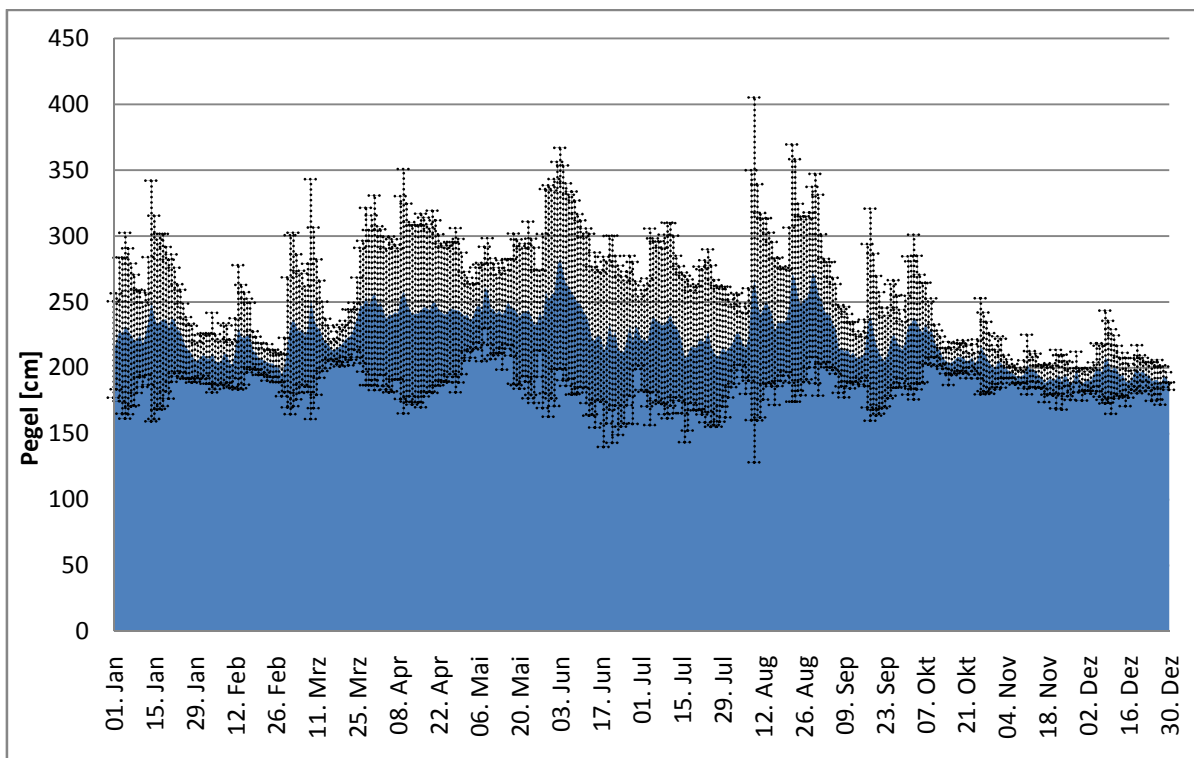


Abb. 3: Mittlerer Pegel Rhein bei Kehl in den Jahren 2003-2007

Aufgetragen ist der Mittelwert der tagesgenauen Pegelstände über die Jahre 2003-2007 (blau) sowie dessen Standardabweichung (schwarze Balken).

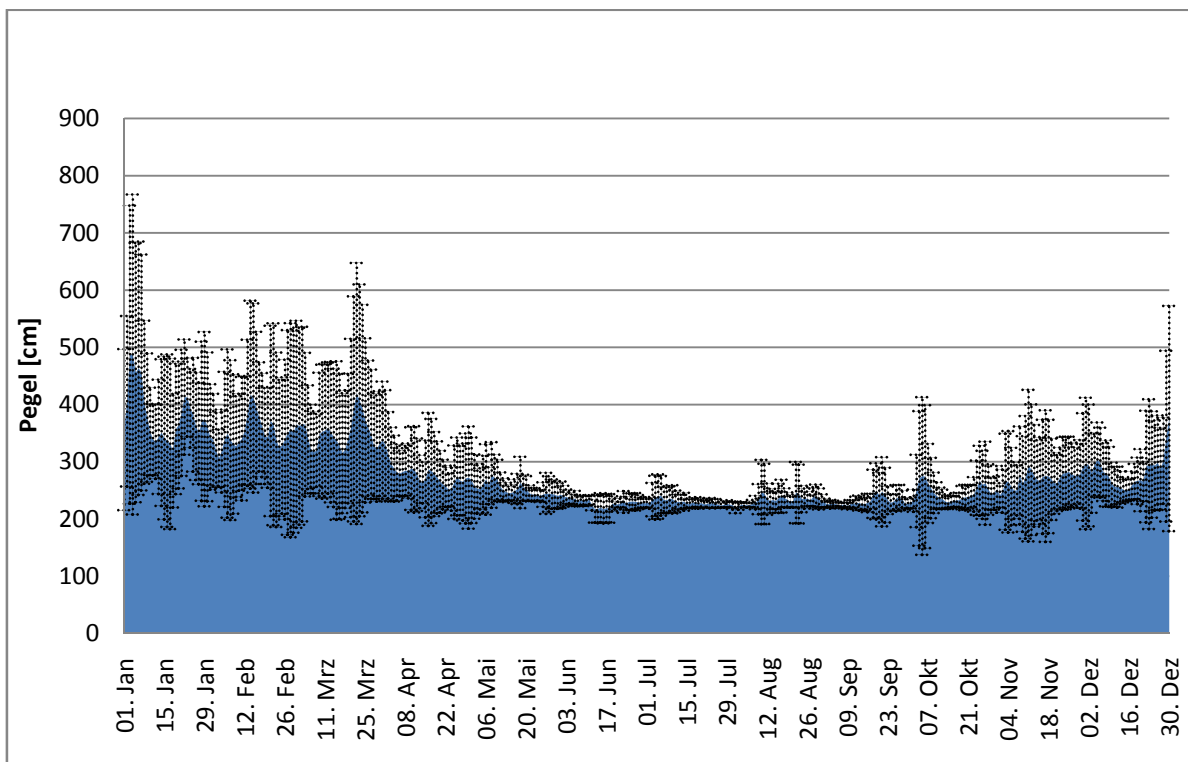


Abb. 4: Mittlerer Pegel Mosel bei Cochem in den Jahren 2001-2007

Aufgetragen ist der Mittelwert der tagesgenauen Pegelstände über die Jahre 2001-2007 (blau) sowie dessen Standardabweichung (schwarze Balken).

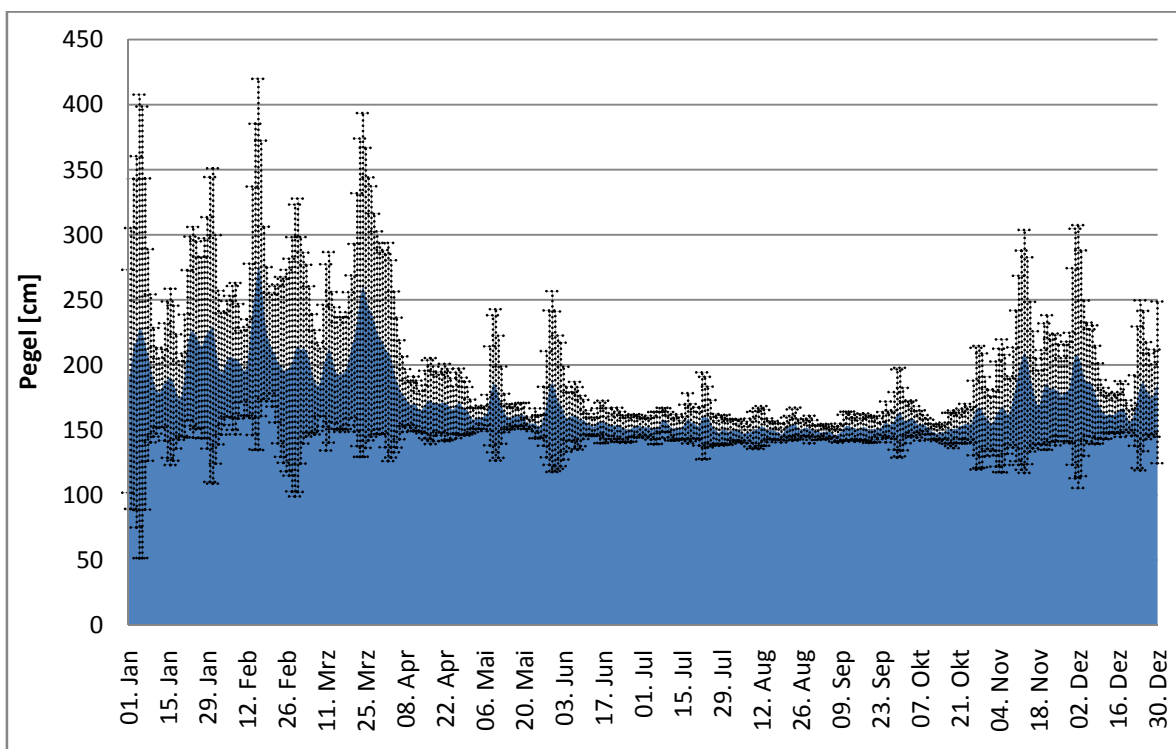


Abb. 5: Mittlerer Pegel Main bei Würzburg in den Jahren 2001-2007

Aufgetragen ist der Mittelwert der tagesgenauen Pegelstände über die Jahre 2001-2007 (blau) sowie dessen Standardabweichung (schwarze Balken).

Um des Weiteren der Frage nachgehen zu können, ob kleinräumige genetische Variationen aufgrund von kontrastierenden Umweltbedingungen nachgewiesen werden können, wurden als Modell dafür Staustufen gewählt. Diese bieten auf kürzeste Entfernung (nur wenige 100 Meter) extrem unterschiedliche abiotische Faktoren, wie z.B. Strömungsgeschwindigkeit und Sauerstoffgehalt (Abb. 10-11, Anhang). Dazu wurden Staustufen ausgesucht (siehe Tab.1), die im unmittelbaren Bereich oberhalb und unterhalb der Staumauer zugänglich waren und im Uferbereich eine Steinschüttung aufwiesen, bei der eine Besiedlung wahrscheinlich und eine Entnahme möglich war. Dies war im Rhein nur bei zwei Staustufen der Fall; südlich von Gamsheim sind die Staustufen im Uferbereich mit Beton befestigt, so dass hier keine Probenahme vorgenommen werden konnte.

Die Staustufen sind alle nach dem gleichen Schema aufgebaut: Auf der einen Fluss-Seite ist die Schleuse, in der Mitte des Flusses die eigentliche Staumauer (das Wehr), und auf der anderen Seite ist ein kleines Wasserkraftwerk und ggf. auch die Fischtreppe untergebracht (siehe Abb.7-9). Der größte Teil des Abflusses des gestauten Flusses (abgesehen von dem Wasser, das in der Schleuse durchfließt) findet durch das Kraftwerk statt, nur bei hohem Wasserstand fließen signifikante Wassermengen zusätzlich über das Wehr hinweg ab. Das bedeutet, dass hauptsächlich im Bereich unterhalb des Kraftwerkes eine starke Strömung und Verwirbelung des Wassers herrscht. Um im Bereich unterhalb der Staustufe die maximale Strömungsgeschwindigkeit zu erfassen, wurde daher immer auf der Fluss-Seite mit dem der Staustufe angegliederten Wasserkraftwerk gesammelt.

Tab. 1: Auflistung der Entnahmestellen

Fluss	Staustufe	Fluss- km	Probe-Name <i>D. pol.</i>	Probe-Name <i>D. vill.</i>	Entnahme- Datum
Main	Randersacker	258	Ran	GRan	16.08.2005
	Harrbach	219	Har	GHar	16.08.2005
	Faulbach	147	Fau	-	17.08.2005
	Mülheim	53	-	GMul	18.08.2005
	Eddersheim	15	Edd	-	18.08.2005
Mosel	Bruttig-Fankel	59	Brf	GBrf	16.07.2007
	Müden	37	Mud	GMud	19.08.2006
	Lehmen	21	Leh	GLeh	19.08.2006
Rhein	Gamsheim	309	Gam	GGam	19.07.2006
	Iffezheim	334	Iff	Giff	19.07.2006



Abb.6: Entnahmestellen im Untersuchungsgebiet



Abb. 7: Staustufe Lehmen/Mosel
Die genauen Entnahmestellen sind rot markiert.

Foto: Google Earth

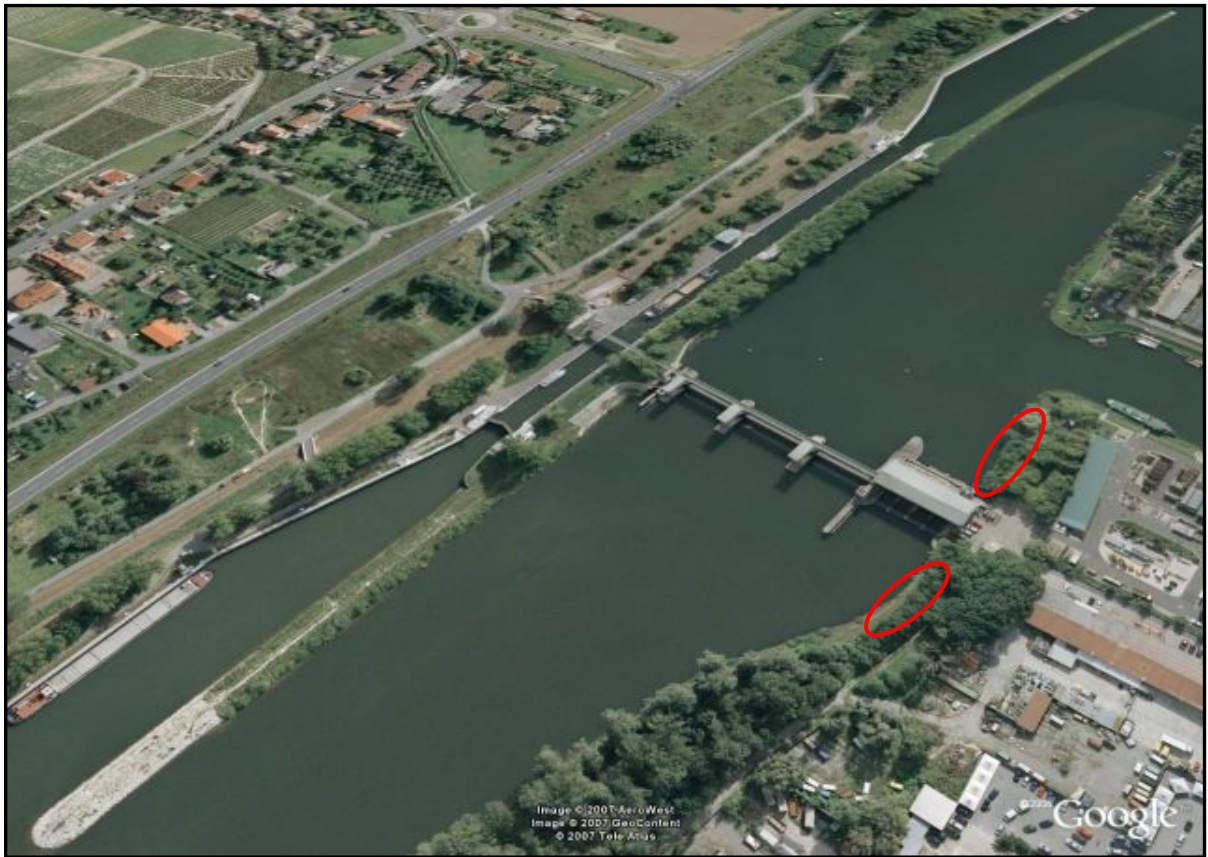


Abb. 8: Staustufe Randersacker/Main
Die genauen Entnahmestellen sind rot markiert.

Foto: Google Earth



Abb. 9: Staustufe Iffezheim/Rhein
Die genauen Entnahmestellen sind rot markiert.

Foto: Google Earth

2.2 Stichprobennahme

Es wurden in einer Tiefe von 10 cm bis ca. 1,5 Meter am Uferbereich Steine mit einer Kantenlänge von 10 bis 50 cm aus dem Wasser gehoben und abgesammelt. Bei größeren Steinen erfolgte die Entnahme direkt am Stein. Ziel war eine Probengröße von jeweils 50-60 Tieren pro Tierart. Die Proben wurden anschließend in 99% Ethanol überführt. Dieser wurde bei *D. polymorpha* nach einigen Stunden nochmals erneuert, um eine Verdünnung durch abgegebenes Wasser auszugleichen.

Um die gewünschten Umweltbedingungen so gut wie möglich abzudecken, wurde versucht, den Entnahmeort der Staumauer so nahe wie möglich zu realisieren. Dadurch wurden ein Abstand der beiden Entnahmestellen von unter 200-400 m und ein maximaler Unterschied in der Strömungsgeschwindigkeit zwischen den beiden Entnahmestellen erreicht (siehe Abb.10-11). Auch wurde versucht, den Uferbereich, in dem gesammelt wurde, auf ein möglichst kurzes Stück (weniger als 50 m) zu beschränken, um eine räumlich homogene Stichprobe gewährleisten zu können.

2.2.1. Stichprobennahme Bruttig-Fankel

Beim Untersuchungsort Bruttig-Fankel wurde darüber hinaus das Sammelschema erweitert: Um die Möglichkeit ausschließen zu können, dass es sich bei den gefundenen Unterschieden der Stichproben um bloße zufällige Muster handelte, die in keinen Zusammenhang mit der dazwischenliegenden Staustufe stand, wurden insgesamt vier Uferstellen beprobt: jeweils zwei oberhalb und unterhalb. Die Entnahmestellen lagen 180m (oberhalb) und 230m (unterhalb) auseinander. Die Entfernung zwischen den beiden zum Wehr hin liegenden Entnahmestellen betrug 180 m, also jeweils 90 m von der Staumauer entfernt. Damit wurde ein möglichst gleichmäßiges Entnahmemuster sichergestellt, wobei die Strömungsgeschwindigkeiten der beiden unterhalb des Wehrs liegenden Entnahmestellen erwartungsgemäß deutlich unterschieden (siehe Anhang). Die Strömungsgeschwindigkeit der beiden oberhalb liegenden Entnahmestellen war identisch.



Abb. 10: Entnahmestelle oberhalb einer Staustufe

Foto: D.Hidde 2005



Abb. 11: Entnahmestelle unterhalb einer Staustufe

Foto: D.Hidde 2005

2.3 Gewebe-Entnahme und DNA – Extraktion

2.3.1 *Dreissena polymorpha*

Den Tieren wurde unter dem Stereomikroskop Muskelgewebe entnommen. Leicht zu identifizieren sind der posteriore Adduktormuskel, der die Schalenhälften zusammenzieht, und der posteriore Byssusretraktormuskel (siehe Abb.12). Waren die Tiere zu klein, um die Muskeln zu identifizieren oder war die Gewebemenge zu gering, wurden auch die Kiemen verwendet. Es wurden ca. 20mg Gewebe verwendet. Aus dem entnommenen Gewebe wurde anschließend mit dem Kit „High Pure PCR Template Preparation Kit“ der Firma ROCHE nach der vorgeschriebenen Standardmethode des Kits (siehe Anhang) die DNA extrahiert.

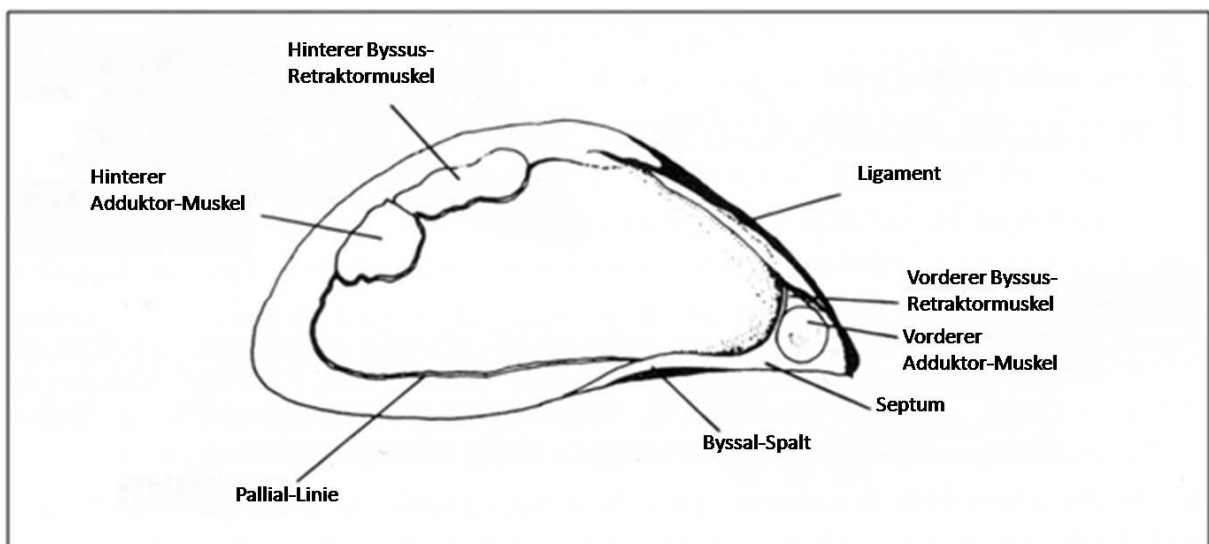


Abb. 12: *Dreissena polymorpha*, geöffnet. (aus NALEPA *et al.* 1993, verändert.)

2.3.2 *Dikerogammarus villosus*

Hier wurden die Tiere nach Verifizierung der Art durch morphologische Merkmale (u.a. die charakteristischen Urosomenhöcker (siehe Abb.2), die der Art die Bezeichnung „Großer Höckerflohkrebs“ einbrachten), unter dem Stereomikroskop halbiert und die hintere Hälfte komplett verwendet. Auch hier wurde anschließend mit dem „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (siehe Anhang) die DNA extrahiert.

2.4 Die AFLP-Methode

Die Methode des Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ist eine Technik zur Anfertigung von „genetischen Fingerabdrücken“ und stellt eine Fusion bzw. Erweiterung der Techniken RFLP (restriction fragment length polymorphism) (BOTSTEIN *et al.*, 1980) und RAPD (random-amplified polymorphic DNA) (WILLIAMS *et al.*, 1990) dar. Die AFLP wurde 1995 von VOS *et al.* (VOS *et al.* 1995) entwickelt und hat sich seitdem als relativ preiswertes, schnelles und zuverlässiges molekulares Analyseverfahren etabliert (Blears *et al.* 1998, Mueller *et al.* 1999). Die weitaus meisten Arbeiten damit finden im botanischen Bereich, hier speziell der Kulturpflanzen-Forschung statt (z.B. MOON *et al.* 2007, MAHUKU *et al.* 2004), aber auch bei molekulargenetischen Arbeiten mit Bakterien und Pilzen ist diese Methode beliebt (BENSCH & ÅKESSON 2005). Weitaus weniger Arbeiten nutzen AFLP zur Klärung phylogenetischer Fragestellungen bei Tieren. Jedoch ist die Methode prinzipiell auch hierfür hervorragend geeignet und in bestimmten Fällen den etablierteren Methoden wie RAPD oder auch Mikrosatellitenanalysen überlegen (BENSCH & ÅKESSON 2005).

Die AFLP-Technik beruht auf dem Prinzip der PCR (Polymerase chain reaction, vgl. MULLIS 1990) und dem Verdau genomischer DNA mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen (VOS *et al.* 1995) (für das verwendete Protokoll mit detaillierten Angaben siehe Anhang). Hierbei finden zwei Restriktionsenzyme Verwendung: das häufig schneidende Enzym MseI mit einer 4bp-Erkennungssequenz und das selten schneidende Enzym EcoRI mit einer 6bp-Erkennungssequenz. Sie verdauen die DNA komplett und zerlegen sie in verschieden lange Fragmente. An diese Fragmente werden Oligonukleotid-Adapter bekannter Sequenz ligiert. Diese ermöglichen in den folgenden PCR-Schritten eine Anlagerung von speziell designten Primern. Für die Durchführung der PCR-Reaktionen wurde der Thermocycler in einem Pipettier-Roboter des Typs „MWG AG Biotech Roboseq® 4204 SE“ verwendet.

Die PCRs finden in zwei Schritten statt: die präselektive und die selektive PCR. In der präselektiven PCR werden Primer verwendet, die eine Base länger sind als die bekannte Sequenz der Restriktionsstellen und der Adapter. Dadurch reduziert man die Anzahl der Fragmente um das 16fache. An das entstandene PCR-Produkt werden im zweiten Schritt, der selektiven PCR, wiederum Primer angelagert, die diesmal allerdings um insgesamt drei Basen länger sind als die bekannte Sequenz. Durch diesen Schritt wird die Anzahl der Fragmente nochmals reduziert, diesmal um das 256fache. Zudem ist hier einer der Primer farbmarkiert. Man erhält also eine stark reduzierte Menge von farbmarkierten Fragmenten, die auf einem Polyacrylamid-Gel (oder in einem Kapillar-Sequenzier) aufgetrennt und identifiziert werden können. Da sich in Vorversuchen zeigte, dass bei *Dikerogammarus villosus* mit dieser

Methode immer noch zu viele Fragmente vorhanden waren, wurden für diese Tierart Primer verwendet, die mit zwei bzw. vier Basen verlängert waren statt mit einer bzw. drei Basen, wie oben beschrieben (siehe Anhang). Dadurch wurde eine weitere Reduzierung der Fragmentanzahl erreicht, die eine Auswertung ermöglichte. Die Markierung der Primer mit verschiedenen Fluoreszenzfarben ermöglichte es, mehrere PCR-Produkte in einem gemeinsamen Ansatz zu analysieren. Daher wurden drei verschiedene Primerpaare entwickelt, die gelb, grün und blau farbmarkiert waren (siehe Anhang).

2.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

2.5.1 Prinzip der Polyacrylamidgel – Elektrophorese

Um PCR – Produkte der Größe nach aufzutrennen, ist die Gelelektrophorese ein bewährtes Mittel. Hierbei wandern die DNA-Proben durch ein Agarose- oder Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld, und ihre Länge bestimmt ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Um sicherzustellen, dass keine anderen Faktoren die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussen, werden die PCR – Produkte vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert. Zur Bestimmung der Länge ist es erforderlich, einen Größenstandard mit Fragmenten bekannter Länge mitlaufen zu lassen, so dass durch einen Vergleich der Laufstrecken die Länge der unbekanntem Fragmente bestimmt werden kann.

Da sich die AFLP-Fragmente zum Teil nur um wenige Basen unterscheiden, ist die Agarosegel–Elektrophorese zu einer Analyse nicht geeignet, da sie keine genügend hohe Auflösung bietet. Daher wurde eine Fragment–Analyse mit einem automatischen Fluoreszenz–Sequenziergerät „ABI PRISM Modell 377“ der Firma APPLIED BIOSYSTEMS INC. durchgeführt, welche 4,5%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Dieses Gerät arbeitet mit einem Laser, welcher die verschiedenen verwendeten Farbstoffe fluoreszieren lässt; die emittierten Wellenlängen werden dann von der nachgeschalteten Elektronik weiterverarbeitet. Die Datenaufnahme erfolgt in einem an das Sequenziergerät angeschlossenen Computer. Wie oben beschrieben, waren die Primer farbmarkiert, sodass sie vom Gerät identifiziert werden konnten. Der Größenstandard „GS-500“ der Firma APPLIED BIOSYSTEMS INC., der Fragmente von 35 bis 500 Nukleotiden Länge enthielt, war mit dem Farbstoff „ROX“ ebenfalls Fluoreszenz–farbmarkiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms GENESCAN Version 3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS INC).

2.5.2 Der Geleffekt

Ein potentielles Problem bei der Durchführung der AFLP mit Polyacrylamidgelen ist der „Geleffekt“. Dieser Effekt bezeichnet das Phänomen, dass durch leicht unterschiedliche Laufbedingungen bei verschiedenen Gelen artifizielle Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten in den erhaltenen Bandenmustern erzeugt werden können. Dieses Problem kann theoretisch natürlich auch bei den vorhergehenden Schritten in der PCR auftreten, da auch diese nicht unter vollständig identischen Bedingungen durchgeführt werden können. Wie beim Geleffekt ist eine leichte Varianz sowohl bei den äußeren Bedingungen (Luftfeuchtigkeit, Temperatur usw.) ebenso gegeben wie bei der exakten Zusammensetzung der Chemikalien durch unvermeidbare Abweichungen beim Pipettieren. Der Geleffekt bewirkt, dass auf verschiedenen Gelen aufgetragene Individuen sich in der anschließenden Analyse genetisch unterschiedlicher präsentieren, als sie tatsächlich sind. Im schlechtesten Fall werden dadurch falsche Gruppierungen produziert, die aber auffallen, weil sie sich entsprechend ihres Auftragens auf unterschiedliche Gele anordnen.

Um dieses Phänomen so gut wie möglich auszuschließen, wurden die Populationen, wann immer machbar, gleichzeitig behandelt. Das heißt, es wurden immer sämtliche Individuen eines Standortes auf einmal verarbeitet und mit dem gleichen Mastermix eines Reaktionsschrittes behandelt. Des Weiteren wurde für alle PCRs immer dieselbe PCR-Maschine benutzt und auch die Anbieter der Chemikalien über die gesamte Dauer der Untersuchung nicht gewechselt. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass eventuell gefundene Unterschiede auf das o.g. methodische Problem zurückzuführen wären.

Um dies auch bei den Gelen gewährleisten zu können, wurden die Populationen auf unmittelbar aufeinanderfolgende Gele aufgetragen, um die Bedingungen so identisch wie möglich halten zu können. Weiterhin wurden die Sub-Populationen eines Standortes gemischt auf die Gele verteilt, sodass wenn möglich immer beide Subpopulationen auf einem Gel zu finden waren. Ein Geleffekt wäre dadurch bei der Auswertung sofort durch ein Clustern der Individuen nach Gel-Läufen aufgefallen.

2.5.3 Vorbereitung der Proben

Zur Herstellung der aufzutragenden Proben wurden die PCR-Produkte der drei verwendeten Primer-Kombinationen (siehe Anhang) im folgenden Verhältnis zusammengegeben:

- 1,35µl PCR-Produkt mit blau markiertem Primer (E39)
- 2,35µl PCR-Produkt mit gelb markiertem Primer (E40)
- 2,35µl PCR-Produkt mit grün markiertem Primer (E45 bzw. E94)

3µl dieser Lösung wurden mit 3µl Loading-Buffer (siehe Anhang) gemischt, 3 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bis zum Auftragen auf Eis gelagert.

2.5.4 Durchführung der Gel – Elektrophorese

Das Gel wurde nach dem Säubern der durch den Kamm erzeugten Taschen, in welche die Proben aufgetragen werden sollten, in das Sequenziergerät eingesetzt. Nach der Durchführung eines „plate-check“, der die Reinheit des Gels sicherstellte, wurden die am oberen und unteren Rand befindlichen Pufferkammern mit 1x TBE befüllt. Nach dem Entfernen von Luftblasen aus den Taschen des Gels wurde eine Heizplatte angelegt, die das Gel in dem folgenden 30minütigen „Pre-Run“ auf 51°C aufheizte. Nach nochmaligem Ausspülen der Geltaschen wurde nun jede zweite lane mit jeweils 1,8µl der auf Eis gelagerten Probe beschickt. Nach einer 5minütigen Fortsetzung des Pre-Runs konnten nun auch die restlichen lanes beschickt werden. Durch diese Technik wurde später die Zuordnung von Banden zu einer lane erleichtert. Jetzt konnte der eigentliche Lauf GeneScan Run 36-D 2400 gestartet werden. Nach einer Laufzeit von 3,5 Stunden erfolgte die automatische Auswertung durch das Computer-Programm.

2.5.5 Auswertung der Gele

Die Auswertung erfolgte mit den Programmen GENESCAN 3.0 (APPLIED BIOSYSTEMS INC.) und GENEMAPPER 2.1 (APPLIED BIOSYSTEMS INC). Dazu wurden die erstellten Gele zunächst auf korrekte Zuordnung der lanes überprüft. Anschließend erfolgte die Extraktion der Daten und deren automatisches labelling („Scoring“). Dabei wurden grundsätzlich zunächst nur peaks zwischen 75bp und 450bp sowie über 60 FE (Fluoreszenz-Einheiten) berücksichtigt. Die erhaltenen peaks wurden danach einzeln auf Richtigkeit überprüft. Hierbei wurden einerseits Rundungsfehler, die beim automatischen Labeln entstanden waren, beseitigt; außerdem wurde das Scoring gegebenenfalls angepasst, wenn sich z.B. zeigte, dass die Signale bei einzelnen Proben durchweg schwach waren. Dies machte dann ein manuelles Scoring von peaks auch unter 60 FE notwendig.

Anschließend wurden diese Daten in Excel überführt. Hier wurde der Datensatz dann in folgender Weise bereinigt:

Zunächst erfolgte ein Aufaddieren der gesamten gefundenen peaks bei einem Locus über alle Individuen (einer Basenpaarlänge, z.B. 75bp). Anschließend wurden die Loci, die nur zehn Mal oder weniger vorkamen, aus dem Datensatz ausgeschlossen, um nach LYNCH & MILLIGAN (1994) eine unverzerrte Schätzung (unbiased estimates) zu gewährleisten.

Desweiteren wurden bei jedem Individuum die Banden von jedem der drei Marker (Primerpaare) einzeln aufsummiert. Die Marker, deren Banden-Anzahl bei einer gegebenen Probe in den oberen und unteren 5% der Verteilung lag, wurden bei dem betreffenden Individuum von der Analyse ausgeschlossen. Wenn bei einem Individuum 2 Marker betroffen waren, wurde das betreffende Individuum verworfen. Dadurch wurden die extremsten und möglicherweise fehlerhaft analysierten Datensätze eliminiert. Meist handelte es sich hierbei um auffällig wenig Banden, die durch eine schlechte bzw. nicht gelungene PCR verursacht wurden und ein klares Artefakt darstellten. Die oberen 5%, die ausgeschlossen wurden, waren ebenfalls als Produkt einer suboptimalen PCR zu erkennen: Hier waren bei einzelnen Tieren extrem viele Banden vorhanden, die ebenfalls meist bereits im Gelbild als Artefakt hervortraten. Wo möglich, wurden solche schlecht darstellbare Proben nochmals aufgetragen, aber meist brachte dies keine Verbesserung und bestätigte dadurch den Verdacht, dass der Fehler in einer der PCRs liegen musste. Um artifizielle Unterschiede im Bandenmuster (siehe Kap. 2.5.2) von vornherein ausschließen zu können, wurde auf eine nochmalige Durchführung der PCR für diese einzelnen Proben verzichtet.

2.6 Methoden der statistischen Auswertung

2.6.1 Verwendete Computerprogramme

Die durch die Fragmentanalyse gewonnenen Daten wurden unter Zuhilfenahme folgender Computerprogramme ausgewertet:

2.6.1.1 Paup 4.0b10 (PPC/Altipvec)

Dieses Programm erstellt mittels des neighbor joining-Verfahrens Verwandtschaftsbäume (Phylogramme) der einzelnen analysierten Individuen und liefert Distanzmatrizen für jede Population.

Beim neighbor-joining-Verfahren werden - ausgehend von einem zunächst sternförmigen Baum, in dem alle Taxa zentral verbunden sind - die Allelfrequenzen von zwei Individuen mit der geringsten genetischen Distanz ausgewählt, zu einem Ast des Baumes vereinigt und damit zu einer Gruppe zusammengefasst. Anschließend werden die genetischen Distanzen neu berechnet und wieder die nächstverwandten Individuen zu einem Ast mit zwei Taxa (Individuen oder Gruppen) zusammengefasst. Dies erfolgt solange, bis alle Individuen in den Baum eingefügt wurden und die Sternstruktur des Baumes völlig aufgelöst ist. Durch dieses schrittweise Verfahren werden nicht alle möglichen Bäume getestet und der optimale beibehalten, sondern schon während der Baumkonstruktion einige Varianten verworfen. Obwohl dieses Verfahren theoretisch suboptimal ist, liefert es gute und zuverlässige Ergebnisse.

Es wurden folgende Einstellungen verwendet:

Optimality criterion: Distance

Algorithm: Neighbor-Joining

Distance options: Restriction-site distances Nei-Li

Zur Erstellung der Verwandtschaftsbäume wurde die Darstellung „unrooted phylogram“ gewählt.

2.6.1.2 AFLP-SURV 1.0 (VEKEMANS 2002)

Dieses Programm wurde speziell für die Auswertung von AFLP-Daten entworfen. Es berechnet auf Basis von berechneten Allelfrequenzen Genetische Diversitäten („gene diversities“) (Nei & Li 1979) sowie genetische Populationsstrukturen und erstellt genetische Distanzmatrizen zwischen den analysierten Populationen. Dies geschieht unter

Berücksichtigung des Ansatzes von LYNCH & MILLIGAN (1994), der Korrekturverfahren für Nei & Li's gene diversity zur Verfügung stellt. Da diese von Nei & Li nicht für dominante Marker entwickelt wurde (wie sie von AFLP oder RAPDs geliefert werden), sind diese Korrekturen zur Vermeidung (bzw. Minimierung) von systematischen Fehlern (bias) notwendig.

Das Programm liefert diverse Daten:

- Gene diversity H_j in jeder Subpopulation und deren Varianz
- Gene diversity H_w innerhalb mehrerer Populationen (gleich der Mittelwerte der H_j der Subpopulationen) sowie deren Varianz
- prozentualen Anteil dieser Varianz aufgrund von Individuen, Loci und Populationen
- Daten über die Populationsstruktur:
 - Totale Gene diversity H_t
 - Gene diversity zwischen einzelnen Populationen H_b (entspricht $H_t - H_w$) sowie deren Varianz
 - F_{ST} -Werte (stark korrelierend mit H_b) (siehe 2.7.2.5)
- Dreiecksmatrizen der paarweisen genetischen Distanzen nach NEI und LYNCH & MILLIGAN (1994) zwischen jedem Populationspaar zur Erstellung von Verwandtschaftsbäumen. Es wurden 1000 bootstrap-Matrizen berechnet, mit denen in PHYLIP consensus-Bäume erstellen werden konnten.

2.6.1.3 PHYLIP 3.66 (Felsenstein 2006)

Phylip ist neben PAUP eines der verbreitetsten Programme zur Erstellung von Verwandtschaftsbäumen. Es setzt sich aus verschiedenen Unterprogrammen zusammen: KITSCH und NEIGHBOR berechnen Verwandtschaftsbäume aus den von AFLPSurv gelieferten 1000 bootstrap-Distanzmatrizen nach den Distanz-Methoden „Fitch-Margoliash“ bzw. „UPGMA“ (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Fitch-Margoliash funktioniert weitgehend wie das oben beschriebene neighbor-joining-Verfahren. Im Unterschied zur UPGMA-Methode liegt dem neighbor-joining-Verfahren die Annahme zugrunde, dass die Evolutionsgeschwindigkeit nicht konstant ist: Wenn z.B. eine Population von allen anderen Populationen weit entfernt ist, so wertet neighbor-joining dies nicht als einen entfernten Verwandtschaftsgrad, sondern führt es auf beschleunigte Evolution zurück.

Das UPGMA-Verfahren basiert dagegen auf der Annahme der „molekularen Uhr“, setzt also eine konstante Evolutionsrate voraus. Es sucht zunächst die Populationen mit dem höchsten Verwandtschaftsgrad und verwendet als Distanz den Mittelwert der einzelnen paarweisen Distanzen in diesen Populationen. Mit dieser neu gebildeten Gruppe beginnt die Berechnung von vorn, und dies wird bis zum Erhalt eines kompletten Baums wiederholt.

Das Unterprogramm CONSENSE fasst die berechneten Bäume dann zu je einem Consensus-Baum zusammen und DRAWGRAM gibt sie abschließend grafisch aus.

2.6.1.4 BAPS 3.2 (Bayesian Analysis of Population Structure)

BAPS berechnet die „Bayes'sche Inferenz“ der genetischen Struktur von Populationen (CORANDER *et al.* 2006a,b). Mit Hilfe dieses Programms kann man ein „clustering“ von Individuen zu Populationen sowie eine sog. „Admixture“-Analyse durchführen. Das clustering erlaubt die Einteilung von Individuen in verschiedene Populationen. Hierbei stehen verschiedene Verfahren zur Auswahl: Man kann das Programm aufgrund der Allelfrequenzen schätzen lassen, wie viele getrennte Populationen durch die analysierten Individuen gebildet werden, oder diese bereits definieren. Anschließend wird mit diesen Daten die Admixture-Analyse durchgeführt; hierbei geschieht eine Zuordnung der einzelnen Individuen zu diesen Populationen aufgrund ihrer Allelfrequenzen. Die grafische Darstellung dieser Analysen berücksichtigt die „Güte“ der gewählten Zuordnung durch farbliche Codierung.

In dieser Arbeit wurde das erste Verfahren gewählt, um mögliche Muster im Zusammenhang mit den kontrastierenden Umweltbedingungen erkennen zu können und nicht a priori entsprechend der Erwartung zu definieren.

2.6.1.5 Microsoft EXCEL 2007 V. 12.0.6024.5000

Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm wurden sämtliche Berechnungen und Bearbeitungen der Allelfrequenz-Tabellen sowie der Dreiecksmatrizen der Genetischen Distanzen durchgeführt, die zu ihrer Überführung in die einzelnen Statistikprogramme nötig waren.

2.6.1.6 DistCalc V. 1.2 (LOHNINGER 2002)

Der „Distribution Calculator“ wurde verwendet, um die F-Tests durchzuführen.

2.6.1.7 TFPGA V1.3 (Miller 1997)

Das Programm „Tools for population genetic analyses TFPGA“ wurde zur Absicherung der Ergebnisse von AFLPSurv verwendet und lieferte deskriptive populationsgenetische Daten zur geschätzten Heterozygotie, den Anteil polymorpher Loci und der durchschnittlichen Anzahl der ausgewerteten Tiere.

2.6.2 Verwendete Statistik

2.6.2.1 t-Test

Der t-Test ist ein parametrisches Verfahren, mit dessen Hilfe ein Unterschied zwischen den empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen auf Signifikanz getestet werden kann. Er liefert also eine Entscheidungshilfe dafür, ob ein gefundener Mittelwertsunterschied zufällig oder signifikant ist. Er arbeitet mit den Parametern des arithmetischen Mittels sowie dessen Standardfehler, der sich wiederum aus der Varianz und der Stichprobengröße ergibt. Eine Voraussetzung des t-Tests ist, dass die Mittelwerte normalverteilt sind. Die hier verwendete einfachste Variante des t-Tests setzt gleiche Varianzen der untersuchten Mittelwerte voraus; dies wurde mit dem F-Test sichergestellt (siehe 2.7.2.2)

Der t-Test wurde verwendet, um die gefundenen Unterschiede in der gene diversity zweier Subpopulationen eines Standortes auf Signifikanz zu überprüfen.

2.6.2.2 ANOVA

Um die Signifikanz der Unterschiede von Mittelwerten mehrerer Gruppen testen zu können, wird eine Varianzanalyse (*analysis of variance ANOVA*) durchgeführt. Dabei wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht. Wenn sie sich signifikant unterscheiden, kann angenommen werden, dass in den Gruppen unterschiedliche Faktoren wirksam sind.

2.6.2.3 F-Test

Hierbei handelt es sich um einen statistischen Test, mithilfe dessen entschieden werden kann, ob sich zwei Stichproben aus unterschiedlichen Populationen hinsichtlich ihrer Varianz statistisch signifikant unterscheiden.

Dieser Test wurde mit den Varianzen der Proben durchgeführt, die anschließend mit dem t-Test untersucht wurden.

2.6.2.4 Binomialtest

Mit dem Binomialtest wurde überprüft, ob die Genetischen Diversitäten in den zusammengefassten Sub-Populationsgruppen oberhalb und unterhalb von Staustufen signifikant unterschiedlich waren.

2.6.2.5 F_{ST}

Unter Genfluss versteht man das Einbringen von Genen einer Population in den Genpool einer anderen Population durch Migration. Migration ist die Abwanderung (Emigration) oder Einwanderung (Immigration) einzelner bis vieler Individuen (Migranten) aus einer Population in eine andere Population der gleichen Art. Allgemein ist bei der genetisch effektiven Migration, die durch die Genflussrate gemessen wird, zu beachten, dass sie oft viel geringer ist als die tatsächlich stattfindende Bewegung zwischen den Populationen. Viele Individuen, die in eine andere Population immigrieren, haben dort aus verschiedenen Gründen keinen Fortpflanzungserfolg und treten deshalb genetisch nicht in Erscheinung. Die genetische Divergenz zwischen Populationen ist abhängig vom Ausmaß der gegenseitigen Abgrenzung. Je schwächer die Abgrenzung, umso größer ist der Genfluss und umso kleiner ist der genetische Unterschied zwischen den Populationen. Ist der Genfluss sehr hoch, dann sind die beiden Populationsstichproben als eine Population aufzufassen. Dieser Genfluss kann im Übrigen historisch oder rezent sein.

In natürlichen Populationen ist es schwer, den Genfluss direkt zu schätzen. Ein indirekter Weg, den Genfluss zwischen zwei Populationen zu schätzen, erfolgt über den F_{ST} -Wert nach WRIGHT (1951) oder WEIR und COCKERHAM (1984).

Das Programm AFLPSurv (siehe Kap. 2.7.1.2) berechnet nicht nur die paarweisen F_{ST} -Werte für zwei Subpopulationen, es führt auch „Permutationen“ durch, mit denen statistisch auf die genetische Differenzierung zwischen den beiden Subpopulationen getestet werden kann. (Die Nullhypothese ist hier, dass es keine genetische Differenzierung zwischen den Populationen gibt.) Es wurden 25.000 Permutationen durchgeführt. Bei jedem Durchgang werden die Individuen zufällig einer der beiden Populationen zugeordnet und ein F_{ST} -Wert berechnet. Diese F_{ST} -Werte stellen so eine ad-hoc Verteilung unter Annahme der Nullhypothese dar. Der berechnete „echte“ F_{ST} -Wert wird dann gegen diese Verteilung getestet. Dazu gibt AFLPSurv sowohl das Konfidenzintervall der Verteilung auf dem 95% und 99%-Level als auch die Irrtumswahrscheinlichkeit zur Nullhypothese an. Liegt der berechnete F_{ST} -Wert außerhalb des Konfidenzintervalls, kann davon ausgegangen werden, dass die genetische Differenzierung der untersuchten Subpopulationen mit dieser Berechnungsmethode signifikant ist.

3. Ergebnisse

3.1 Kleinräumige Untersuchungen

3.1.1 Analyse auf Basis von Individuen

Nach der Analyse und Bereinigung der genetischen Rohdaten (siehe 2.5.5) gingen 788 Individuen von *D. polymorpha* sowie 731 Exemplare von *D. villosus* in die statistische Analyse ein. Von den insgesamt jeweils untersuchten 1152 Banden wurden bei *D. polymorpha* 580 und bei *D. villosus* 831 ausgewertet (siehe Tab.2).

Tab.2: Anzahl der untersuchten Individuen und Banden

	<i>D. polymorpha</i>	<i>D. villosus</i>
untersuchte Tiere	840	855
ausgewertete Tiere	788	731
untersuchte Banden	1152	1152
ausgewertete Banden	580	831

Um zunächst individuenbasierte Aussagen treffen zu können, wurden mit PAUP (siehe 2.7.1.1) neighbor joining-Verwandtschaftsbäume für jede Subpopulation erstellt. Hier ergab sich ein heterogenes Bild: Manche Populationen zeigten bereits hier eine deutliche grafische Unterscheidung in zwei Gruppen. Bei diesen war ein genetischer Unterschied zwischen den Subpopulationen oberhalb und unterhalb der Staustufen schon optisch zu erkennen (Abb.13). Bei anderen Populationen war dies nicht so deutlich sichtbar; hier waren die Individuen entweder nicht grafisch in Gruppen einteilbar (Abb.14), oder es waren mehr als zwei Gruppen zu erkennen, die nicht sofort eindeutig mit den Entnahmestellen korrelierten (Abb.15). Bei *D. polymorpha* konnten in insgesamt drei Populationen passende Gruppen gefunden werden (Ran, Fau, Har), bei *D. villosus* waren es vier Populationen (Ran, Har, Leh, Gam) (Abbildungen. siehe Anhang).

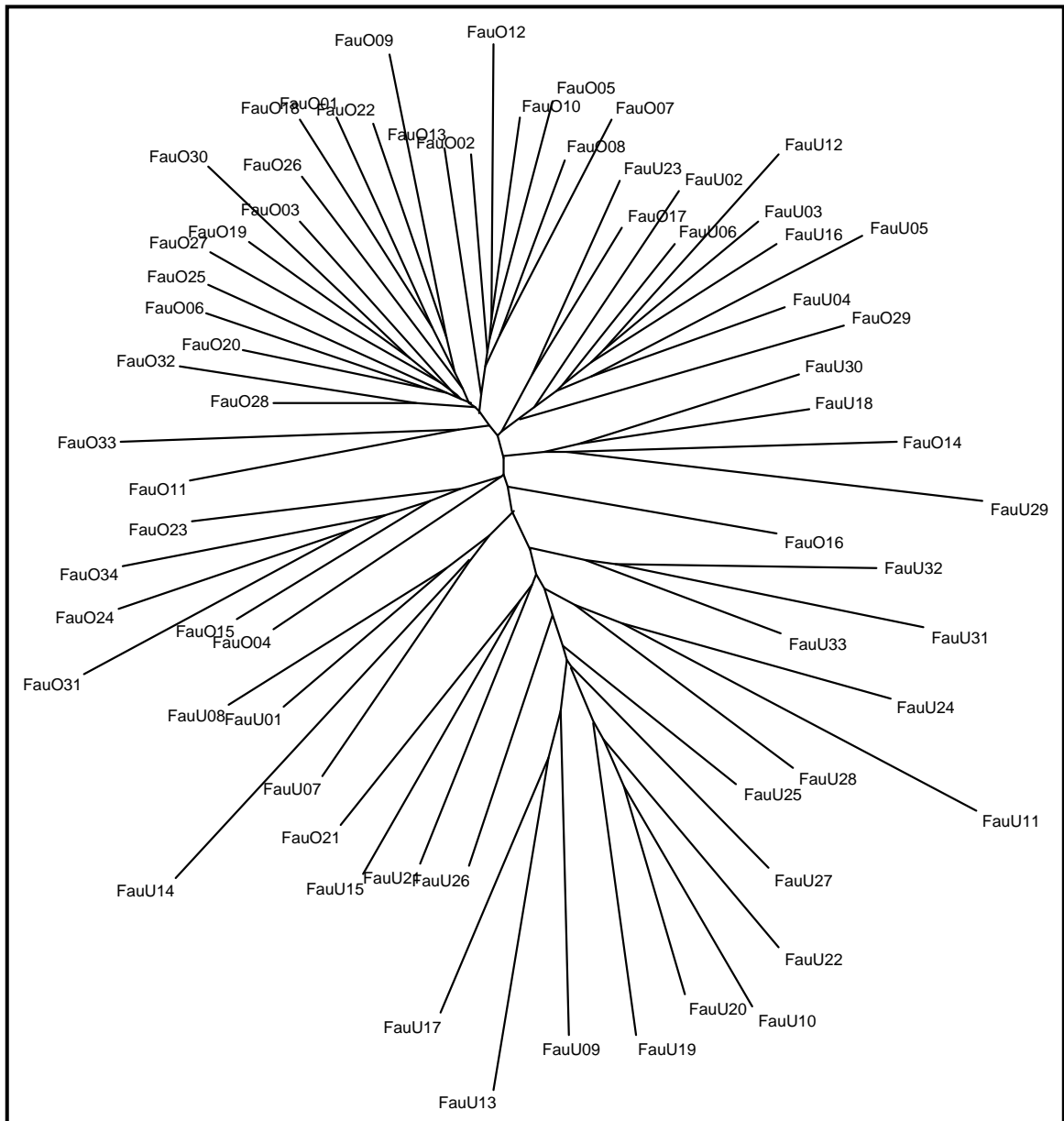


Abb. 13: Phylogramm *D. polymorpha* Population Fau aus PAUP

Jeder Ast steht für ein untersuchtes Individuum. Die Länge und Insertionsstelle des Astes bezeichnen das jeweilige Verwandtschaftsverhältnis. Die Bezeichnung setzt sich zusammen aus einem Kürzel von drei Buchstaben für den Entnahmeort (hier Fau=Faulbach), einem „U“ für unterhalb bzw. „O“ für oberhalb und einer Nummerierung der Individuen.

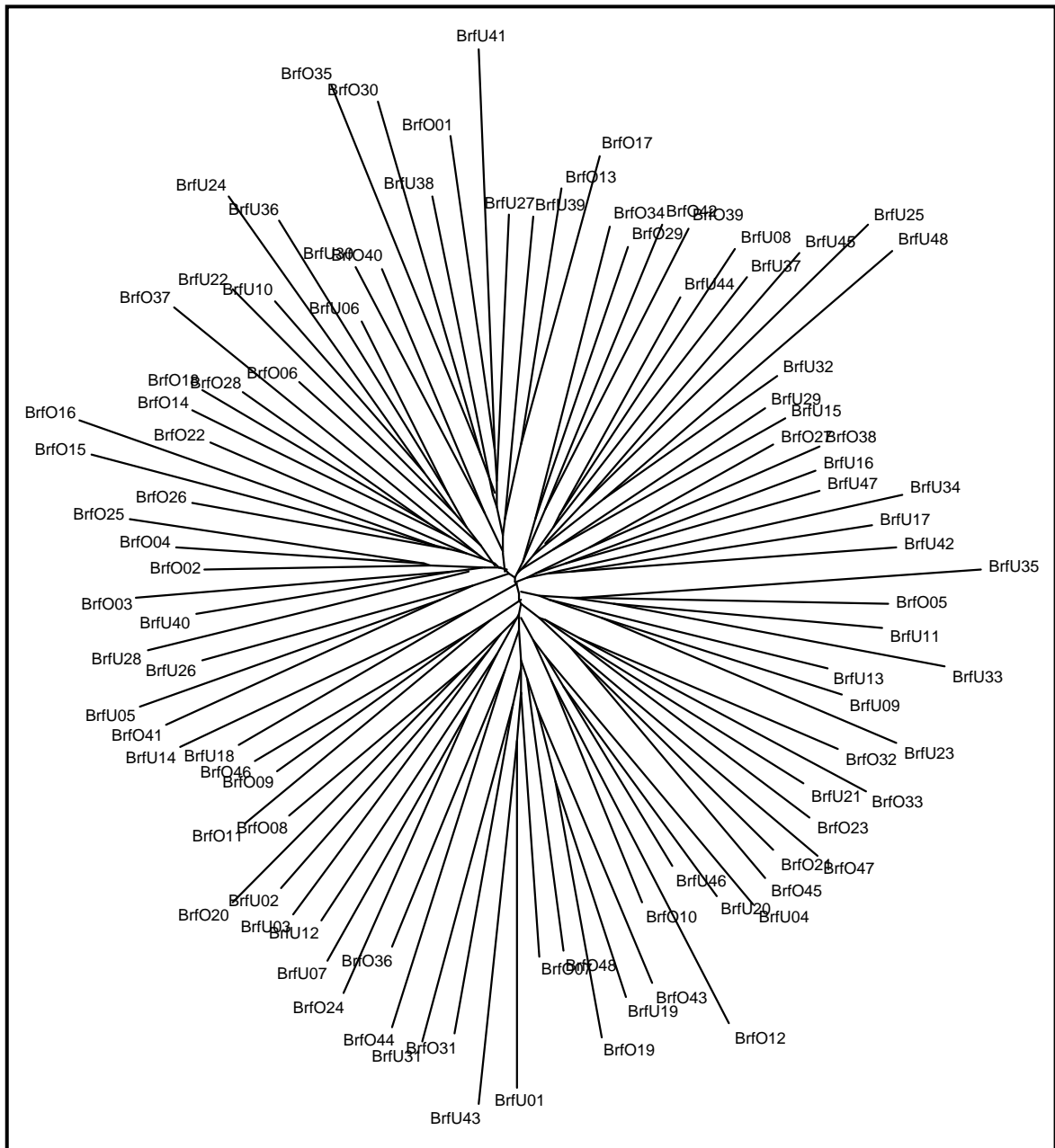


Abb. 14: Phylogramm *D. polymorpha* Population Brf aus PAUP

Jeder Ast steht für ein untersuchtes Individuum. Die Länge und Insertionsstelle des Astes bezeichnen das jeweilige Verwandtschaftsverhältnis. Die Bezeichnung setzt sich zusammen aus einem Kürzel von drei Buchstaben für den Entnahmeort (hier Brf=Bruttig-Fankel), einem „U“ für unterhalb bzw. „O“ für oberhalb und einer Nummerierung der Individuen.

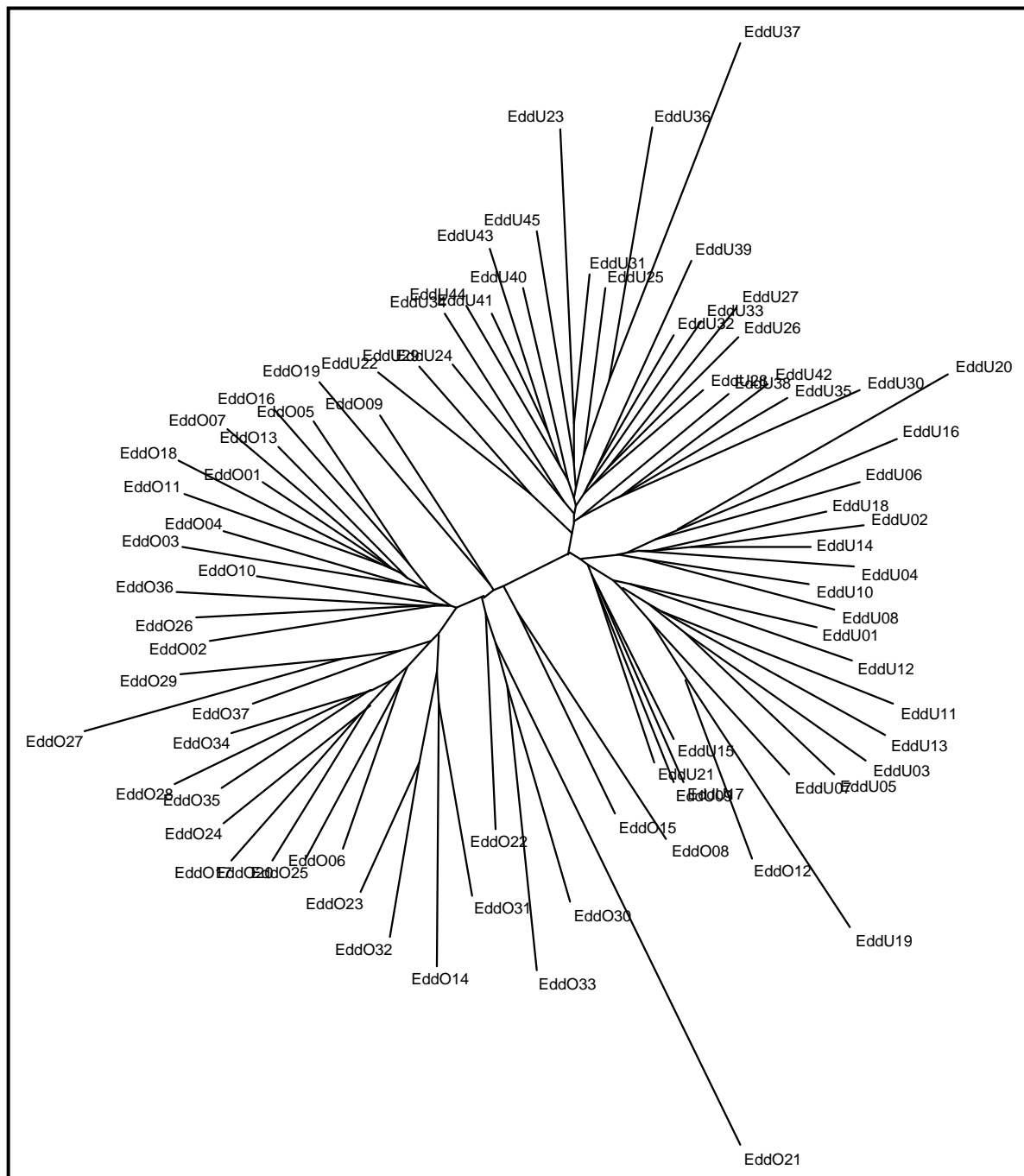


Abb. 15: Phylogramm *D. polymorpha* Population Edd aus PAUP

Jeder Ast steht für ein untersuchtes Individuum. Die Länge und Insertionsstelle des Astes bezeichnen das jeweilige Verwandtschaftsverhältnis. Die Bezeichnung setzt sich zusammen aus einem Kürzel von drei Buchstaben für den Entnahmeort (hier Edd=Eddersheim), einem „U“ für unterhalb bzw. „O“ für oberhalb und einer Nummerierung der Individuen.

3.1.2 Analyse auf Basis von Subpopulationen

Um Aussagen über die genetischen Unterschiede zwischen den Subpopulationen einzelner Entnahmestellen treffen zu können, wurde mit Hilfe von AFLPSurv die „genetic diversity“ H_j nach NEI & LI (1979) mit der Korrektur nach LYNCH & MILLIGAN (1994) sowie weitere Daten für jede Subpopulation berechnet (Tab. 3 und 4). Um eine statistische Signifikanz der gefundenen Unterschiede nachweisen zu können, wurde für jedes Subpopulationspaar einer Entnahmestelle zunächst ein F-Test durchgeführt, um zu ermitteln, ob sich die Varianzen signifikant voneinander unterschieden. Dies war bei keiner Population der Fall. Um ein konservatives Signifikanzniveau zu erhalten, wurde in den F- und t-Tests im Folgenden die Zahl der Freiheitsgrade mit der Anzahl der Tiere gleichgesetzt.

Tab.3: Ergebnis statistische Analysen AFLPSurv für einzelne Subpopulationen von *D.*

polymorpha

Fluss	Population	Ø gewertete Tiere	Ø Heterozygotie (unbiased)	Anzahl polymorphe Loci (5%-Level) von 580 gewerteten	Prozent polymorphe Loci (5%-Level)	Nei's gene diversity H_j	Standard-Abweichung (H_j)	Varianz (H_j)	% Varianz aufgrund Loci
Main	RanU	37,04	0,1394	266	45,9	0,15048	0,00654	0,000043	92,6
	RanO	40,68	0,1224	221	38,1	0,12898	0,00681	0,000046	95,1
	HarU	36,28	0,1611	302	52,1	0,16839	0,00724	0,000052	93,8
	HarO	43,66	0,1567	281	48,4	0,1655	0,00686	0,000047	93,9
	FauU	32,66	0,1207	229	39,5	0,13079	0,00637	0,000041	92,1
	FauO	32,33	0,1343	251	43,3	0,14386	0,00677	0,000046	92,7
	EddU	40,64	0,1614	312	53,8	0,17228	0,00678	0,000046	93,2
	EddO	33,03	0,1169	206	35,5	0,12364	0,00647	0,000042	93,5
Mosel	BrfU	47,67	0,1189	230	39,7	0,1267	0,00654	0,000043	94,7
	BrfO	47,34	0,1211	237	40,9	0,12935	0,00664	0,000044	94,7
	MudU	46,02	0,131	241	41,6	0,1391	0,00658	0,000043	94,1
	MudO	47	0,1259	226	39	0,13279	0,00659	0,000043	95
	LehU	43,98	0,1495	282	48,6	0,15837	0,00676	0,000046	93,8
	LehO	42,64	0,156	274	47,2	0,16377	0,00685	0,000047	93,8
Rhein	GamU	44,63	0,1322	253	43,6	0,14165	0,00699	0,000049	94,4
	GamO	42,66	0,1341	249	42,9	0,14465	0,00714	0,000051	94,4
	IffU	43,33	0,1429	233	40,2	0,14734	0,00723	0,000052	95,4
	IffO	45,04	0,1351	263	45,3	0,1458	0,00695	0,000048	93,8

Tab.4: Ergebnis Stat. Analysen AFLPSurv für einzelne Subpopulationen von *D. villosus*

Fluss	Population	Ø gewertete Tiere	Ø Heterozygotie (unbiased)	Anzahl polymorphe Loci (5%-Level) von 831 gewerteten	Prozent polymorphe Loci (5%-Level)	Nei's gene diversity H_j	Standard-Abweichung (H_j)	Varianz (H_j)	% Varianz aufgrund Loci
Main	GRanU	47,31	0,1221	329	39,6	0,1252	0,005	0,000025	94,3
	GRanO	46,38	0,1348	349	42	0,1383	0,0052	0,000027	94,4
	GHarU	28,62	0,1334	390	46,9	0,1395	0,005	0,000025	90
	GHarO	35,83	0,1467	389	46,8	0,1576	0,0056	0,000031	90,3
	GMulU	41,26	0,1403	369	44,4	0,144	0,0053	0,000028	94
	GMulO	44,64	0,1405	350	42,1	0,1451	0,0056	0,000031	95
Mosel	GBrfU	48	0,0801	224	27	0,087	0,0049	0,000024	95,5
	GBrfO	46,69	0,0892	240	28,9	0,095	0,005	0,000025	95,2
	GMudU	37,33	0,0539	153	18,4	0,0593	0,0042	0,000018	93,7
	GMudO	22,93	0,0742	192	23,1	0,0829	0,0047	0,000022	90,4
	GLehU	47,67	0,1084	265	31,9	0,1113	0,0054	0,00003	96
	GLehO	42,07	0,1141	322	38,7	0,1237	0,0055	0,00003	94
Rhein	GGamU	47,05	0,0922	243	29,2	0,0977	0,0052	0,000027	95,4
	GGamO	37,04	0,1131	304	36,6	0,1214	0,0055	0,00003	94
	GIfFU	23,64	0,0863	228	27,4	0,0971	0,0051	0,000026	91,2
	GIfFO	24	0,099	272	32,7	0,1117	0,0051	0,000026	89,7

Es zeigte sich für die beiden Tierarten ein unterschiedliches Bild: Die H_j -Werte von *D. villosus* waren oberhalb der Staustufe immer höher als unterhalb der Staustufe (Abb.17). Bis auf die Entnahmestelle GMul waren diese Unterschiede hochsignifikant (Tab.5). Um dies grafisch darzustellen, wurde der logarithmierte Quotient aus den Werten H_j Oberhalb/ H_j Unterhalb gebildet und aufgetragen (Abb.18).

Bei *D. polymorpha* dagegen waren die Unterschiede zwischen den Subpopulationen weniger eindeutig (Abb.16): Einerseits waren die Werte in drei von neun Fällen nicht und in einem Fall nur marginal signifikant unterschiedlich (Tab.5), darüber hinaus war die genetische Diversität in drei von fünf statistisch signifikanten Fällen in Subpopulationen von unterhalb einer Staustufe größer (Abb.18).

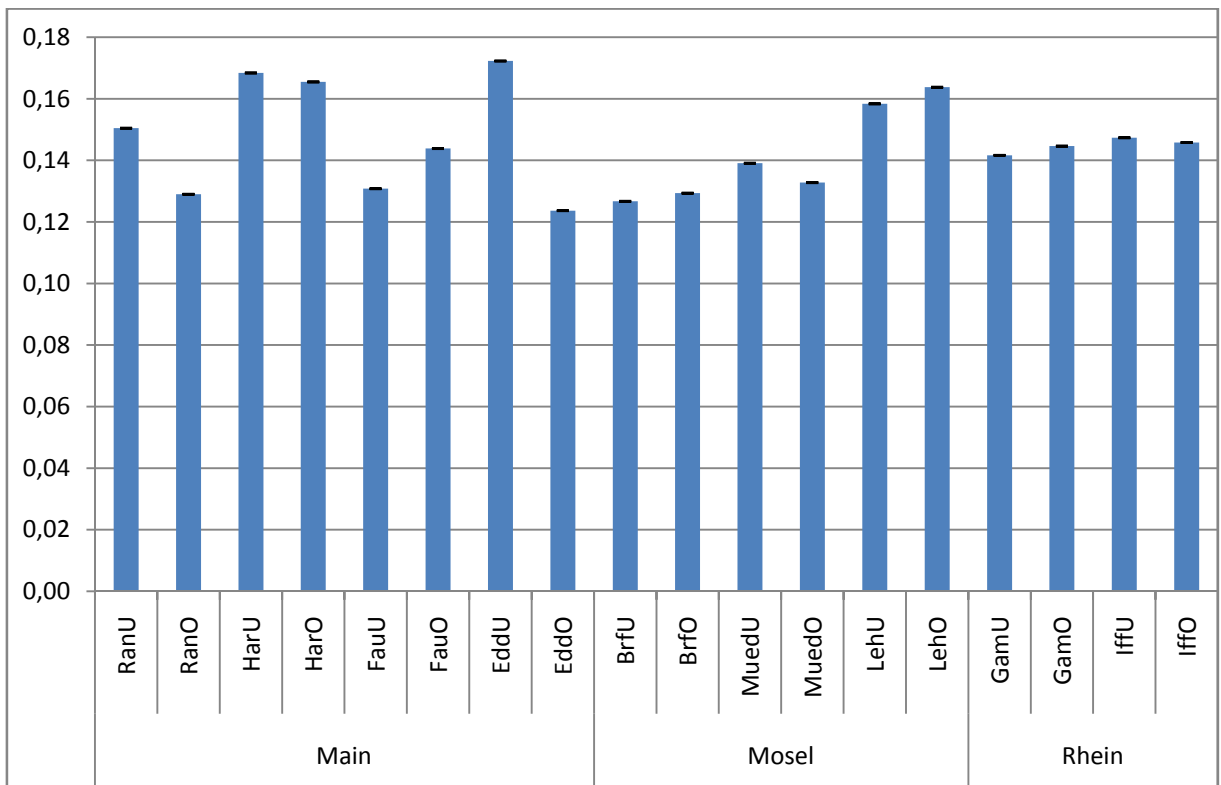


Abb.16: Gene Diversity H_j für jede Subpopulation von *D. polymorpha*

Aufgetragen sind die Werte für Nei's gene diversity H_j aus Tab.3 mit deren Varianz. Wegen deren geringer Größe ist sie nur ein wenigen Fällen darstellbar.

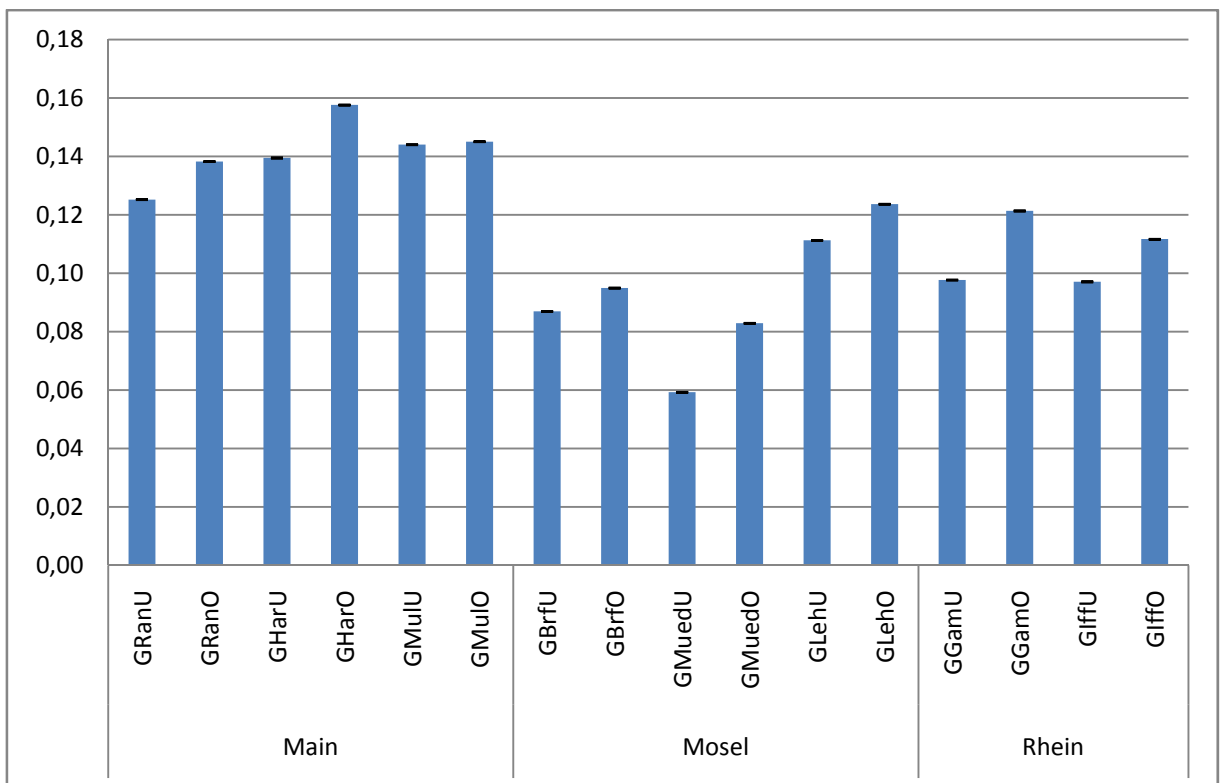


Abb.17: Gene Diversity H_j für jede Subpopulation von *D. villosus*

Aufgetragen sind die Werte für Nei's gene diversity H_j aus Tab.4 mit deren Varianz. Wegen deren geringer Größe ist sie nur ein wenigen Fällen darstellbar.

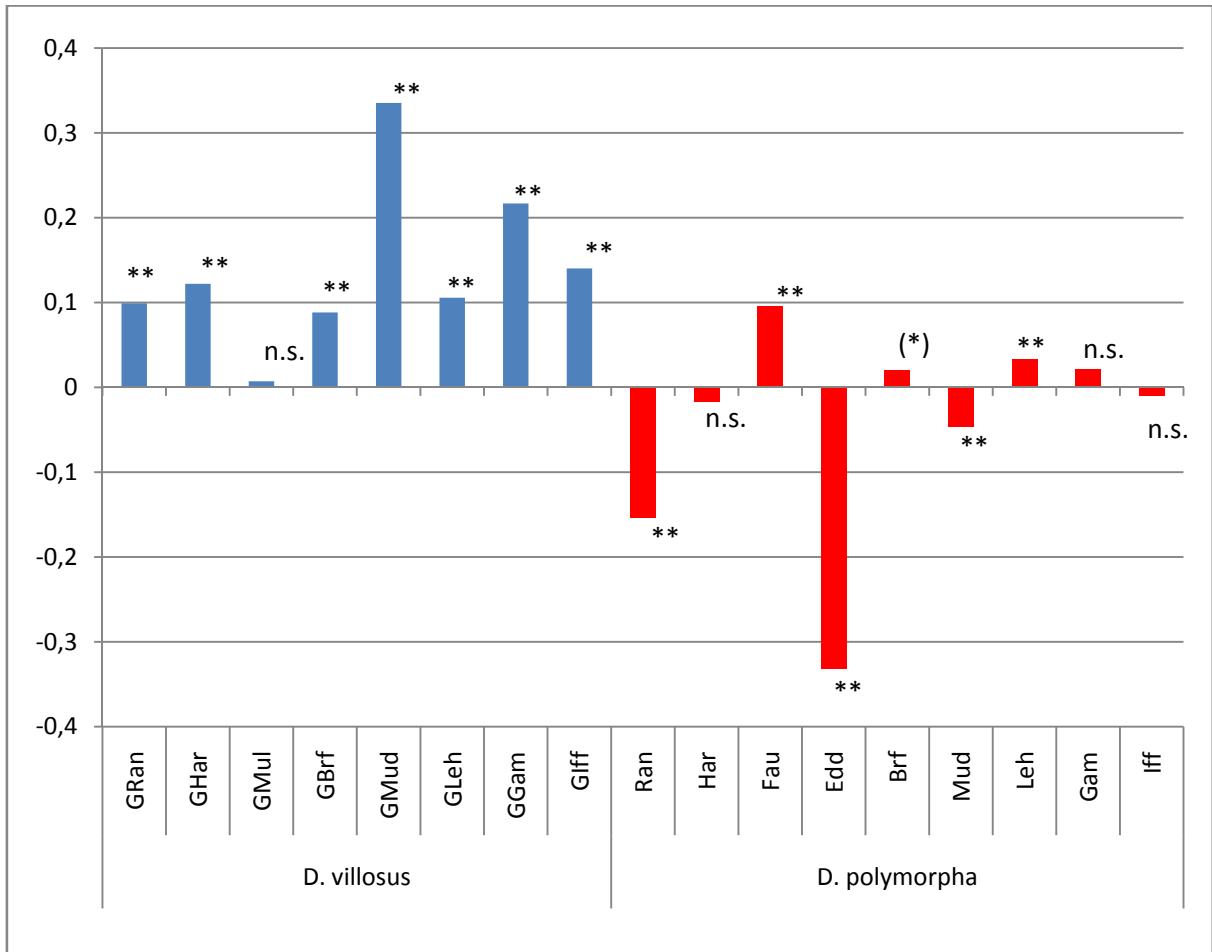


Abb.18: Logarithmus des Quotienten der Werte der gene diversity H_j Oberhalb / H_j Unterhalb

Um eine symmetrische Darstellung zu erhalten, wurden die für jede Population für *D. villosus* (links, blau) und *D. polymorpha* (rechts, rot) logarithmiert. Entsprechend der t-Tests (siehe Tab.5) wurden deren Signifikanzniveaus aufgetragen: **: hochsignifikant, (*): marginal signifikant, n.s.: nicht signifikant. Positive Werte stehen für eine größere genetische Diversität oberhalb der Staustufe als unterhalb, negative Werte zeigen eine kleinere genetische Diversität oberhalb der Staustufe als unterhalb.

Tab.5: Ergebnisse Signifikanzniveaus F- und T-Test für H_j

Aufgetragen sind die Ergebnisse des F- und t-Tests für einzelne Populationen. Ein nicht signifikanter Unterschied der Varianzen zwischen den beiden Subpopulationen (unterhalb / oberhalb) einer Population, der durch den **F-Test** nachgewiesen wird, erlaubt die Durchführung des **t-Tests**, der die beiden Werte der gene diversity H_j der jeweiligen zwei Subpopulationen **einer** Population auf Signifikanz testet. Das Ergebnis des Binomialtests, der über **alle** Subpopulationen oberhalb vs. unterhalb auf einen signifikanten Unterschied von H_j testet, ist unter „U/O“ ebenfalls aufgetragen.

		p-Wert F-Test	p-Wert T-test
<i>D. polymorpha</i>	Ran	0,41	<0,0001*
	Har	0,37	0,073
	Fau	0,37	<0,0001*
	Edd	0,4	<0,0001*
	Brf	0,47	0,0529(*)
	BrfU_(i+a)	0,41	<0,0001*
	BrfO_(i+a)	0,46	0,8813
	Mud	0,5	<0,0001*
	Leh	0,47	0,0005*
	Gam	0,45	0,0518
	Iff	0,39	0,3119
	U/O	Binomialtest:	p=0,25
<i>D. villosus</i>	GRan	0,397	<0,0001*
	GHar	0,25	<0,0001*
	GMul	0,37	0,3871
	GBrf	0,44	<0,0001*
	GBrfU_(i+a)	0,46	0,7304
	GBrfO_(i+a)	0,36	<0,0001*
	GMud	0,29	<0,0001*
	GLeh	0,49	<0,0001*
	GGam	0,36	<0,0001*
	GIf	0,5	<0,0001*
	U/O	Binomialtest:	p=0,004*

Mit Hilfe des Binomialtests wurde abschließend für jede Tierart geprüft, ob die Unterschiede der Größe der genetischen Diversität im Hinblick auf ihre Verteilung oberhalb/unterhalb über alle Subpopulationen statistisch signifikant waren. Bei *D. villosus* hatten, wie beschrieben, alle Subpopulationen „oberhalb“ eine größere genetische Diversität als unterhalb. Dies war auch statistisch hochsignifikant (p=0,004). Bei *D. polymorpha* war das Ergebnis sehr inhomogen und erwartungsgemäß auch statistisch nicht signifikant (p=0,25) (Tab.5).

Als weiteres Maß wurde der F_{ST}-Wert für jede Subpopulation herangezogen (siehe 2.7.2.5). Dieses Maß erwies sich als sehr empfindlich gegenüber genetischen Unterschieden in den Subpopulationen; die von AFLPSurv berechneten Werte erwiesen sich bei beiden Tierarten

ausnahmslos als statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber einer von AFLPSurv generierten zufälligen Verteilung („ F_{ST} bei Permutation“) (Tab.6, 7).

Tab.6: F_{ST} -Werte aus AFLPSurv für *D. polymorpha*

		F_{ST}	S.D. F_{ST}	Var F_{ST}	F_{ST} bei	F_{ST} bei	Signifikanz
					Permutation	Permutation	Fehler 1.Art
					95%Level	99%Level	p
Main	Ran	0,1137	0,0678	0,0046	0,0055	0,0096	$<10^{-6}$
	Har	0,0684	0,0081	0,0001	0,0053	0,0087	$<10^{-6}$
	Fau	0,0644	0,0444	0,0020	0,0060	0,0107	$<10^{-6}$
	Edd	0,0900	0,1460	0,0213	0,0049	0,0087	$<10^{-6}$
Mosel	Brf	0,0410	0,0103	0,0001	0,0018	0,0032	0,0018
	BrfU _(i+a)	0,0124	0,0471	0,0022	0,0025	0,0051	0,0001
	BrfO _(i+a)	0,0035	0,0011	0,0000	0,0034	0,0063	0,0242
	Mud	0,0330	0,0224	0,0005	0,0030	0,0053	$<10^{-6}$
	Leh	0,0180	0,0165	0,0003	0,0033	0,0056	$<10^{-6}$
Rhein	Gam	0,0208	0,0102	0,0001	0,0023	0,0040	$<10^{-6}$
	Iff	0,0266	0,0051	0,0000	0,0042	0,0063	$<10^{-6}$

Tab.7: F_{ST} -Werte aus AFLPSurv für *D. villosus*

		F_{ST}	S.D. F_{ST}	Var F_{ST}	F_{ST} bei	F_{ST} bei	Signifikanz
					Permutation	Permutation	Fehler 1.Art
					95%Level	99%Level	p
Main	GRan	0,0442	0,0472	0,0022	0,0053	0,0090	$<10^{-6}$
	GHar	0,0973	0,0548	0,0030	0,0050	0,0089	$<10^{-6}$
	GMul	0,0223	0,0035	0,0000	0,0076	0,0131	0,0002
Mosel	GBrf	0,0054	0,0438	0,0019	0,0020	0,0039	0,0011
	GBrfU _(i+a)	0,0110	0,0027	0,0000	0,0033	0,0065	0,0004
	GBrfO _(i+a)	0,0399	0,0762	0,0058	0,0043	0,0086	$<10^{-6}$
	GMud	0,0179	0,1588	0,0252	0,0040	0,0069	$<10^{-6}$
	GLEh	0,0317	0,0510	0,0026	0,0102	0,0129	$<10^{-6}$
Rhein	GGam	0,0311	0,1034	0,0107	0,0280	0,0490	$<10^{-6}$
	Giff	0,0666	0,0650	0,0042	0,0056	0,0107	$<10^{-6}$

3.1.2.1 Bruttig-Fankel

Die insgesamt vier Entnahmestellen der Population Bruttig-Fankel wurden zunächst als eigenständige Subpopulationen behandelt, um die genetische Struktur auf diesem Niveau genauer bestimmen zu können. Dazu wurde mit Hilfe des Programms PHYLIP aus den Genetischen Distanzen ein Phenogramm dieser vier Subpopulationen für jede Tierart erstellt. Die Ergebnisse unterschieden sich deutlich voneinander (Abb.19): Es zeigte sich bei *D. polymorpha* ein Bild, das hervorragend mit den Strömungsverhältnissen korreliert: Der Ort mit der stärksten Strömung (unmittelbar hinter dem Wehr) BrfUi zeigte die stärksten genetischen Unterschiede im Verwandtschafts-Baum (Abb.19 r.) und mit $H_j=0,124$ die kleinste Genetische Diversität (Tab.8). Auch korrelierte der niedrigere Wert von H_j gut mit dessen niedriger Bandenzahl (Tab.8). Die beiden oberhalb des Wehrs liegenden Entnahmeorte Oa und Oi waren nach dem UPGMA-Verfahren praktisch nicht unterscheidbar (was in Abb.17 r. durch eine Astlänge von 0 grafisch dargestellt ist), und die Genetische Diversität lag bei beiden bei $H_j=0,133$ (Tab.8).

Dieses stimmige und den Erwartungen entsprechende Ergebnis von *D. polymorpha* am Untersuchungsort Bruttig-Fankel ist bei *D. villosus* so nicht zu erkennen. Hier grenzt sich GBrfOi, also die dem Wehr oberhalb am Nächsten liegende Subpopulation, im UPGMA-Baum zu den anderen Subpopulationen ab. Die Genetische Diversität ist mit $H_j=0,104$ deutlich von allen anderen Werten verschieden (Tab.8). Wenn man die Menge der Banden in den einzelnen Subpopulationen betrachtet, wird schnell klar, wie der höhere H_j -Wert zustande kommt: Im Durchschnitt haben die Individuen der Entnahmestelle GBrfOi 12-15 Banden mehr als die andere Subpopulation oberhalb des Wehrs (Tab.8).

Für die weitere Analyse der großräumigen Verwandtschaftsverhältnisse wurden die vier Subpopulationen in zwei Untergruppen (oberhalb und unterhalb des Wehrs) zusammengefasst, um sie ebenso wie die Populationen aller anderen Entnahmestellen behandeln zu können.

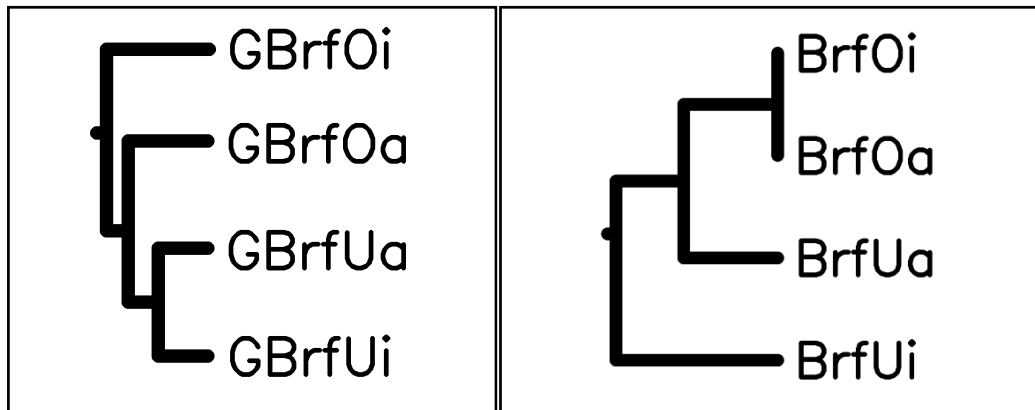


Abb.19: Phenogramm (UPGMA) *D. villosus* (l.) und *D. polymorpha* (r.) der vier Entnahmestellen bei Bruttig-Fankel

Tab.8: Durchschn. Bandenanzahl pro Individuum und Genetische Diversität in Subpopulationen von Brf

Population	Ø Bandenanzahl	Gen. Div. H_j
GBrfOa	104,75	0,0886
GBrfOi	118,70	0,1040
GBrfUi	107,04	0,0892
GBrfUa	103,54	0,0897
BrfOa	111,75	0,1332
BrfOi	111,04	0,1335
BrfUi	104,63	0,1237
BrfUa	115,50	0,1361

3.2 Mittel- und großräumige Untersuchungen

3.2.1. Ergebnisse Admixture-Analyse

Ergänzend zu den Genetischen Diversitäten zwischen den Subpopulationen wurde mit BAPS eine Admixture-Analyse durchgeführt, die ohne Vorgaben über die tatsächlichen Verhältnisse versucht, direkt anhand der Allelfrequenzen über die Bayes'sche Inferenz eine Zuordnung der Individuen zu einer vom Programm geschätzten Einteilung in Populationen vorzunehmen.

3.2.1.1 *Dreissena polymorpha*

In den Abb. 20 und 21 sind die Rheinpopulationen von *D. polymorpha* dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass BAPS hier zwei Populationen postuliert und jeweils die beiden zusammengehörigen Subpopulationen als eng verwandt einstuft. In Abb.20 ist zunächst die eindeutige Zuordnung der Individuen zu den beiden Populationen aufgetragen. Ein Individuum bei IffU fällt genetisch heraus und wird von den beiden Populationen ausgeschlossen. Es zeigt sich eine klare und sehr eindeutige Zuordnung der Individuen zu den beiden Populationen; nur einzelne Proben, eine bei IffO und sechs bei GamO, werden der jeweils anderen Population zugeordnet.

Auf Basis dieser Daten wird jetzt das Admixture clustering durchgeführt (Abb.21). Das Bild stellt letztendlich eine genauer aufgelöste Variante des ersten Analyseschrittes dar; hier ist nämlich erkennbar, wie sehr jedes Individuum Eigenschaften der postulierten Populationen trägt. Auffällig ist, dass die Individuen oberhalb der Wehre grafisch einen größeren genetischen Anteil der jeweils anderen Population zeigen. Dies ist besonders bei GamO gut zu erkennen. Bei Betrachtung der H_j -Werte findet sich allerdings kein entsprechendes Bild: Hier sind die Unterschiede zwischen den Subpopulationen über alle Individuen nicht signifikant (Abb.18). Offensichtlich sind hier die Abweichungen der einzelnen Individuen nicht groß genug, um in der auf der Ebene der Subpopulationen in Erscheinung zu treten.

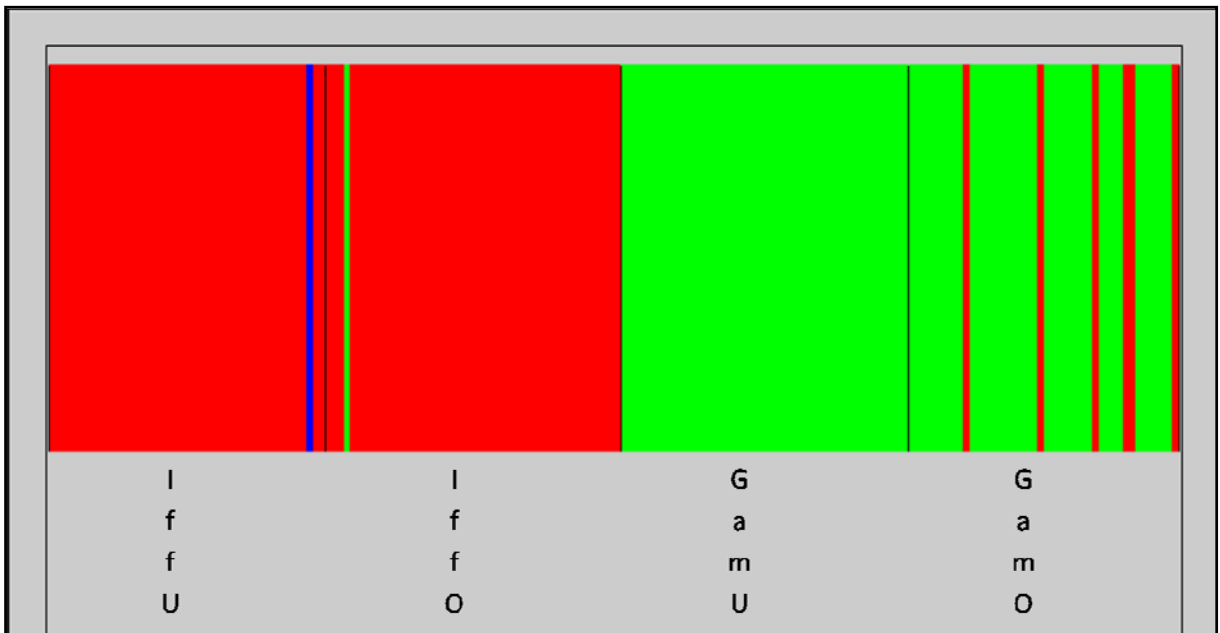


Abb.20: Individuen-clustering Rheinpopulationen von *D. polymorpha*

Abgebildet sind die untersuchten vier Subpopulationen aus Iffezheim (IffU und IffO) sowie Gamsheim (GamU und GamO). Jedes Individuum wird durch einen senkrechten Strich in einer Farbe dargestellt, die die Zugehörigkeit zu einer der von BAPS postulierte Gruppen wiedergibt. Das Programm ordnet die Individuen der beiden Iffezheimer Subpopulationen größtenteils einer Gruppe zu (rot) und die Individuen der beiden Gamsheimer Subpopulationen meist einer anderen (grün). Einzelne Individuen werden jeweils der anderen Gruppe zugehörig eingestuft, und ein Individuum aus IffU (blau) fällt als eigene „outgroup“ komplett aus der Einordnung.

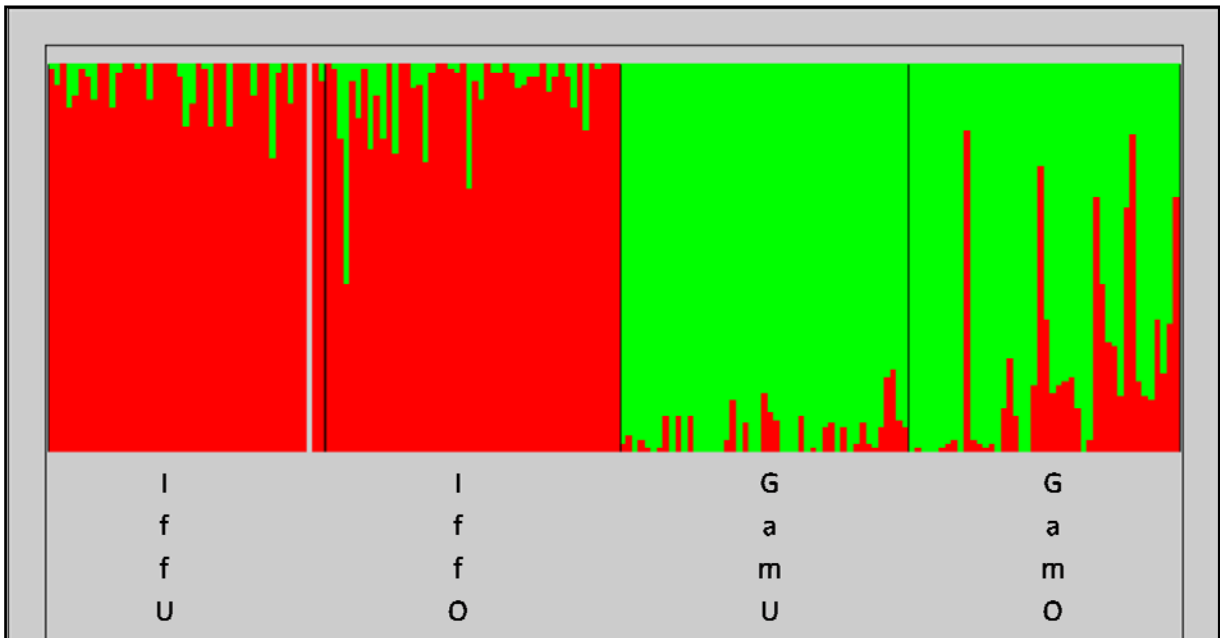


Abb.21: Admixture-Zuordnung Rheinpopulationen von *D. polymorpha*

Abgebildet sind die untersuchten vier Subpopulationen aus Iffezheim (IffU und IffO) sowie Gamsheim (GamU und GamO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

Die Moselpopulationen von *D. polymorpha* zeigen ein ähnlich strukturiertes Bild wie die Rheinpopulationen: Auch hier sind die beiden jeweils zusammengehörigen Subpopulationen eng verwandt; BAPS findet für jede Staustufe eine Population, (Abb.22), wobei auch hier nur insgesamt drei Tiere abweichend von ihrem Fundort eingeordnet werden. (Die Farbgebung ist immer zufällig, daher weichen die Farbzusordnungen in Abb.22 und 23 voneinander ab). Die Admixture-Analyse (Abb.23) zeigt auch hier wieder ein ähnliches Bild wie in den Rheinpopulationen. Auffällig ist die relative Homogenität bei der Population Brf; dies korreliert auch damit, dass die Werte der genetischen Diversität in der Mosel bei Brf am niedrigsten sind (Tab.3).

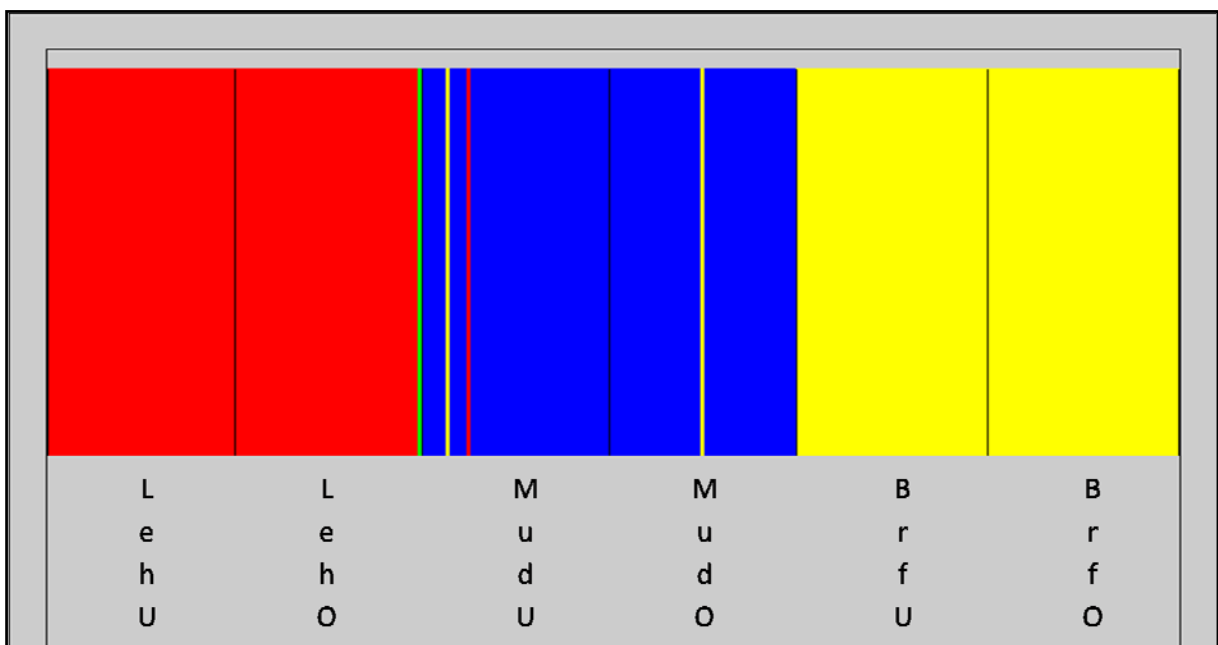


Abb.22: Individuen-Clustering Moselpopulationen von *D. polymorpha*

Abgebildet sind die untersuchten sechs Subpopulationen aus Müden (MudU, MudO), Lehmen (LehU, LehO) sowie Bruttig-Fankel (BrfU, BrfO). Jedes Individuum wird durch einen senkrechten Strich in einer Farbe dargestellt, die die Zugehörigkeit zu einer der von BAPS postulierten Gruppen wiedergibt. Das Programm ordnet die Individuen der Subpopulationen jeweils einer Gruppe zu (farbig dargestellt durch rot, blau, gelb). Einzelne Individuen von Müden werden jeweils der anderen Gruppe zugehörig eingestuft (zweimal gelb für die Bruttig-Fankel-Gruppe, einmal rot für die Lehmen-Gruppe). Ein Individuum von LehO (grün) fällt als eigene „outgroup“ komplett aus der Einordnung.

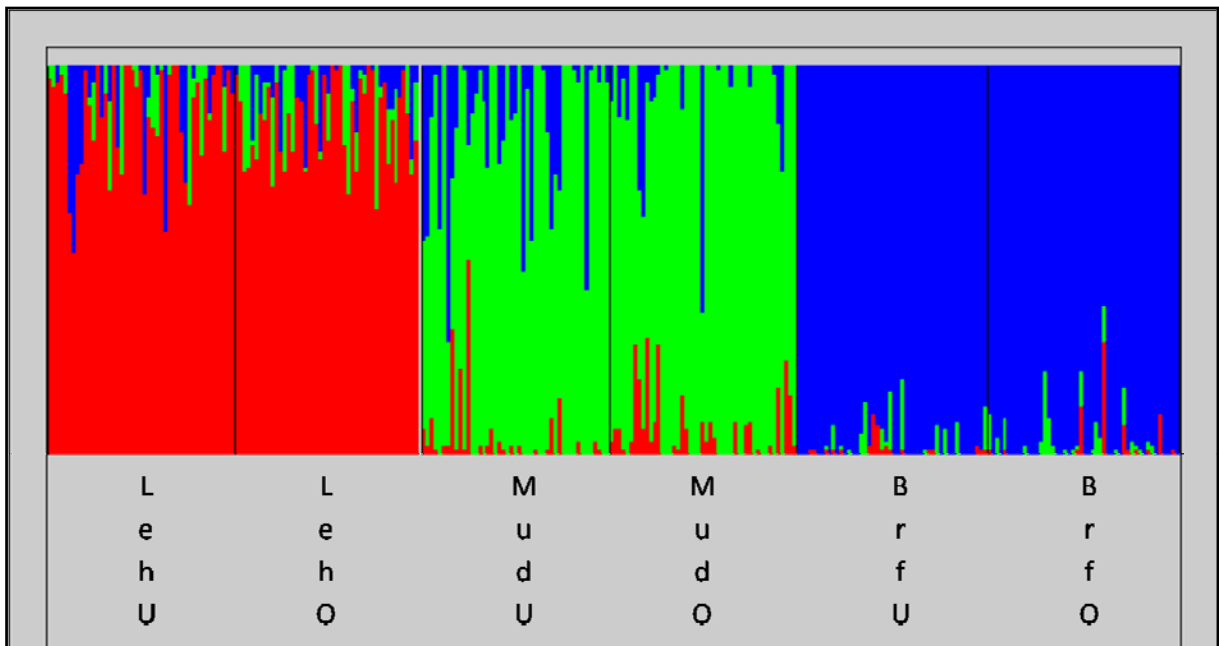


Abb.23: Admixture-Zuordnung Moselpopulationen von *D. polymorpha*

Abgebildet sind die untersuchten sechs Subpopulationen Müden (MudU, MudO), Lehmen (LehU, LehO) sowie Bruttig-Fankel (BrfU, BrfO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

Nicht ganz so eindeutig präsentiert sich das Bild bei der Analyse der Mainpopulationen. Es werden von BAPS weniger Populationen geschätzt, als tatsächlich in die Analyse eingingen. Auch ist die Zuordnung der „echten“ Subpopulationen zu den geschätzten Populationen nicht so klar wie in den Tests für Rhein und Mosel, es werden räumlich getrennte Subpopulationen zu einer Gruppe zusammengefasst, so z.B. RanU und EddU; auch RanO, FauU und EddO werden als eng verwandt eingestuft (Abb.24). Dies spiegelt sich sehr gut im UPGMA-Phenogramm (Abb.28) aus den gene diversity-Daten wider: Auch hier clustern die genannten Subpopulationen entsprechend zusammen. Die beiden unterschiedlichen Analysemethoden zeigen hier also ein äußerst ähnliches Ergebnis.

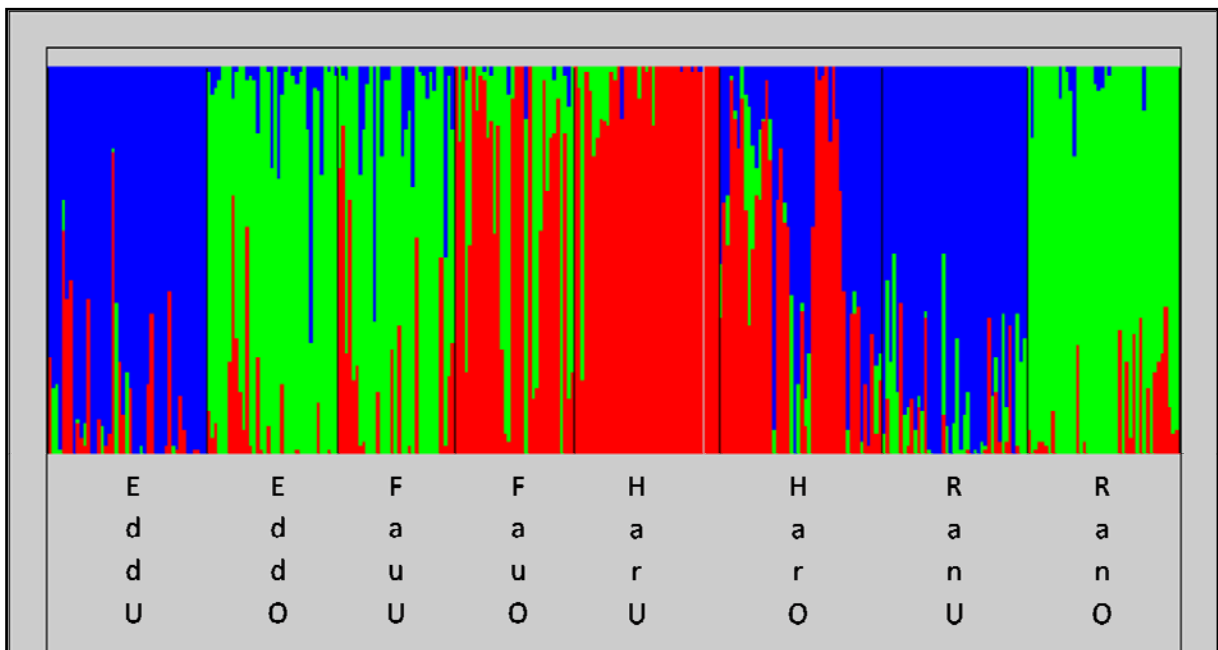


Abb.24: Admixture-Zuordnung Mainpopulationen von *D. polymorpha*

Abgebildet sind die untersuchten acht Subpopulationen aus Eddersheim (EddU, EddO), Faulbach (FauU, FauO), Harrbach (HarU, HarO) sowie Randersacker (RanU, RanO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

3.2.1.2 *Dikerogammarus villosus*

Bei *D. villosus* wiederholt sich das Ergebnis von *D. polymorpha* weitgehend für die Rhein- und Moselpopulationen (Abb.25 und 26): Sie werden von BAPS sauber den „echten“ Populationen entsprechend zugeordnet und zeigen eine gute Trennung. Bei der Analyse der Mainpopulationen (Abb.27) werden im Gegensatz zu der Analyse von *D. polymorpha* mehr Populationen geschätzt, als tatsächlich beprobt wurden; auch hier aber entspricht die Zuordnung der Subpopulationen nicht den tatsächlichen Entnahmestellen. Interessanterweise ist das von BAPS dargestellte Ergebnis deutlich im UPGMA-Phenogramm wiederzufinden (Abb.31): Die Subpopulationen GRanU und GHarU z.B. werden von beiden Analysen als verwandt eingestuft. GHarO unterscheidet sich hier deutlich von allen anderen Subpopulationen und wird als eigenständige Population eingestuft; BAPS schlägt zudem eine (blau dargestellte) zusätzliche Population vor, deren Individuen sich in allen Subpopulationen finden.

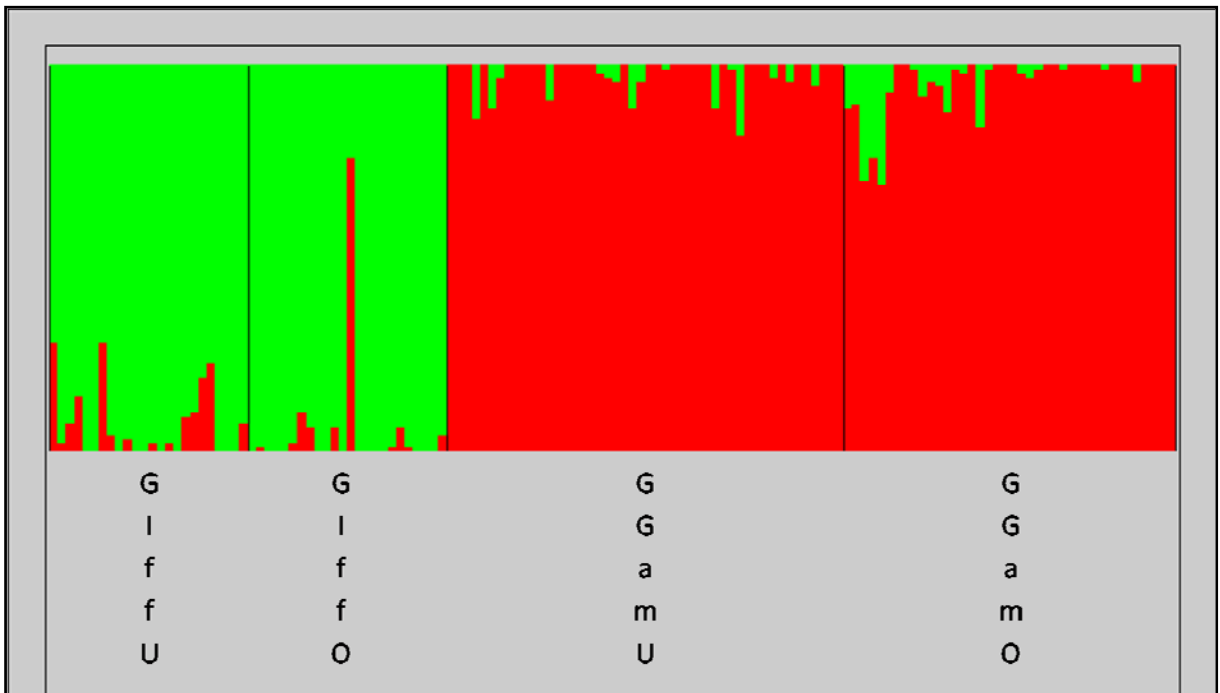


Abb.25: Admixture-Zuordnung Rheinpopulationen von *D. villosus*

Abgebildet sind die untersuchten vier Subpopulationen aus Iffezheim (GiffU und GiffO) sowie Gamsheim (GGamU und GGamO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

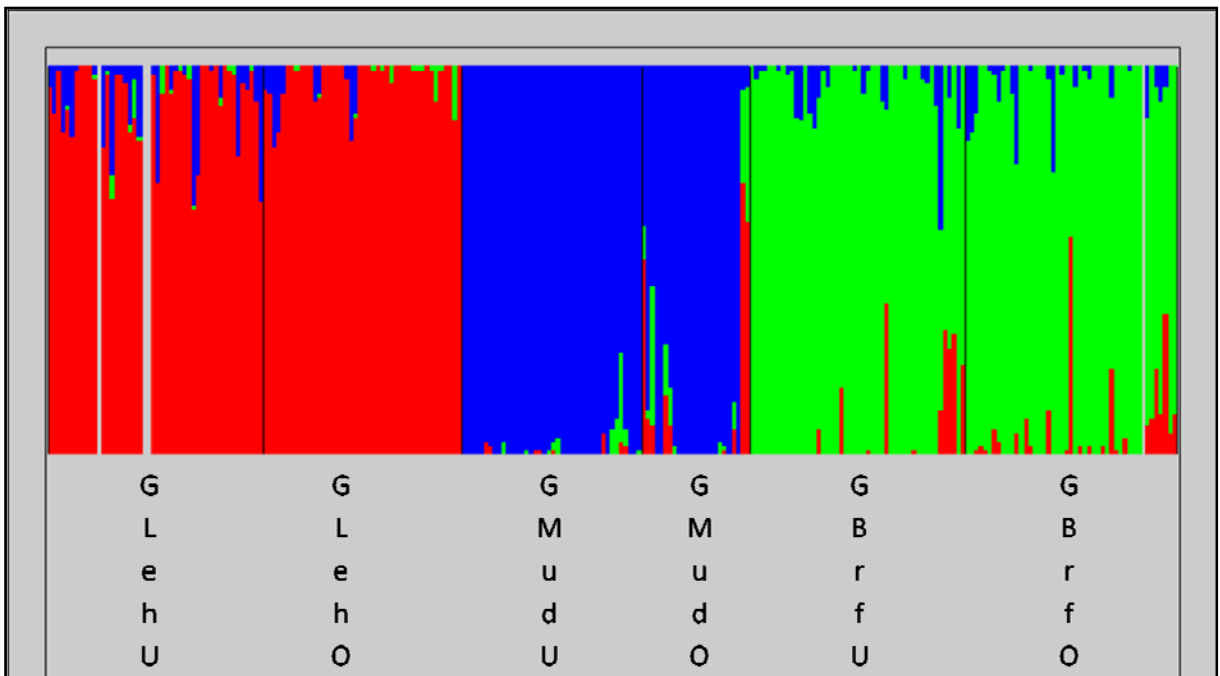


Abb.26: Admixture-Zuordnung Moselpopulationen von *D. villosus*

Abgebildet sind die untersuchten sechs Subpopulationen Müden (GMudU, GMudO), Lehmen (GLehU, GLehO) sowie Bruttig-Fankel (GBrfU, GBrfO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

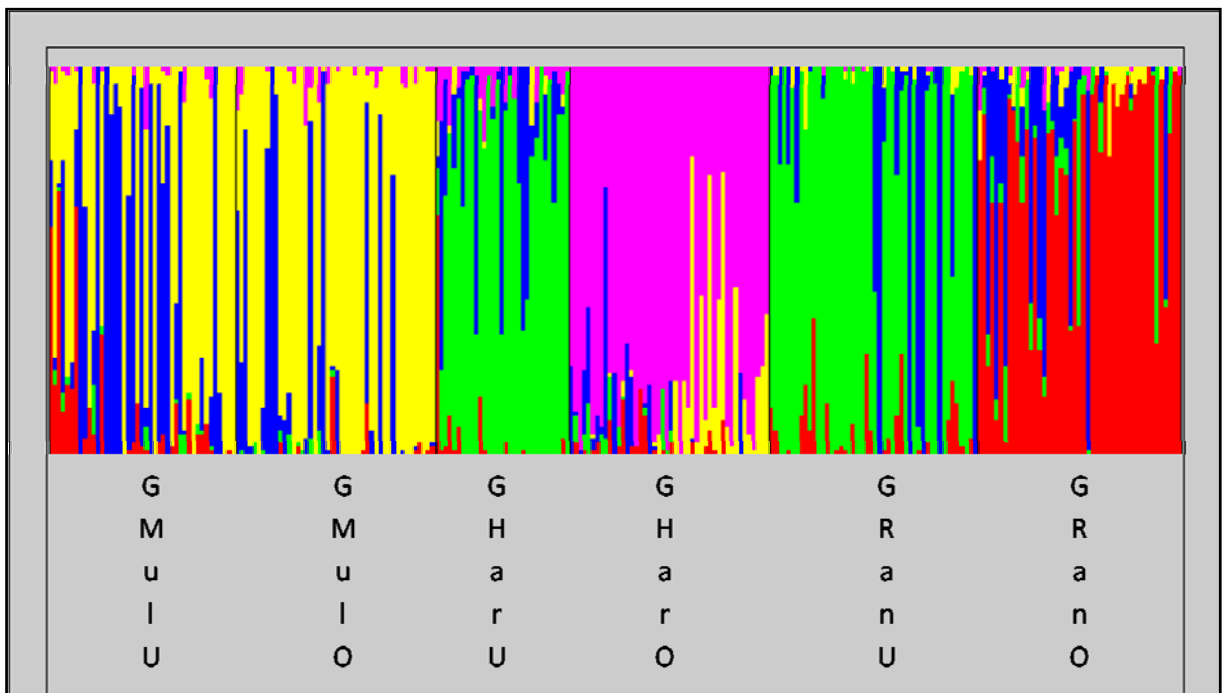


Abb.27: Admixture-Zuordnung Mainpopulationen von *D. villosus*

Abgebildet sind die untersuchten sechs Subpopulationen aus Mülheim (GMuLU, GMuLO), Harrbach (GHaLU, GHaLO) sowie Randersacker (RaLU, RaLO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

3.2.2 Phenogramme aus AFLPSurv

Die mit Hilfe von AFLPSurv gewonnenen Genetischen Diversitäten wurden genutzt, um mit Hilfe des Programmpaketes PHYLIP Verwandtschafts-Bäume (Phenogramme) zu erstellen. Die bootstrap-Werte sind (in Prozent) am jeweiligen Ast aufgetragen (Abb. 28, 29, 31, 32).

3.2.2.1 *Dreissena polymorpha*

Die Bäume beider Distanz-Methoden zeigen bei *D. polymorpha* ein sehr ähnliches Bild.

Zunächst ist auffällig, dass die Populationen ausnahmslos passend zu ihrer Herkunft aus den verschiedenen Flüssen „clustern“ (Abb.28, 29): Alle Main-, Mosel- und Rheinpopulationen liegen auf jeweils eigenen Ästen. Auf Flussebene enger verwandt zeigen sich mit einer Konfidenz von 85,8% die Flüsse Mosel (gelb unterlegt) und Main (grün unterlegt); die Populationen des Rheins (rot unterlegt) bilden eine eigene Gruppe. Hier sind sich also die

beiden Grundwasser-gespeisten Flüsse deutlich ähnlicher als der Schmelzwasser-gespeiste Rhein.

Sowohl in den bootstrap-Werten der Mosel als auch des Rheins zeigt sich eine hohe Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Lediglich innerhalb der Organisation der Main-Populationen ergeben sich bootstrap-Werte von unter 75%, teilweise von unter 50%. Hier ist die Hierarchie der einzelnen Subpopulationen nicht so klar strukturiert wie innerhalb der Subpopulationen der anderen Flüsse, deren Werte durchweg um 100% liegen; allerdings ist die Zuordnung der Subpopulationen bei beiden Methoden identisch. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Daten aus den Admixture-Analysen, bei denen sich mit Hilfe einer anderen statistischen Methode ein ähnliches Resultat ergab.

Bei den beiden Flüssen Mosel und Rhein liegen die zusammengehörigen Subpopulationen immer und mit hoher Zuverlässigkeit auf benachbarten Ästen (bootstrap-Werte nahe oder gleich 100%). Die Astlängen geben die Enge der genetischen Verwandtschaft an; es wird auch hier nochmals deutlich, dass sich die Subpopulationen BrfU und BrfO nur sehr schwach unterscheiden (siehe Abb.19 r.). Sehr schön ist auch die relative genetische Isoliertheit der beiden Rheinpopulationen vom Rest zu erkennen, wobei sich die jeweiligen Subpopulationen des Rheins auf einer ähnlich starken Verwandtschaftsebene bewegen wie die der Mosel (mit Ausnahme von Brf).

Die im Vergleich zu den Populationen aus Mosel und Rhein relativ langen Äste zwischen den Subpopulationen im Main zeigen wieder, dass die sehr enge Verwandtschaft zusammengehöriger Subpopulationen, wie sie sich in den anderen Flüssen präsentiert, hier nicht gefunden werden kann.

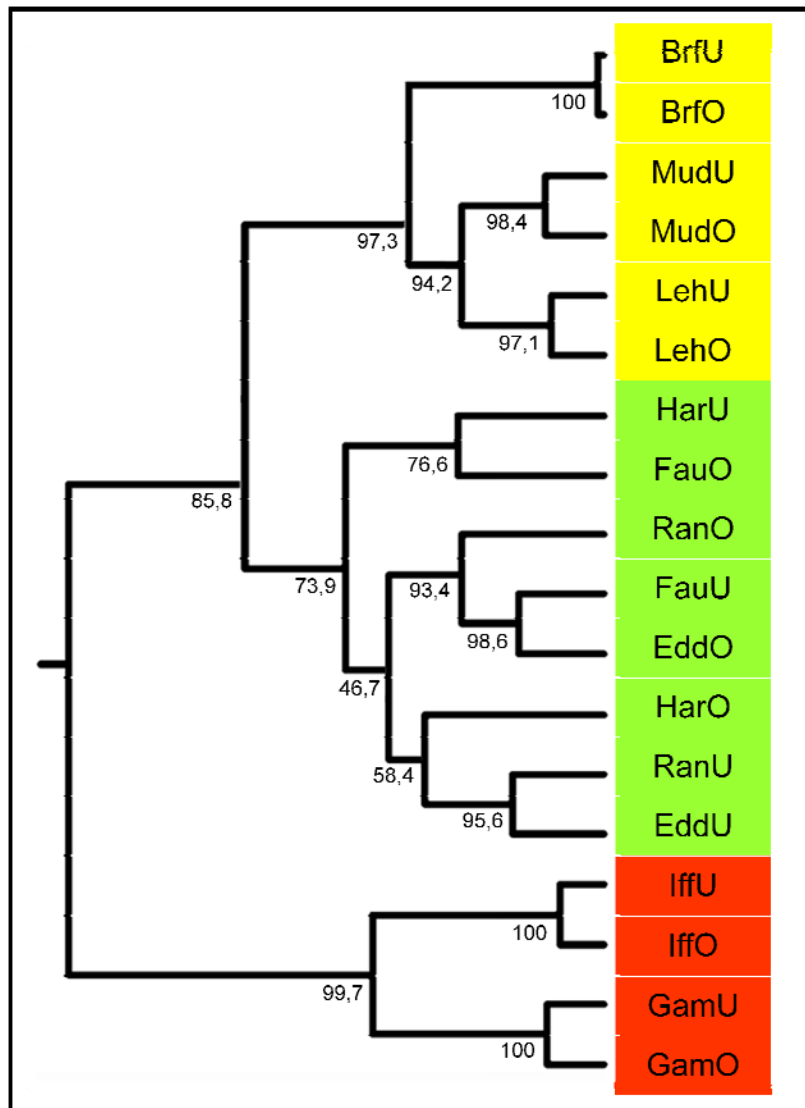


Abb.28: Phenogramm *D. polymorpha* (UPGMA)

Von PHYLIP unter Verwendung der Daten aus AFLPSurv erstellter Verwandtschaftsbaum nach der UPGMA-Methode. Die Astlängen entsprechen dem errechneten genetischen Abstand zwischen den Subpopulationen. Im Phenogramm sind die der jeweiligen Gruppierung zugehörigen Bootstrap-Werte in Prozent aufgetragen. Bei einem Wert von 100% wurde die entsprechende Gruppierung in allen erstellten Bootstrap-Bäumen gefunden.

Die Farbgebung der Populationen codiert ihre Herkunft: Populationen aus der Mosel sind gelb, Populationen aus dem Main sind grün und Populationen aus dem Rhein sind rot unterlegt.

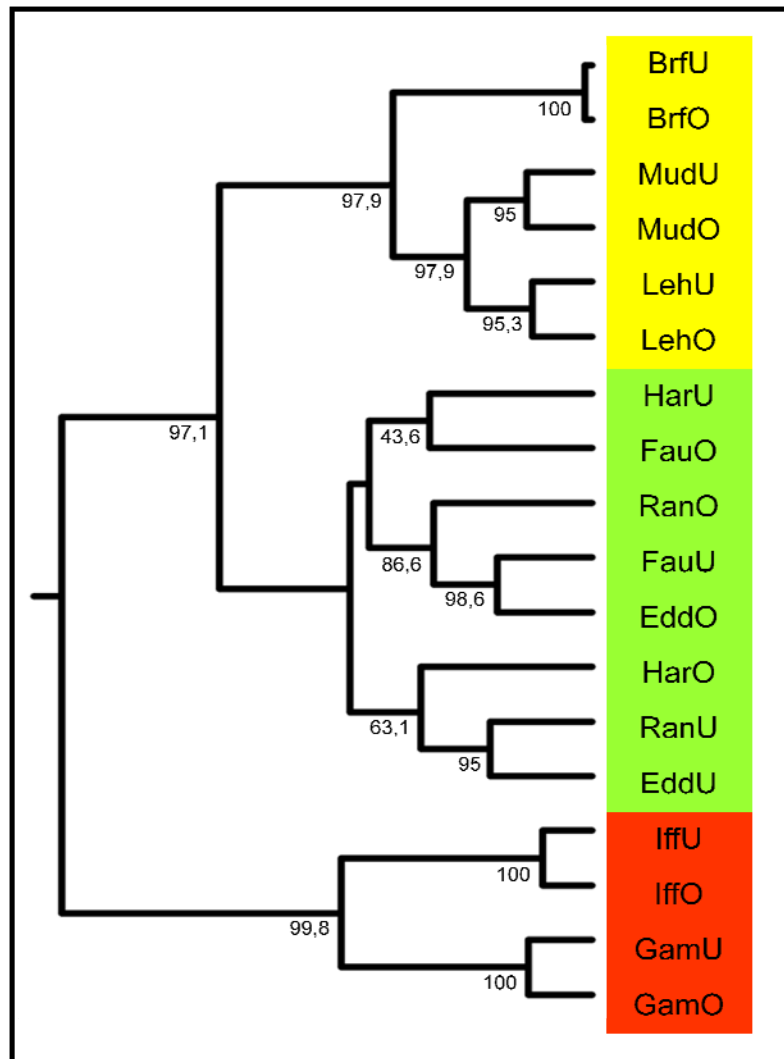


Abb.29: Phenogramm *D. polymorpha* (Fitch-Margoliash)

Von PHYLIP unter Verwendung der Daten aus AFLPSurv erstellter Verwandtschaftsbaum nach der Fitch-Margoliash-Methode. Die Astlängen entsprechen dem errechneten genetischen Abstand zwischen den Subpopulationen. Im Phenogramm sind die der jeweiligen Gruppierung zugehörigen Bootstrap-Werte in Prozent aufgetragen. Bei einem Wert von 100% wurde die entsprechende Gruppierung in allen erstellten Bootstrap-Bäumen gefunden. Die Farbgebung der Populationen codiert ihre Herkunft: Populationen aus der Mosel sind gelb, Populationen aus dem Main sind grün und Populationen aus dem Rhein sind rot unterlegt.

3.2.2.2 *Dikerogammarus villosus*

Bei *D. villosus* sind im Gegensatz zu *D. polymorpha* keine so deutlichen großräumig phylogeographische Muster zu erkennen (Abb.31 und 32). Die Populationen der Flüsse Mosel und Main bilden zwei weit voneinander entfernte gemischte Gruppen; die Populationen des Mains clustern zwar im UPGMA-Phenogramm zusammen, zeigen aber kein den Entnahmestellen entsprechendes Muster. Darüber hinaus liegen die Bootstrap-Werte für die Main-Populationen auf niedrigem Niveau. Eine Ausnahme bildet die Population GMul; deren Subpopulationen clustern bei beiden Bäumen mit einem Bootstrap-Wert von 100% zusammen. Dies wird auch von der Admixture-Analyse gestützt: GMul ist die einzige

Population, deren Subpopulationen als zusammengehörig definiert werden (Abb.30: Admixture-Zuordnung Mainpopulationen von *D. villosus*). GMul ist auch die einzige Population, deren Subpopulationen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Genetischen Diversität zeigen (Abb.18).

Die Zuordnung der Subpopulation GHarO ist nicht eindeutig zu klären; bei beiden Methoden ist die Konfidenz der Bootstrap-Werte gering, und beim Fitch-Margoliash-Phenogramm wird sie aufgrund dessen sogar ausgruppiert.

Bei den anderen Flüssen dagegen ist erneut ein kleinräumiger Zusammenhang zu erkennen: Bis auf die Population Giff liegen die zusammengehörigen Subpopulationen auf benachbarten Ästen. Auch dies wird durch sehr gute bootstrap-Werte unterstützt und findet seine Entsprechung in den Admixture-Analysen (Abb.25 und 26).

Interessant ist die hochsignifikante, mit idealen Bootstrap-Werten unterstützte Gruppierung der räumlich weit auseinander liegenden Populationen GLeh (Mosel) und GGam (Rhein). Dies ist sowohl beim UPGMA- als auch beim Fitch-Margoliash-Phenogramm zu beobachten. Bei der Admixture-Analyse werden diese beiden Populationen sogar als einer Gruppe zugehörig eingestuft (Abb.30).

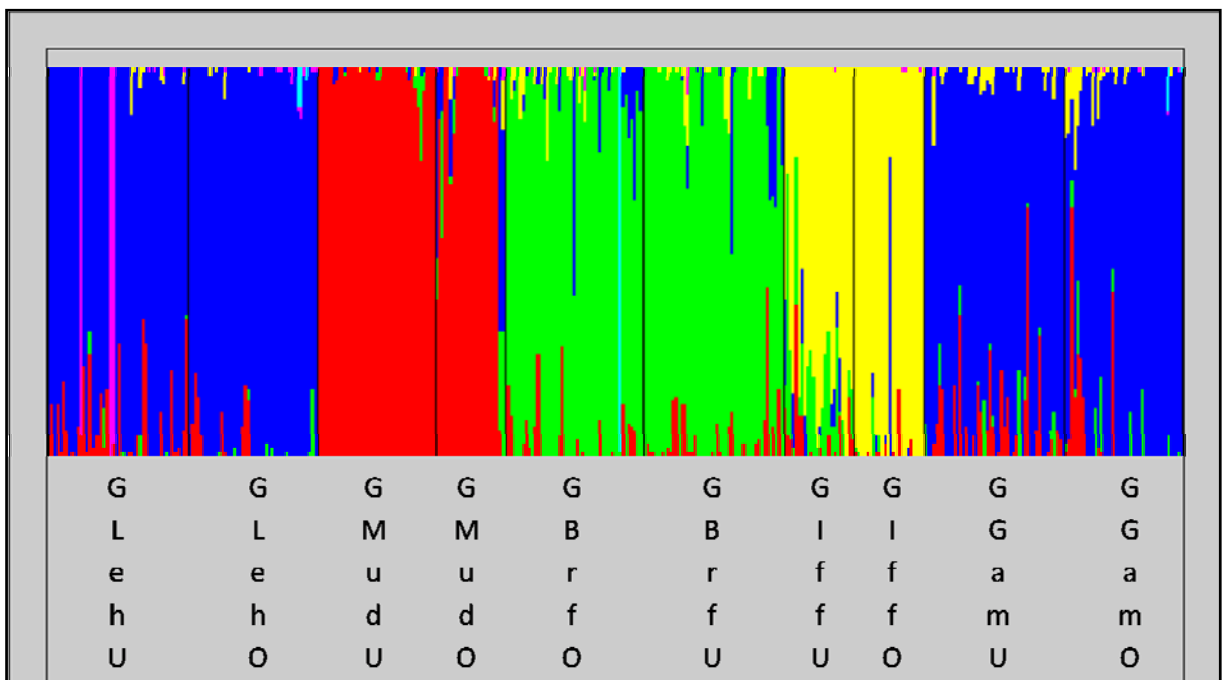


Abb.30: Admixture-Zuordnung Mosel-und Rheinpopulationen von *D. villosus*

Abgebildet sind die untersuchten sechs Mosel-Subpopulationen aus Lehmen (GLehU, GLehO), Müden (GMudU, GMudO) und Bruttig-Fankel (GBrfU, GBrfO) sowie die vier Rhein-Subpopulationen aus Iffezheim (GiffU, GiffO) und Gamsheim (GGamU, GGamO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

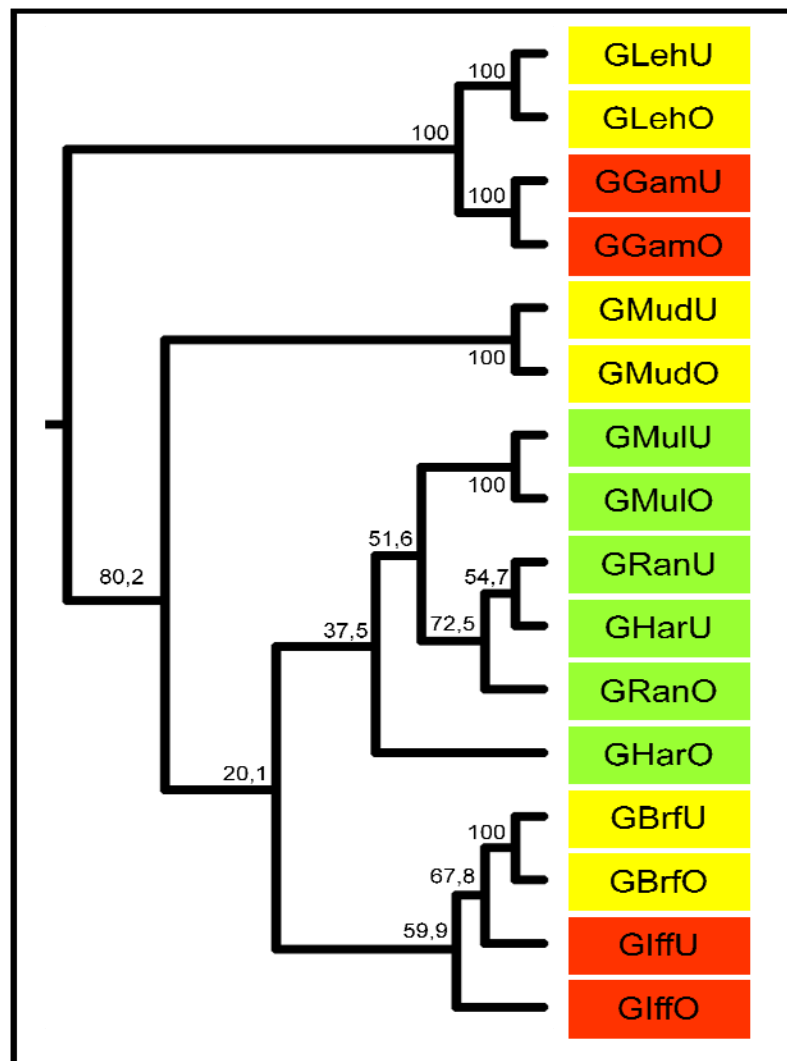


Abb.31: Phenogramm *D. villosus* (UPGMA)

Von PHYLIP unter Verwendung der Daten aus AFLPSurv erstellter Verwandtschaftsbaum nach der UPGMA-Methode. Die Astlängen entsprechen dem errechneten genetischen Abstand zwischen den Subpopulationen. Im Phenogramm sind die der jeweiligen Gruppierung zugehörigen Bootstrap-Werte in Prozent aufgetragen. Bei einem Wert von 100% wurde die entsprechende Gruppierung in allen erstellten Bootstrap-Bäumen gefunden. Die Farbgebung der Populationen codiert ihre Herkunft: Populationen aus der Mosel sind gelb, Populationen aus dem Main sind grün und Populationen aus dem Rhein sind rot unterlegt.

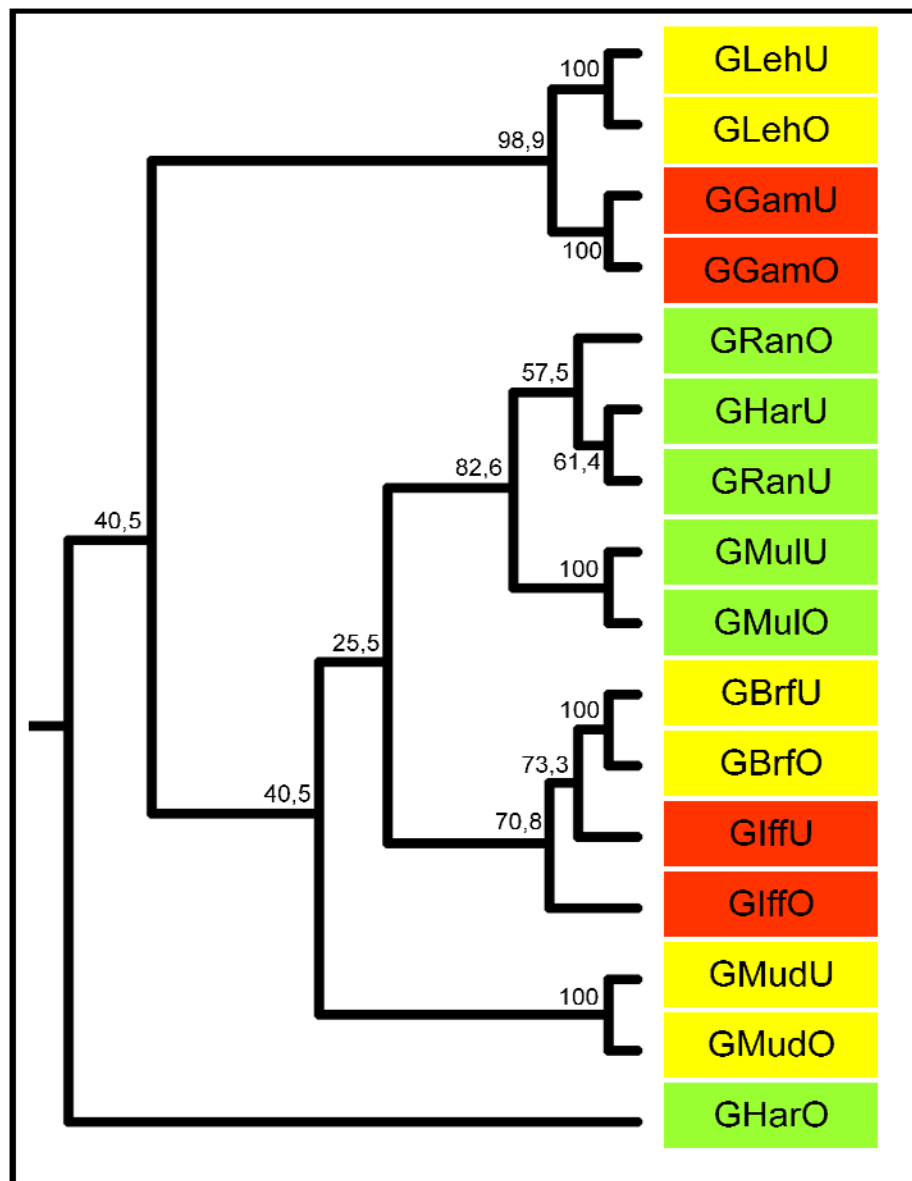


Abb.32: Phenogramm *D. villosus* (Fitch-Margoliash)

Von PHYLIP unter Verwendung der Daten aus AFLPSurv erstellter Verwandtschaftsbaum nach der Fitch-Margoliash-Methode. Die Astlängen entsprechen dem errechneten genetischen Abstand zwischen den Subpopulationen. Im Phenogramm sind die der jeweiligen Gruppierung zugehörigen Bootstrap-Werte in Prozent aufgetragen. Bei einem Wert von 100% wurde die entsprechende Gruppierung in allen erstellten Bootstrap-Bäumen gefunden. Die Farbgebung der Populationen codiert ihre Herkunft: Populationen aus der Mosel sind gelb, Populationen aus dem Main sind grün und Populationen aus dem Rhein sind rot unterlegt.

4. Diskussion

4.1 Kleinräumige Untersuchungen

4.1.1 Analyse auf Basis von Individuen

Die Auswirkungen kontrastierender Strömungsverhältnisse, die oberhalb und unterhalb von Staustufen herrschen, dienen wie beschrieben als Modell für durch den Klimawandel verursachte Veränderungen in bezug auf abiotische Faktoren wie Strömungsgeschwindigkeit und Sauerstoffgehalt. Wenn diese Faktoren einen Einfluss auf die genetische Struktur der untersuchten Arten haben, so sollte dies schon bei einem direkten Vergleich der Subpopulationen auf Individuenbasis zumindest ansatzweise erkennbar sein.

Die Analyse der mit PAUP erstellten Verwandtschaftsbäume zeigt, dass die Methode des neighbor joining auf Individuen-Ebene bei manchen Populationen eine klare Trennung der Individuen in zwei Gruppen (oberhalb/unterhalb der Schleuse) ermöglicht (Abb.13), bei anderen Populationen dagegen ist kein Muster erkennbar (Abb. 14) oder es werden mehrere Gruppen gebildet (Abb.15). Dies ist bei beiden Spezies zu beobachten; *D. villosus*-Populationen stellen die Aufteilung tendenziell etwas besser dar als *D. polymorpha*, was sich in der weiteren Auswertung der Genetischen Diversität der jeweiligen Subpopulationen bestätigt.

Die relativ homogenen Längen der Äste zeigen, dass sich der Verwandtschaftsgrad zwischen den Individuen innerhalb einer Population auf einem ähnlichen Level präsentiert. Ausreißer durch Fehler bei der Analyse hätten sich hier ebenso durch überproportional lange Astlängen gezeigt wie die Möglichkeit, ein Exemplar der falschen Art in die Untersuchung mit einbezogen zu haben (z.B. *Gammarus tigrinus* oder *Dikerogammarus haemobaphes* wurden bereits im Untersuchungsgebiet gefunden, und seit Kurzem ist eine Einwanderung von *Dreissena rostriformis bugensis* in den Main beschrieben worden (VAN DER VELDE & PLATVOET 2007). Eine Fehlbestimmung, die bei juvenilen Exemplaren in Einzelfällen bei beiden Spezies durchaus im Bereich des Möglichen liegt, konnte daher für die in die Analyse aufgenommenen Individuen nochmals ausgeschlossen werden, obwohl durch die beschriebene Filterung der Daten solche Proben ohnehin nicht in den verwendeten Datensatz eingegangen wären.

Die Bildung mehrerer Gruppen in einer Population (Abb.15) weist auf eine multiple Besiedlung hin; im Falle von *D. polymorpha* ist dieses Phänomen der Besiedlung durch mehrere Kohorten bereits beschrieben worden (NEUMANN *et al.* 1993, LEWIS *et al.* 2000). Dadurch wird eine lokale genetische Adaptation an die abiotischen Faktoren ergänzt und teilweise überlagert durch die Muster, die sich durch die Besiedlung mit Individuen aus unterschiedlichen Ursprungsgebieten und entsprechend verschiedener genetischer Struktur ergeben. Am gewählten Beispiel Edd ist schön zu sehen, dass die Aufteilung nach Individuen oberhalb/unterhalb der Schleuse aber nach wie vor gut erkennbar ist.

Eine optisch erkennbare Aufteilung ist, wie erwähnt, aber nicht bei allen Populationen der Fall (Abb.14). Dies muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subpopulationen vorliegen, wie das Beispiel der Population Leh zeigt: obwohl die Individuen der Subpopulationen oberhalb/unterhalb keine deutlich unterscheidbaren Gruppen bilden, zeigt sich in der späteren Analyse, dass die Unterschiede zwischen ihnen signifikant sind (Tab.5) und sich auch stimmig in das großräumige Muster einfügen (Abb.28, 29).

Diese Individuen-basierte Auswertung der Daten ist also lediglich als Voranalyse anzusehen, da bei dieser Methode lediglich eine grobe vorläufige, visuelle Einschätzung der Qualität der Daten vorgenommen werden kann; des Weiteren lassen sich mit diesem rein bildgebenden Verfahren keine Aussagen über Signifikanzen treffen. Bei der weiteren Analyse wurden die einzelnen Individuen zu Subpopulationen zusammengefasst.

4.1.2 Analyse auf Basis von Subpopulationen

Die bei der Auswertung der Genetischen Diversitäten zu beobachtenden, fast immer signifikant niedrigeren Werte für Subpopulationen von *D. villosus* unterhalb der Staustufen (Abb. 17, 18) unterstützen deutlich die Hypothese, dass hier ein stärkerer Selektionsdruck als oberhalb der Staustufe herrscht; lediglich GMul lässt keine signifikanten Unterschiede erkennen. Durch die freischwimmende Lebensweise von *D. villosus* wirkt sich die relativ kräftige Strömung von ca. 1 m/s inklusive intensiver Verwirbelungen im Uferbereich stark auf die Populationen aus. Hier spielt einerseits die langfristige Selektion über mehrere Generationen hinweg eine Rolle, die im Gegensatz zu *D. polymorpha* durchaus möglich ist, da die Generationszyklen bei *D. villosus* mit nur drei bis sechs Monaten sehr kurz sind

(DEVIN 2004, POCKL 2007, PISCART *et al.* 2003); durch ihre aktive Beweglichkeit können mehrere aufeinanderfolgende Generationen von *D. villosus* in für sie geeigneten Habitaten verbleiben. Andererseits liegt es auf der Hand, dass weniger gut an die herrschenden Verhältnisse angepasste Individuen aktiv andere Habitate aufsuchen können; in diesem Fall müssen sich die Tiere lediglich von der Strömung verdriften lassen.

Bei *D. polymorpha* liefern die Daten ein anderes Bild: hier sind die Genetischen Diversitäten zwischen den Populationen oberhalb und unterhalb der Schleuse zum Teil entweder nicht signifikant unterschiedlich oder zeigen gegensätzliche Tendenzen (Abb.18). Der Binomialtest bestätigt, dass im Gegensatz zu *D. villosus* hier keine generelle Richtung erkennbar ist. Offensichtlich haben also die kontrastierenden Strömungsverhältnisse keinen einheitlichen Einfluss auf die Genetische Diversität der paarweise untersuchten *D. polymorpha*-Subpopulationen. Bei Bruttig-Fankel (Brf) ist die nur marginale Signifikanz aber darauf zurückzuführen, dass eine der Entnahmestellen unterhalb der Schleuse aufgrund der besonderen Fragestellung (siehe Kap.2.2.1) ungewöhnlich weit vom Wehr entfernt lag und dessen Strömungsverhältnisse sich wieder denen der oberhalb gelegenen Subpopulation annäherten (siehe auch Abb.19). Verwendet man diese vom üblichen Sammelschema abweichende Entnahmestelle (BrfUa) nicht, so ergibt sich bei Brf mit $p=0,0012$ ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Subpopulationen oberhalb und unterhalb der Staustufe. Dies zeigt, wie extrem die Strömungsverhältnisse kontrastieren müssen, um die Genetische Diversität *D. polymorpha* deutlich zu beeinflussen.

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass *D. polymorpha* von vornherein potentiell besser an abiotische Faktoren wie unterhalb der Schleuse angepasst ist (hohe phänotypische Plastizität), solange sich diese nicht zu extrem darstellen; d.h. aufgrund mangelnder Stärke des Selektionsdrucks findet eine Reduktion der genetischen Diversität seltener statt. Die Besiedlung der Habitats erfolgt darüber hinaus immer durch Nachkommen von Populationen, die weit flussaufwärts liegen (NEUMANN *et al.* 1993), da die Veliger-Larven über viele Tage und weite Strecken verdriften werden können, ehe sie sich, bedingt durch ihre zunehmende Größe, anzusiedeln beginnen (ORLOVA 2002, SPRUNG 1989, 1993). Dadurch erfolgt die Besiedlung eines gegebenen Habitats immer durch Individuen, die an unterschiedlichste Umweltbedingungen angepasst sein können; ein möglicher Selektionsdruck kann also immer nur auf die aktuelle Generation wirken und ermöglicht so keine Anpassung an das Habitat über mehrere Generationen hinweg. Alle diese Faktoren begünstigen offensichtlich eher die Bildung erkennbarer großräumiger Strukturen als die hier untersuchten kleinräumigen Unterschiede in den Genetischen Diversitäten (JOHNSON *et*

al.1996, MÜLLER 2001b); dies zeigt sich später auch bei der Analyse des Phenogramms aller untersuchten Subpopulationen.

Interessant ist der auffällige und signifikante Unterschied der Genetischen Diversität bei der Population Eddersheim (Edd). Ein Vergleich mit dem aus PAUP gewonnenen Phylogramm (Anhang Abb. A-5) zeigt eine sehr deutliche Trennung der Subpopulationen oberhalb (O) und unterhalb (U), die bis auf ein Individuum (EddO12) keine Überschneidung zeigt. Klar erkennbar ist, dass der Unterschied auf eine sehr hohe Genetische Diversität der Subpopulation EddU (also von unterhalb der Schleuse) zurückzuführen ist: der Wert ist mit $H_j=0,172$ nicht nur der höchste aller Populationen des Mains, sondern aller untersuchten Populationen. Wie in Abb.6 zu sehen, ist diese von den untersuchten Subpopulationen diejenige, die der Mündung des Mains in den Rhein am Nächsten liegt. Daher ist eine mögliche Erklärung, dass die hohe Genetische Diversität durch einen Eintrag von Tieren aus dem Rhein zustande kommt. Dieser Eintrag kann durch Vögel ebenso wie durch Bootsverkehr geschehen und ist für *D. polymorpha* gut dokumentiert (CARLTON 1993, JOHNSON & CARLTON 1996, NEHRING 2005a). Dieser Einfluss ist aber offensichtlich nicht stark genug, um die Subpopulation in den Verwandtschaftsbäumen nahe den Rheinpopulationen einzuordnen (Abb.28, 29). Sowohl dort als auch in der Admixture-Analyse steht EddU in enger Beziehung zu der relativ weit entfernten Randersacker-Population RanU (Abb.24). RanU zeigt auch sonst ähnliche Eigenschaften: so ist die Genetische Diversität auch hier signifikant größer als bei der zugehörigen Subpopulation oberhalb der Schleuse (RanO), wenn auch bei Weitem nicht so stark wie bei der Population Edd (RanU $H_j=0,15$); dies ist hier aber außerdem auf eine relativ niedrige Genetische Diversität der Subpopulation RanO zurückzuführen ($H_j=0,129$).

Auch eine Admixture-Analyse, bei der die Populationen des Rheins und des Mains gemeinsam analysiert werden (Anhang Abb.A-20), zeigt eine nähere Verwandtschaft der Population EddU mit RanU und weniger mit den Rheinpopulationen; diese sind allerdings räumlich über 175 Fluss-km entfernt; daher wäre in diesem Zusammenhang ein Vergleich mit näher gelegenen Rheinpopulationen von *D. polymorpha*, etwa aus dem Mündungsbereich des Mains in den Rhein, für zukünftige Untersuchungen interessant, um den Verdacht einer Vermischung von EddU mit nahegelegenen Rheinpopulationen zu klären.

4.1.2.1 Wright's Fixations-Index F_{ST}

Die F_{ST} -Werte aus AFLPSurv (Tab.6, 7) zeigen, anders als die Genetischen Diversitäten, fast durchgehend eine hohe Signifikanz von $p < 10^{-6}$; bei GMul liegt eine etwas niedrigere Signifikanz vor ($p=0,0002$), was sich damit deckt, dass dies die einzige *D. villosus*-Population ist, die keine signifikanten Unterschiede in der Genetischen Diversität zeigt.

Die Populationen, die bei Bruttig-Fankel untersucht wurden, haben ebenfalls etwas geringere Werte, allerdings immer noch im hoch signifikanten Bereich (Brf: $p=0,0018$, GBrf: $p=0,0011$) (Tab.6, 7). Diese Analysemethode spricht also sehr viel empfindlicher auf Unterschiede zwischen Subpopulationen an. Dies wird auch beim Vergleich der Werte deutlich, die sich für die verschiedenen Entnahmestellen innerhalb einer Subpopulation bei Bruttig-Fankel ergeben (es wurden für jede Subpopulation zwei Entnahmestellen beprobt, siehe Kap. 2.2.1); es zeigt sich, dass (wenn auch niedrigere) Signifikanzen selbst innerhalb von zwei Entnahmestellen von Subpopulationen auftreten, deren Genetische Diversitäten sich nicht unterscheiden ($p=0,88$ für $\text{BrfO}_{(i+a)}$ und $p=0,73$ für $\text{GBrfU}_{(i+a)}$).

Der F_{ST} -Wert ist nicht wie die die Genetische Diversität ein Maß für die Variabilität der Subpopulationen, sondern für die Anzahl der gemeinsamen Allele und damit über die absoluten Unterschiede zweier Subpopulationen. Betrachtet man die erhaltenen F_{ST} -Werte (Tab.6, 7), wird jedoch schnell klar, dass diese Unterschiede zwischen den Subpopulationen sehr gering sind: Sie liegen durchschnittlich bei einem Wert von ca. 0,04 (der F_{ST} kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen). Dies entspricht auch der Erwartung, da die untersuchten Populationen nicht isoliert von anderen Populationen existieren (wie das zum Beispiel in einem See der Fall wäre) und ein Allelaustausch daher nach wie vor möglich ist.. Dass die niedrigen F_{ST} -Werte dennoch hohe Signifikanzen zeigen, ist auf die hohe Stichproben- bzw. Allelanzahl zurückzuführen, durch die selbst kleine Unterschiede schnell Signifikanz erreichen.

Ein weiterer Grund für die starken Signifikanzen ist, dass die Methode sehr empfindlich auf seltene Allele reagiert (GRIEBELER, pers. Mitt.). Obgleich lediglich polymorphe Loci ab dem 5%-Level gewertet wurden (also Loci mit Allelfrequenzen im Bereich zwischen 0,05 und 0,95), sind im gesamten Datensatz weiterhin sehr viele seltene Allele vertreten: Bei *D. polymorpha* lag der Anteil von Loci, die in weniger als 141 von 788 Individuen vorkamen, bei 44%; bei *D. villosus* kamen 56% aller Loci in weniger als 131 von 731 Individuen vor (Abb. A-22, A-23). Ein zusätzliches bekanntes Problem für diese Art der Analyse stellt es dar,

wenn bei den untersuchten Populationen die Anzahl der Individuen pro Subpopulation voneinander abweichen (GRIEBELER, pers. Mitt.). Dies war bei mehreren der untersuchten Populationen, z.B. GMud oder GHar, der Fall (Tab.3, 4). Dennoch weisen die Ergebnisse, wie beschrieben, meist in dieselbe Richtung wie die der Genetischen Diversitäten.

4.1.2.2 Bruttig-Fankel

4.1.2.2.1 *Dreissena polymorpha*

Die genaue Analyse verschiedener Entnahmestellen innerhalb der Subpopulationen von Bruttig-Fankel (Mosel) ergab bei *D. polymorpha* ein hervorragend den vorherrschenden Strömungsverhältnissen entsprechendes Ergebnis (Abb.19). Die praktisch identischen abiotischen Faktoren der beiden oberhalb liegenden Entnahmestellen verursachten erwartungsgemäß keine Unterschiede in der Genetischen Diversität ($p=0,88$). Auch die F_{ST} -Werte (Tab.6) spiegeln dies wider: mit 0,0035 ist der F_{ST} -Wert für BrfO (i+a) im direkten Vergleich sehr niedrig und als einziger nicht hoch-signifikant von einer Zufallsverteilung verschieden ($p=0,0242$).

Die am weitesten unterhalb liegende Entnahmestelle BrfUa ist – entsprechend den herrschenden Strömungsverhältnissen – mit den beiden oberhalb liegenden Subpopulationen vergleichbar ($p=0,1567$) und zeigt mit $H_j=0,136$ eine geringfügig höhere Diversität als alle anderen Subpopulationen (Tab.8), die von BrfUi hochsignifikant verschieden ist ($p<0,0001$). An diesem Entnahmeort sind die Strömungsverhältnisse mit 0,2 - 0,4 m/s nicht mehr so extrem wie unmittelbar unterhalb der Staustufe (~ 1 m/s), so dass sich die Tiere einfacher an das Substrat anheften und sich daran halten können; zudem ist die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch die unmittelbar flussaufwärts erfolgte Durchmischung des Wassers deutlich besser als oberhalb der Staustufe. Dadurch findet *D. polymorpha* hier offensichtlich beste Umweltbedingungen vor, die aufgrund mangelnden Selektionsdrucks zu einer hohen Genetischen Diversität führen.

BrfUi hat mit $H_j=0,1237$ eine hochsignifikant ($p<0,0001$) niedrigere Genetische Diversität als alle anderen Entnahmeorte in dieser Population. Durch die hohe Strömungsgeschwindigkeit liegt hier offensichtlich eine genügend große Störung vor, um eine deutliche Auswirkung auf die Subpopulation zu haben. Es ist plausibel, dass sich nur der Teil der Individuen hier dauerhaft ansiedelt, der an die sehr starke Strömung besonders angepasst ist.

Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis, warum die beobachteten Genetischen Diversitäten oberhalb und unterhalb der Staustufe bei *D. polymorpha* nicht wie bei *D. villosus* durchgehend signifikant unterschiedlich waren: Möglicherweise war der Bereich, in dem die Individuen entnommen wurden, nicht durchgehend nahe genug am Wehr; die Tiere wurden, wie beschrieben, auf einer Uferlänge von ca. 50m beprobt, da aufgrund der Besiedlungsdichte nur so eine genügend hohe Anzahl von Proben sichergestellt werden konnte. Dadurch wurden evtl. auch Proben von Bereichen genommen, in denen die Strömungsverhältnisse unterhalb der Wasseroberfläche für die Tiere wieder so weit tolerabel waren, dass sich kein Selektionsdruck mehr auswirken konnte. Da die Strömungsgeschwindigkeit an der Wasseroberfläche gemessen wurde und eventuelle Unterschiede in der Verwirbelung des Wassers in der Beprobungstiefe von ca. 1 m nicht festgestellt werden konnten, ist dies nicht auszuschließen. Daraus lässt sich ableiten, dass in zukünftigen Beprobungen, die extrem kleinräumig variierende Faktoren wie die hier die Strömungsverhältnisse abbilden sollen, mehr Wert auf ein räumlich eng begrenztes Entnahmegebiet gelegt werden sollte als auf eine möglichst große Stichprobe.

4.1.2.2.2 *Dikerogammarus villosus*

Die auffällige Abtrennung der Entnahmestelle GBrfOi vom Rest der Population (Abb.19 li.) lässt sich zunächst nur schwer nachvollziehen, zumal die nahegelegene Entnahmestelle GBrfOa, die ebenfalls oberhalb der Staustufe lag, in der Genetischen Diversität eine Ähnlichkeit mit den unterhalb der Schleuse liegenden Subpopulation zeigt. Dies deutet zunächst auf eine Besonderheit von GBrfOi hin; tatsächlich kann es sich hierbei aber auch um ein Problem mit der Entnahmestelle GBrfOa handeln: Die Tiere wurden im Bereich einer kleinen Anlegestelle gesammelt, deren metallene Bauteile teilweise bereits im Verfall begriffen waren. Möglicherweise wurden hierdurch Substanzen ins Wasser eingetragen, auf die *D. villosus* empfindlich reagierte und daher einem zusätzlichen abiotischen Faktor ausgesetzt war. Es ist bekannt, dass *D. villosus* verschiedene Metalle im Gewebe akkumuliert und sich daher sogar als Biomonitoring-Organismus eignet (SEBESVARI *et al.* 2005, BARKÁCS *et al.* 2002). Das würde die niedrigere genetische Diversität im Vergleich zur benachbarten Entnahmestelle GBrfOi erklären. Im Einklang hiermit steht die Struktur des Phenogramms (Abb.19 li.): GBrfOa wird verwandtschaftlich zwischen den unterhalb des Wehrs liegenden Subpopulationen und der anderen oberhalb liegenden Entnahmestelle eingeordnet.

Interessanterweise ist im neighbor-joining-Baum aus PAUP diese Abgrenzung nicht auffällig erkennbar (Abb. A-13). Ebenso wenig wiederholt sich dieses Bild bei der durch BAPS vorgeschlagenen Admixture-Zuordnung der einzelnen Individuen (Abb.26). Hier zeigen sich keine großen Unterschiede bezüglich der Individuen-Zuordnung innerhalb von GBrfO. Dies wird auch dadurch gestützt, dass der F_{ST} -Wert für GBrf mit 0,0054 (Tab.7) relativ niedrig ist und damit eine große genetische Ähnlichkeit zwischen den Subpopulationen anzeigt; bei *D. polymorpha* liegt der F_{ST} -Wert für Brf mit 0,041 fast eine Zehnerpotenz höher. Fasst man die zusammengehörigen Entnahmestellen zusammen, clustern die beiden Subpopulationen GBrfU und GBrfO im Vergleich mit allen anderen Populationen mit bootstrap-Werten von 100% zusammen (Abb.29) und unterscheiden sich auch in ihrer Genetischen Diversität nicht mehr von den anderen Populationen (Abb.17); die gefundenen Unterschiede der beiden oberhalb gelegenen Entnahmestellen sind also im Vergleich mit den anderen Populationen gering und wirken sich nicht auf das stimmige Gesamtbild aus.

Die Lage der Entnahmestellen unterhalb des Wehrs im Phenogramm zeigt ihre enge Verwandtschaft (Abb.19 li.). Anders als bei *D. polymorpha* bleibt der Selektionsdruck also auch bei etwas niedrigeren Strömungsgeschwindigkeiten bestehen; *D. villosus* reagiert offensichtlich auch hier empfindlicher als *D. polymorpha* auf starke Strömung, wie in Kap. 4.1.2 bereits diskutiert.

4.2 Mittel- und großräumige Untersuchungen

4.2.1 Admixture-Analyse

Betrachtet man die Admixture-Zuordnungen der Subpopulationen in den einzelnen Flüssen, so lässt sich für den Rhein und die Mosel bei beiden Spezies eine Struktur erkennen, die sehr gut mit den tatsächlichen räumlichen Verhältnissen harmoniert. Es zeigt sich, dass die beiden Subpopulationen einer Staustufe als eine distinkte Population erkannt werden (durch eine eigene Farbe gekennzeichnet), und die meisten Individuen zeigen auch die korrekte Zugehörigkeit zur jeweiligen Population; lediglich einzelne Tiere präsentieren sich als genetisch einer anderen Population zugehörig (Abb.22, 23).

Dies zeigt, dass in diesen Flüssen die zusammengehörigen Subpopulationen – obwohl meist signifikant verschieden (Abb.18) – in sich eine größere Ähnlichkeit zeigen als zwischen Subpopulationen verschiedener Entnahmeorte. Hier ist also die Auswirkung der räumlichen

Distanz zwischen den Populationen größer als die der kontrastierenden Strömungsverhältnisse innerhalb einer Population; dies spricht gegen die alternative Hypothese, dass aufgrund starken Selektionsdrucks alle unterhalb gelegenen Subpopulationen eine hohe genetische Ähnlichkeit hätten aufweisen können. Dies hätte sich auch im Phenogramm durch ein Zusammenclustern der unterhalb gelegenen Subpopulationen gezeigt; dies ist ebenso nicht der Fall (Abb.28, 31).

Etwas inhomogener stellen sich die Admixture-Analysen im Main bei beiden Spezies dar. Wie bereits in Kap.4.1.2 der Fall, ordnet auch BAPS die *D. polymorpha* -Subpopulation EddU der Subpopulation RanU zu; insgesamt ist hier die oben besprochene klare Trennung der Populationen nicht zu erkennen. Hier scheint es tatsächlich schwache Hinweise zu geben, dass auch die Strömungsverhältnisse und nicht nur die Distanz zwischen den Populationen einen Einfluss auf die genetische Struktur haben kann; bei *D. villosus* werden die beiden unterhalb gelegenen Subpopulation RanU und HarU zum großen Teil von Individuen besiedelt, die von BAPS als einer Population zugehörig eingestuft werden (Abb. 27). Allgemein ist aber festzustellen, dass keine saubere Aufteilung erfolgt (Abb.A-21). Die vorgeschlagene Zuordnung einzelner Individuen aus allen Subpopulationen zu einer eigenen Population (Abb. A-21, blau dargestellt), die in der Subpopulation GMulU am häufigsten anzutreffen sind, deuten auf eine Verschleppung einzelner Individuen aus dem Rhein hin: Die Subpopulation GMulU liegt der Mündung in den Rhein am nächsten und ist dadurch am meisten betroffen; eine Verschleppung in den Main durch Schifffahrt ist aber auch über größere Strecken plausibel (CARLTON 1993, NEHRING 1999, 2005a). Da, wie in Kap.4.1.2 bereits diskutiert, die Entnahmestellen im Rhein räumlich weit entfernt lagen, ist die Möglichkeit eines direkten Vergleichs mit Rheinindividuen aus dem Mündungsbereich im Rahmen dieser Untersuchung aber nicht gegeben. Ebenfalls plausibel erscheint eine andauernde Besiedlung des Mains aus der Donau und dem Main-Donau-Kanal. Da aus diesen Bereichen keine Populationen untersucht wurden, ist auch hier ein direkter Vergleich nicht möglich, jedoch ist bekannt, dass beide Spezies über diese Route in den Main einwanderten (MÜLLER *et al.* 2002a, NEHRING 2005a,b). Sehr wahrscheinlich werden über diese Route weiterhin Individuen bzw. Gameten durch Verdriftung wie auch durch Verschleppung eingetragen, was die beobachteten Unregelmäßigkeiten im Main teilweise erklären könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich – abweichend von den beiden anderen Flüssen – im Main die genetische Struktur nicht gut mit den geographischen Entnahmestellen in Übereinstimmung bringen ließ. Dies korreliert mit dem Bild, dass sich in den Phenogrammen

zeigt (Abb.28, 31): Obgleich die Subpopulationen des Mains sich von den anderen Flüssen entsprechend sauber abgrenzen, stimmt die Struktur innerhalb des Flusses nicht mit den geographischen Verhältnissen in überein. Es ist wahrscheinlich, dass ein klares Muster durch intensive Verschleppungen, meist durch die Schifffahrt, innerhalb des Mains und auch aus anderen Flüssen verhindert wird (NEHRING 2005a).

4.2.2 Phenogramme aus AFLPSurv

Anhand der Phenogramme lässt sich überprüfen, ob die gefundenen großräumigen Muster das phylogeographische Szenario unterstützen, bei dem die Einwanderungsrouten der jeweiligen Spezies nachvollzogen werden kann, oder ob eher das Adaptations-Szenario zutrifft, bei dem das Abflussregime und die damit verbundenen Charakteristiken der Flüsse einen Einfluss auf die genetischen Muster haben. Zudem zeigt sich hier nochmals mit einer weiteren Analyseverfahren, ob die zusammengehörigen Subpopulationen einen engeren Verwandtschaftsgrad miteinander zeigen als mit Subpopulationen anderer Entnahmestellen.

4.2.2.1 *Dreissena polymorpha*

Bei *D. polymorpha* liefern die Phenogramme mit beiden Methoden ein fast identisches Ergebnis (Abb.28, 29): Die Populationen bilden ausnahmslos Cluster entsprechend ihrer Herkunft aus den verschiedenen Flüssen, und die Populationen des Rheins bilden eine eigene Gruppe. Die praktisch deckungsgleichen Ergebnisse der beiden Analyseverfahren UPGMA und Fitch-Margoliash sprechen für die hohe Zuverlässigkeit der vorgeschlagenen Verwandtschaftsbäume, wobei die einzigen Abweichungen innerhalb der Mainpopulationen zu beobachten sind.

Nach dem phylogeographischen Szenario wäre eine Abgrenzung des Mains von den anderen Flüssen zu erwarten gewesen, da er über die nördliche Einwanderungsrouten als Letztes besiedelt wurde (THIENEMANN 1950) und über den Main-Donau-Kanal als Erstes Kontakt mit Individuen aus der südlichen Einwanderungsrouten hatte, deren genetische Unterscheidbarkeit in früheren Untersuchungen nachgewiesen wurde (MÜLLER *et al.* 2001a). Es zeigt sich aber ein anderes Bild: die Populationen der beiden grundwassergespeisten Flüsse Mosel und Main sind genetisch ähnlicher als die des schmelzwassergespeisten Rheins (Abb. 28, 29). Dieses

Ergebnis unterstützt klar das Adaptations-Szenario: die mit dem Abflussregime einhergehenden abweichenden abiotischen Faktoren haben offensichtlich einen entscheidenden Einfluss auf die Genetik von *D. polymorpha*, der größer ist als der historisch-phylogeographisch bedingte.

Auffällig ist, dass sich die jeweils zusammengehörigen Subpopulationen eines Entnahmeortes aus den Flüssen Rhein und Mosel auf benachbarten Ästen anordnen, dies bei den Subpopulationen des Mains aber nicht der Fall ist; Entsprechendes lässt sich auch bei *D. villosus* beobachten. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Bootstrap-Werte in der Gruppe des Mains in den Phenogrammen beider Spezies teilweise sehr niedrig sind und im Einzelnen unter 50% liegen (Abb.28, 29, 31, 32). Dies deutet darauf hin, dass auch hier eine Einordnung der einzelnen Subpopulationen zueinander nicht immer mit guter Zuverlässigkeit möglich war; besonders fällt dies bei *D. villosus* auf (Abb. 31,32). Die Struktur der Subpopulationen innerhalb des Mains, wie sie in den Phenogrammen dargestellt wird, ist also nicht so zuverlässig wie bei den anderen Flüssen. Die Struktur stimmt allerdings weitgehend mit den Ergebnissen der Admixture-Analyse überein (siehe Kap. 4.2.1); ebenso wie dort werden RanU und EddU sowie weiterhin HarO als eng verwandt eingestuft; auch die übrigen Gruppierungen finden sich übereinstimmend bei beiden Analysemethoden.

Obwohl, wie diskutiert, der Einfluss der Adaptation auf die großräumigen genetischen Muster dominiert, ist diese relativ ungleichmäßige Struktur möglicherweise auf phylogeographische Faktoren zurückzuführen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Aufeinandertreffen der beiden Einwanderungsrouten von *D. polymorpha* im Main - im Verein mit dem intensiven internationalen Schiffsverkehr über den Main-Donau-Kanal (SCHMITT 2007) – für die beobachtete ungleichmäßige Struktur verantwortlich zu machen ist. Mit $H_t=0,162$ (Tab. A-2) liegt die Genetische Diversität über alle Populationen des Mains deutlich über denen der anderen Flüsse (Rhein: $H_t=0,1539$; Mosel $H_t=0,1518$); die Subpopulationen im Main unterscheiden sich also stärker voneinander als in den anderen Flüssen. Möglicherweise ist hier die Diversität so groß, dass eine zukünftige Untersuchung der Populationen mit einer weniger empfindlichen Methode, zum Beispiel die Mikrosatellitenanalyse, die hier vorgestellten Ergebnisse unter Einbeziehung weiterer Entnahmestellen aus dem Main-Donau-Kanal sinnvoll ergänzen kann.

4.2.2.1 *Dikerogammarus villosus*

Da diese Spezies erst vor Kurzem über den Main nach Deutschland einwanderte (NESEMANN *et al.* 1995), war ein ausgeprägtes Muster nach dem Adaptations-Szenario trotz der kurzen Generationszyklen (DEVIN 2004, POCKL 2007, PISCART *et al.* 2003) nicht zu erwarten. Bedingt durch die rasche und großräumige Ausbreitung (NEHRING 2005a) sollten dagegen Gendrift und Gründer-Effekt eine Rolle spielen. Tatsächlich ist die Totale Genetische Diversität von *D. villosus* mit $H_t=0,13$ deutlich geringer als die von *D. polymorpha* mit $H_t=0,169$ (Tab.A-2, A-4). Eine sinnvolle Ergänzung zur endgültigen Klärung des Einflusses dieser Effekte wäre eine Untersuchung von *D. villosus*-Populationen in ihrem Ursprungsgebiet in der Donau im Hinblick auf ihre genetische Diversität; dadurch würden direkte intraspezifische Vergleiche möglich.

Die schnelle Ausbreitung steht auch der Ausprägung eines großräumigen phylogeographischen Musters im Weg; trotzdem ist es mit größerer Wahrscheinlichkeit zu beobachten als ein auf Adaptation beruhendes, da hierfür eine große Anzahl an Generationszyklen keine zwingende Voraussetzung ist. Betrachtet man die Genetische Diversität der einzelnen Flüsse, so stellt man fest, dass sie entlang der Einwanderungsrouten Main→Rhein→Mosel geringer wird: im Main ist sie mit $H_w=0,142$ am höchsten, nimmt im Rhein ab ($H_w=0,107$) und erreicht in der Mosel mit $H_w=0,093$ den niedrigsten Wert (Tab.A-3). Diese Unterschiede sind signifikant ($p=0,001$; Tab.A-8). Dies deutet wie erwartet auf einen Gründer-Effekt hin, der bei *D. polymorpha* nicht zu beobachten war: dort unterschied sich die Genetische Diversität der einzelnen Flüsse nicht signifikant ($p=0,177$; Tab.A-7); die Genetische Diversität von *D. villosus* verarmte also im Zuge der schnellen Verbreitung entlang der Einwanderungsrouten.

Die sehr schnelle, wahrscheinlich durch anthropogene Faktoren begünstigte Verbreitung von *D. villosus* (NEHRING 2005a) kann also auch zu zufälligen Strukturen führen, die nicht auf die diskutierten Ursachen Adaptation und Phylogeographie zurückzuführen sind. Ein Beispiel hierfür sind die Populationen von *D. villosus* in den Flüssen Rhein und Mosel. Diese in ihrem Abflussregime kontrastierenden Flüsse wurden an geographisch weit auseinanderliegenden Entnahmestellen beprobt; sowohl nach dem Adaptations- also auch dem phylogeographischen Szenario wären hier also deutliche Abstände im Phenogramm zu erwarten gewesen. Tatsächlich aber erwiesen sich die Populationen GLeh aus der Mosel und GGam aus dem

Rhein als nah verwandt, und das sowohl mit hoher Zuverlässigkeit in den Bootstrap-Werten (Abb.31, 32) als auch unterstützt durch die Admixture-Analyse (Abb.30). Hier ist zu vermuten, dass eine vom Menschen verursachte Verschleppung von einigen Individuen entweder von einem zum anderen Ort oder von einem gemeinsamen Ursprungsort stattgefunden hat.

Betrachtet man die kleinräumigen Strukturen von *D. villosus* in den Phenogrammen (Abb.31, 32), so sieht man, dass alle Subpopulationen entsprechend ihrer Entnahmestellen zusammenclustern. Hier konnte also die kleinräumige Anpassung an die kontrastierenden Strömungsverhältnisse trotz der schnellen Ausbreitung stattfinden; dies stimmt mit den Ergebnissen der Analyse der Genetischen Diversitäten überein (Abb.18). Der Selektions- bzw. Adaptationsdruck in diesen kleinräumigen Arealen ist offensichtlich so stark, dass er die beschriebenen Zufallseffekte überdeckt, die ein großräumiges Muster verhindern.

Eine Ausnahme bildet die Population GHar, die sich auch hier wieder als Sonderfall präsentiert. Ebenso wie in der Admixture-Analyse (Abb.27) unterscheidet sich die Subpopulation GHarO von allen anderen Populationen; im Phenogramm nach Fitch-Margoliash (Abb.32) wird diese Subpopulation sogar als „outgroup“ eingeordnet. Hierfür lässt sich kein umweltbedingter Grund erkennen, zumal sich die entsprechende Subpopulation bei *D. polymorpha* unauffällig verhält (Abb.29). Daher kann über die Ursache für dieses Ergebnis nur spekuliert werden; möglicherweise ließ ein aus der Donau kommendes Schiff vor der Einfahrt in die Schleuse Ballastwasser ab, in dem sich eine große Anzahl *D. villosus* befand, die das Schiff an einer weit entfernten Stelle aufgenommen hatte, möglicherweise in Richtung ihres Ursprungsgebietes. Dafür spricht die Tatsache, dass die Genetische Diversität dieser Subpopulation mit $H_j=0,1576$ (Tab.4) den höchsten Wert aller untersuchten Subpopulationen von *D. villosus* hat (Abb.17).

4.3 Eignung der Spezies als Modellorganismen

Fasst man die einzelnen Ergebnisse der verschiedenen Analysen für die beiden Spezies zusammen, so ergibt sich ein interessantes Gesamtbild.

Die Arten sind unterschiedlich gut zur Beantwortung der untersuchten Fragestellungen geeignet: *D. polymorpha* ist aufgrund ihrer bereits lang andauernden Besiedlung besser als *D. villosus* nutzbar, um die großräumigen Muster nachzuweisen, die durch das Adaptations- und

phylogeographische Szenario postuliert werden. Bei *D. polymorpha* unterstützen die Untersuchungsergebnisse deutlich die Hypothese einer Adaptation an die unterschiedlichen Umweltbedingungen in Flüssen mit verschiedenen Abflussregimen; damit zeigt sich ihre Dominanz gegenüber möglichen Einflüssen der Einwanderungsgeschichte auf die großräumige genetische Struktur (phylogeographisches Szenario). Dies steht auch im Einklang mit der Tatsache, dass diese Art bereits seit vielen Jahrzehnten in den untersuchten Flüssen siedelt (THIENEMANN, 1950), so dass eine Adaptation erfolgen konnte. Dazu kommt, dass die Neubesiedlung der aktuellen Populationen zu einem bedeutenden Teil durch verdriftete Larven von flussaufwärts gelegenen Gebieten aus erfolgt (NEUMANN *et al.* 1993); dies verstärkt diesen Effekt zusätzlich.

Im Gegensatz dazu siedelt *D. villosus* erst kurz in den untersuchten Flüssen, daher ist eine großräumige Adaptation an kontrastierende Abflussregime unwahrscheinlich und wurde auch nicht gefunden. Dieses Ergebnis verdeutlicht den benötigten Zeitrahmen, den eine Spezies benötigt, um sich an diese unterschiedlichen Bedingungen optimal anzupassen, wobei natürlich vorausgesetzt wird, dass eine Adaptation überhaupt genetisch in Erscheinung treten wird; dies ist bei *D. villosus* durch die Daten dieser Untersuchung bislang nicht nachweisbar. Erkennbar waren dagegen phylogeographische Aspekte: eine signifikante Abnahme der Genetischen Diversität entlang der Einwanderungsrouten ist höchstwahrscheinlich auf den Gründer-Effekt zurückzuführen.

Klar erkennbar wird auch der Einfluss des Menschen auf die Verbreitung von *D. villosus*. Die extrem schnelle Ausbreitung über praktisch das gesamte Flusssystem Deutschlands und angrenzender Länder (NEHRING 2005a) legt eine Verschleppung z.B. durch Schifffahrt nahe. Die großräumigen genetischen Verwandtschaftsverhältnisse (Abb.31, 32) zeigen signifikante Muster, die weder Adaptationsvorgänge widerspiegeln noch einen phylogeographischen Hintergrund haben: hier fällt besonders die nahe Verwandtschaft von räumlich weit entfernten Rhein- und Moselpopulationen auf. Dies hebt nochmals hervor, wie stark der anthropomorphe Einfluss auf die schnelle Ausbreitung von limnischen Neozoen sein kann; bei einer zukünftigen potentiellen Invasion unerwünschter Neozoen wird dieser Tatsache durch geeignete Vorbeugemaßnahmen stärker als bislang Rechnung getragen werden müssen.

Im Hinblick auf den Klimawandel bedeutet dies natürlich, dass *D. villosus* momentan als Modellorganismus weniger geeignet ist als *D. polymorpha*, wenn es um klimatische Auswirkungen geht, deren Modelle großräumige Untersuchungen erfordern. Die Dominanz anthropogener Einflüsse auf die schnelle Verbreitung im Zusammenwirken mit der erst

kürzlich erfolgten Besiedlung verhindern die Bildung einer natürlichen großräumigen Struktur, die Voraussagen über die Einflüsse natürlicher, abiotischer Faktoren ermöglichen würde. *D. polymorpha* ist dagegen, wie bereits diskutiert, aufgrund ihrer langen Besiedlungsdauer sowie ihres Verbreitungsmechanismus besser für großräumige Betrachtungen geeignet. Anders sieht es bei kleinräumigen Untersuchungen aus:

Um den Einfluss kontrastierender Strömungsverhältnisse (als Modell für die Auswirkungen des Klimawandels) auf die genetische Struktur von Makrozoobenthos nachzuweisen, erweist sich *D. polymorpha* als weniger geeignet. Die Genetische Diversität war nicht bei allen Subpopulationen signifikant unterschiedlich (Abb.18), und auch ein bottleneck-Effekt war nicht durchgehend erkennbar. Als Grund hierfür kann angeführt werden, dass der Einfluss der stärkeren Strömung auf die Individuen nicht ausreichend groß ist. Dies wird ermöglicht durch die stark ausgebildeten Byssusfäden (ECKROAT *et al.* 1993) sowie die strömungsgünstige heteromyare Form der Schalen, die es der Spezies ermöglichen, sich energetisch effizient auch an Stellen mit hoher Fließgeschwindigkeit zu halten (MORTON 1993).

Dies ist *D. villosus* aufgrund seiner freischwimmenden Lebensweise nicht möglich; die Spezies muss durch ständige Schwimmbewegungen einem Verdriften entgegenwirken. Dieser Selektionsdruck ist spiegelt sich in geringerer Genetischer Diversität in den Subpopulationen unterhalb von Staustufen wider. Offensichtlich ist *D. villosus* also hoher Strömungsgeschwindigkeit gegenüber empfindlicher als *D. polymorpha*, was ihn auf dieser kleinräumigen Ebene zu einem geeigneten Modellorganismus macht.

Ein Vorteil von *D. polymorpha* ist dagegen die gute Bestimmbarkeit des Alters eines Individuums durch genaue Analyse der Schalen, die durch Wachstumsschübe im Sommer verursachte „Jahresringe“ aufweisen (THOMAS, pers. Mitteilung.). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer Aufteilung der Populationen in verschiedene Altersklassen, die dann hinsichtlich ihrer Genotypstruktur verglichen werden können. Dies eröffnet z.B. neue Möglichkeiten in Bezug auf die Analyse von zeitlich begrenzten Umweltfaktoren (kurzfristige Belastung durch Industrieunfälle, natürliche Extremereignisse wie Niedrigwasser oder Hitzewellen wie im Jahr 2003 usw.), denen nur eine bestimmte Altersgruppe ausgesetzt war, oder die langfristigen Auswirkungen von schwachem Selektionsdruck über mehrere Jahre, sowie weitere Fragestellungen.

4.4 Auswirkungen des Klimawandels auf die zukünftige genetische Struktur von Makrozoobenthos

Wie beschrieben, haben sowohl das Abflussregime der besiedelten Flüsse als auch die Strömungsgeschwindigkeit und die damit zusammenhängenden abiotischen Faktoren einen Einfluss auf die Populationsstruktur jeweils einer untersuchten Spezies. Die Unterschiede in den Ergebnissen in bezug auf *D. polymorpha* sowie *D. villosus* sind sowohl auf unterschiedlich starke phänotypische Plastizität in Hinsicht auf die untersuchten Habitatbedingungen zurückzuführen, als auch auf die Tatsache, dass *D. villosus* zum Nachweis langfristiger großräumiger Anpassungen noch nicht lange genug im Untersuchungsgebiet abundant ist.

Die Untersuchungsergebnisse für *D. polymorpha* zeigen, dass der vorhergesagte Wandel des Rheins von einem schmelzwasserdominierten zu einem grundwassergespeisten Fluss deutlich messbare Auswirkungen auf die Populationsstruktur haben wird: die Populationen aus den grundwassergespeisten Flüssen Main und Mosel sind in den Allelfrequenzen deutlich von den Populationen aus dem Rhein verschieden. Geschieht dieser Wandel aber nicht zu abrupt, sondern über viele Jahrzehnte (wovon die gegenwärtigen Modelle ausgehen (KWADIJK & ROTMANS 1995; MIDDELKOOP *et al.* 2001)), so sollte dies keine Auswirkungen auf die genetische Diversität haben (kein bottleneck-Effekt), da sich die Spezies über viele Generationen anpassen kann, wie dies auch in den untersuchten Flüssen der Fall war. Die zu erwartenden höheren Strömungsgeschwindigkeiten (MIDDELKOOP *et al.* 2001) sollten durch die vorhandene phänotypische Plastizität abgefangen werden können. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass Strömungsgeschwindigkeiten von mehr als 1 m/s vonnöten sind, um *D. polymorpha* unter hinreichend großen Selektionsdruck zu setzen, um konsistente gerichtete Veränderungen in den Allelfrequenzen auszulösen. Dies ist insofern interessant, als dass *D. polymorpha* auch sehr häufig in brackigen Gewässern ohne jegliche Strömung vorkommt; dies zeigt ihre enorme Anpassungsfähigkeit und damit den Grund für ihren großen Besiedlungserfolg in den verschiedensten Habitaten.

Extrapolationen auf andere invasive Molluskenarten sind nur eingeschränkt möglich; dies zeigt sich deutlich am Beispiel der nahe verwandten Art *Dreissena rostriformis bugensis*, welche aus dem selben Ursprungsgebiet stammt wie *D. polymorpha*, aber bislang keinen vergleichbar erfolgreichen Besiedlungserfolg vorweist: Erst vor Kurzem gelang der Nachweis dieser Art außerhalb der Donau (VAN DER VELDE & PLATVOET 2007). Die enge

Verwandtschaft legt eine sehr ähnliche ökologische Nische und damit eine direkte Konkurrenz der beiden Spezies nahe. Die offensichtliche Unterlegenheit von *D.bugensis* deutet auf eine geringere Fitness hin, die auch eine kleinere phänotypische Plastizität in Bezug auf die untersuchten Faktoren möglich erscheinen lässt. Dies würde bedeuten, dass die zukünftigen Auswirkungen des Klimawandels auf diese und auch auf andere Molluskenarten einen stärkeren Einfluss haben kann, als dies für *D. polymorpha* der Fall ist.

Die kurze Besiedlungsdauer von *D. villosus* in den untersuchten Flüssen beschränkt, wie beschrieben, die Möglichkeit einer Vorhersage der Konsequenzen des Klimawandels auf die großräumige Populationsstruktur: die Auswirkungen des vorhergesagten Wandels des Rheins von einem schmelzwasserdominierten zu einem grundwassergespeisten Fluss sind mit den Mitteln und Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung bislang nicht zuverlässig vorhersagbar. Eindeutig jedoch ist der Effekt einer erhöhten Strömungsgeschwindigkeit: es zeigt sich deutlich, dass sie zusammen mit den damit zusammenhängenden abiotischen Faktoren einen negativen Einfluss auf die genetische Diversität hat. Anders als *D. polymorpha* besteht bei *D. villosus* also die konkrete Möglichkeit eines langfristig negativen Effekts auf die genetische Fitness der Spezies.

Ein großer Vorteil der untersuchten flusslebenden Spezies gegenüber solchen aus stehenden Gewässern oder auch terrestrischen Spezies besteht in einer ständigen Neuversorgung von flussaufwärts z.B. mit Nahrung (außer bei extremem Niedrigwasser). Dies bedeutet zum einen stabilere Umweltbedingungen und zum anderen auch direkten Kontakt mit Bereichen in anderen Klimazonen (z.B. höher gelegene oder kältere Gebiete) und ebenso mit solchen weiter flussabwärts. Das eröffnet die Möglichkeit der einfachen aktiven oder passiven Migration sowie der Auswahl des besten Habitats entsprechend ihrer ökologischen Präferenzen entlang eines nicht fragmentierten Gradienten. Diese Möglichkeit nutzt *D. polymorpha* praktisch in jeder Generation, da die Larven freischwimmend viele hundert Kilometer zurücklegen und so z.B. im Rhein vom Bodensee bis nach Holland verdriftet werden können (NEUMANN *et al.*1992)., wobei sie sich in geeigneten Habitaten jederzeit ansiedeln können, wodurch eine mögliche Fragmentierung der besiedelten Habitate innerhalb dieses Flusses nicht zum Tragen kommt. Eine Fragmentierung entsteht lediglich durch den Übergang in einen zufließenden Fluss (hier z.B. vom Rhein in die Mosel oder den Main), da hier eine Migration flussaufwärts nicht aus eigener Kraft möglich ist.

Diese Vorteile haben terrestrische Spezies nicht; hier spielt Fragmentierung durch ein begrenztes Verbreitung ebenso eine Rolle wie die natürliche Limitierung geographischer

Rückzugsgebiete: so ist die Möglichkeit eines Ausweichens alpiner Spezies in höher gelegene Gebiete durch die gegebene Höhe des Gebirges begrenzt (PARMESAN 2006). Dadurch ist der Einfluss des Klimawandels auf die genetische Struktur der terrestrischen Spezies unmittelbarer und stärker als in flusslebenden Spezies.

Insgesamt überraschend sind aber die geringen Auswirkungen der untersuchten starken Unterschiede bestimmter abiotischer Faktoren auf die genetische Struktur der beiden Spezies. Betrachtet man die Auswirkungen des Klimawandels auf terrestrische Arten, so stellt man dort gravierende Konsequenzen in Bezug auf die Phänologie wie auch auf die Verbreitung fest. Bereits relativ geringe Unterschiede der mittleren Jahrestemperatur führen hier zu deutlichen Veränderungen bis hin zu genetischen Anpassungen (BERTEAUX *et al.* 2004). Geht man näher auf diese Beobachtungen ein, so zeigt sich aber, dass die Gründe dafür meist nicht direkter Natur sind, sondern durch die Auswirkungen des Klimawandels auf das gesamte Ökosystem indirekt auf die untersuchten Spezies wirken. Insbesondere ist hier die Nahrungsverfügbarkeit zu nennen, die sich in den meisten Fällen früher einstellt (RÉALE *et al.* 2003, BRADSHAW & HOLZAPFEL 2006). In manchen Fällen kann eine unterschiedlich schnelle Anpassung der Phänologie verschiedener Spezies an die geänderten Umweltbedingungen zu einer Verschiebung der Synchronizität führen (PARMESAN 2006). Gerade beispielsweise die zeitliche Koordination der Lebenszyklen einer räuberischen Spezies und seiner Beute durcheinander, so hat dies negative Auswirkungen auf die genetische Fitness (VISSER & BOTH 2005).

Die in dieser Arbeit untersuchten Spezies dagegen sind solchen Interaktionen nicht ausgesetzt, wenn man als einzige Änderung der abiotischen Faktoren die Strömungsgeschwindigkeit und den lokalen Sauerstoffgehalt untersucht. Die Nahrungsverfügbarkeit ist beim Filtrierer *D. polymorpha* stabil, da diese von flussaufwärts herangeschwemmt wird. *D. villosus* ernährt sich zwar auch räuberisch, aber auch hier ist keine gravierende Änderung der Nahrungsverfügbarkeit zu erwarten, zumal er seiner Beute folgen und somit auf lokale Gegebenheiten reagieren kann. Dies kann sich aber im Hinblick auf die erwarteten klimatischen Änderungen und deren Konsequenzen auf die untersuchten Flüsse auf lange Sicht ändern. So zeigten WINDER & SCHINDLER (2004), dass in großen Seen die „Blüte“ von Phytoplankton und sich davon ernährendes Zooplankton bereits immer weiter divergieren; dies ist in Zukunft auch für Flüsse nicht auszuschließen.

Somit sind weitere Auswirkungen auf das gesamte Ökosystem „Fluss“ zu erwarten, die bei der vorliegenden Untersuchung nicht einbezogen werden konnten. Eine Vielzahl weiterer,

voneinander abhängiger Faktoren wird hier eine Rolle spielen, die in ihrer Gesamtheit weder umfassend vorhergesehen noch experimentell nachgebildet werden können. Die in dieser Arbeit gefundene große Toleranz der beiden Spezies gegenüber den untersuchten abiotischen Faktoren zeigt jedoch, dass sie – entsprechend ihres invasiven Potentials – durch phänotypische Plastizität eine hohe Anpassungsfähigkeit an gravierende Änderungen von Umweltbedingungen haben. Dies wird in Zukunft von entscheidender Bedeutung für das Überleben in einer sich verändernden Umwelt sein.

Eine interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang ist, dass bei einer Beprobung des Rheins im Bereich der Einmündungen der Mosel bei Koblenz sowie des Mains bei Mainz im Frühling 2008 weder Exemplare von *D. polymorpha* noch von *D. villosus* gefunden werden konnten. Anders als noch bei Beprobungen in früheren Jahren, zuletzt 2005 (eig. Beob.), waren die Populationen beider Spezies an sämtlichen Probenahmestellen völlig zusammengebrochen. Eine starke Abnahme von vormals erfolgreichen Populationen wurde zuvor auch schon für andere invasive Spezies wie z.B. *Corophium curvispinum* berichtet (VAN RIEL *et al.* 2006), wobei meist innerartliche Konkurrenz dafür verantwortlich gemacht wurde. Oft erfolgen erfolgreiche Besiedlungen invasiver Arten innerhalb kurzer Zeiträume unmittelbar aufeinander, wobei die neuen Spezies die bereits vorhandenen verdrängen (MÜLLER 2001b, VAN DER VELDE *et al.* 1994).

Im vorliegenden Fall jedoch war keine konkurrierende Spezies nachweisbar; auch Extremereignisse wie z.B. eine starke Verschmutzung durch die Industrie lagen für das untersuchte Gebiet nicht vor, so dass ein unmittelbarer Grund für das Zusammenbrechen der Populationen nicht erkennbar war.

Dies zeigt nochmals, dass viele, zum Teil unbekannte Faktoren Einfluss auf die untersuchten Spezies haben, und dass eine Vorhersage der zukünftigen Entwicklung der untersuchten Spezies allein aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt möglich ist.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde eine deutliche, anhaltende Veränderung des globalen Klimas beobachtet, die in Zukunft zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Oberflächentemperatur, erhöhten Niederschlagsmengen und anderen gravierenden Umweltveränderungen führen wird (IPCC 2001).

Der Klimawandel wird in Flüssen sowohl mehr Extremereignisse verursachen als auch das Abflussregime bisher schmelzwasserdominierter Flüsse zu grundwassergespeisten hin ändern; dies gilt insbesondere für den Rhein (MIDDELKOOP *et al.* 2001). Um die möglichen Auswirkungen dieser Veränderungen auf die genetische Populationsstruktur von Makrozoobenthosorganismen vorhersagen zu können, wurden in den grundwassergespeisten Flüssen Main und Mosel sowie im Rhein Entnahmestellen oberhalb und unterhalb von Staustufen beprobt, die durch kontrastierende Strömungsverhältnisse als Modell für die zu erwartenden Änderungen dienten. Als Untersuchungsobjekt wurden *Dreissena polymorpha* PALLAS 1771 sowie *Dikerogammarus villosus* SOWINSKI 1894 herangezogen. Sie zeichnen sich durch hohe Abundanzen aus, sind aber unterschiedlich u.a. hinsichtlich ihrer Besiedlungsstrategie und -historie. Bei beiden Spezies sind die phylogeographischen Hintergründe bekannt; daher wurde auch versucht, die Einwanderungsrouten in der Populationsstruktur nachzuweisen (phylogeographisches Szenario). Dies konkurrierte mit der möglichen Anpassung der Spezies an das Abflussregime des jeweiligen Flusses (Adaptations-Szenario). Die Populationen wurden molekulargenetisch mit Hilfe der AFLP-Methode („Amplified-Fragment Length Polymorphism“) untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass *D. polymorpha* deutlich durch die Abflussregimes der Flüsse (Schmelz- oder Grundwasserdominanz) beeinflusst wird. Die Allelfrequenzen in Populationen des Rheins sind von denen der beiden grundwassergespeisten Flüsse Main und Mosel deutlich unterscheidbar (Adaptations-Szenario). Jedoch ist kein Unterschied der genetischen Diversitäten zu beobachten; das ist auf die lange Adaptation an ihre jeweiligen Habitats durch die lange Besiedlungsdauer zurückzuführen. Dies ist auch der Grund, warum die Einwanderungsrouten anhand der Populationsstruktur nicht mehr nachzuweisen waren. Die kontrastierenden Strömungsverhältnisse um die Staustufen hatten ebenfalls keine konsistenten Auswirkungen auf die genetische Diversität der Populationen. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe phänotypische Plastizität der Spezies und dadurch eine große Anpassungsfähigkeit an

wechselnde Umweltbedingungen, die unter anderem für den großen Erfolg dieser Spezies verantwortlich ist.

D. villosus wanderte erst vor Kurzem in das Untersuchungsgebiet ein; die Einwanderungsrouten waren anhand der genetischen Diversität nachvollziehbar (phylogeographisches Szenario); durch die kurze Besiedlungsdauer war eine Adaptation an die divergenten Abflussregime der Flüsse nicht zu erwarten und wurde auch nicht gefunden. Dagegen war ein deutlicher negativer Einfluss von starker Strömung auf die genetische Diversität nachweisbar.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zukünftigen Auswirkungen des Klimawandels auf die Strömungsgeschwindigkeit negative Konsequenzen auf die genetische Diversität von *D. villosus* haben werden, während *D. polymorpha* hier keine Auswirkungen erkennen lässt. Die Auswirkungen des veränderten Abflussregimes im Rhein sind für *D. villosus* mit den vorliegenden Daten aufgrund der kurzen Besiedlungsdauer nicht vorhersagbar; *D. polymorpha* wird durch die Veränderung des Rheins zu einem grundwassergespeisten Fluss zwar einen Wandel in der genetischen Struktur erfahren, aber auch hier keine Einbußen in der genetischen Diversität erleiden.

6. Literaturverzeichnis

- ARORA V.K., BOER G.J. (2001): Effects of simulated climate change on the hydrology of major river basins. *Journal of geophysical research – Atmospheres* **106**(D4): 3335-3348
- ASTANEI I., GOSLING E., WILSON J., POWELL E. (2005): Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology* (2005) **14**: 1655–1666
- BARKÁCS K, ÓVÁRI M, OERTEL N, SZABÓ E, SZURDOKI E, ZÁRAY G (2002): Elemental analysis of *Dikerogammarus villosus* samples for river water monitoring. *Microchemical Journal* Vol. **73**, Issues 1-2, 99-111
- BEEBEE T.J.C. (1995): Amphibian breeding and climate. *Nature* **374**: 219-220
- BENSCH S., ÅKESSON M. (2005): Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* **14**, 2899-2914
- BERTEAUX D., RÉALE D, MCADAM A.G., BOUTIN S. (2004): Keeping Pace with Fast Climate Change: Can Arctic Life Count on Evolution? *Integr. Comp. Biol.* **44**:140–151
- BIJ DE VAATE A. & KLINK A.G. (1995): *Dikerogammarus villosus* Sowinsky (Crustacea: Gammaridae) a new immigrant in the Dutch part of the Lower Rhine. - *Lauterbornia* **20**: 51-54. Dinkelscherben
- BINELLI A., PROVINI A., GALASSI S. (1997): Trophic modifications in Lake Como (N. Italy) caused by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water, Air, & Soil Pollution* 99 (1-4): 633-640
- BLEARS M.J., DE GRANDIS S.A., LEE H, TREVORS J.T. (1998): Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **21**, 99–114
- BOLLACHE, L., DEVIN, S., WATTIER, R., CHOVET, M., BEISEL, J.N., MORETEAU, J.C., RIGAUD, T.: (2004): Rapid range extension of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in France: potential consequences *Archiv für Hydrobiologie* **160** (1): 57-66

- BOTSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32(3)**:314-31
- BRADSHAW W.E., HOLZAPFEL C.M. (2001): Genetic shift in photoperiodic response correlated with global warming. Online-Publikation:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.241391498> Stand 19.3.2008
- BRADSHAW W.E., HOLZAPFEL C.M. (2006): Evolutionary response to Rapid Climate Change. *Science* **312**, 1477-1478
- BUIJS M. C. M., KELLEHER B., VAN DER VELDE G., BIJ DE VAATE A. (2001): Oxygen consumption, temperature and salinity tolerance of the invasive amphipod *Dikerogammarus villosus*: indicators of further dispersal via ballast water transport. *Arch. Hydrobiol.* **152**: 633–646
- CAMUSSO M., BALESTRINI R., BINELLI A. (200X): Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lake. *Chemosphere* **44**, Issue 2, Juli 2001, 263-270
- CARLTON J.T. (1993): Dispersal Mechanisms of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). In: NALEPA (Hrsg): *Zebra Mussels: Biology, Impacts, and Control*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1993. 667-697
- CARPENTER S.R., FISHER S.G., GRIMM N.B., KITCHELL J.F. (1992) *Global Change and Freshwater Ecosystems*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**: 119-139
- CORANDER J., MARTTINEN P., MÄNTYNIEMI, S. (2006): Bayesian identification of stock mixtures from molecular marker data. *Fishery Bulletin*, in press.
- CORANDER J., MARTTINEN P. (2006): Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers. *Molecular Ecology* **15** (10), 2833–2843.
- DAVIS M.B., SHAW R.G., ETTERTSON J.R. (2005): Evolutionary Responses to Changing Climate. *Ecology* **86** (7): 1704–1714
- DEVIN S., BEISEL J.-N., BACHMANN V., MORETEAU J. C. (2001): *Dikerogammarus villosus* (Amphipoda: Gammaridae): Another invasive species newly established in the Moselle River and French hydrosystems. – *Annls. Limnol. – Int. J. Limnol.* **37**: 21–27

- DEVIN S., PISCART C., BEISEL J.-N., MORETEAU J. C. (2003): Ecological traits of the amphipod invader *Dikerogammarus villosus* on a mesohabitat scale. *Archiv für Hydrobiologie* **158** (1): 43-56
- DEVIN S., PISCART C., BEISEL J.-N., MORETEAU J. C. (2004): Life History Traits of the Invader *Dikerogammarus villosus* (Crustacea: Amphipoda) in the Moselle River, France. *Internat. Rev. Hydrobiol.* **89**: 21-34
- DICK J.T.A., PLATVOET D. (2000): Invading predatory crustacean *Dikerogammarus villosus* eliminates both native and exotic species. *Proceedings: Biological Sciences* Vol 267, Number **1447**: 977-983
- DICK J.T.A., PLATVOET D., KELLY D.W. (2002): Predatory impact of the freshwater invader *D. villosus* (Crustacea: Amphipoda). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**,6: 1078-1084
- ECKROAT L.R., MASTELLER E.C., SHAFFER J.C., STEELE L.M. (1993): The Byssus of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*): Morphology, Byssal Thread Formation, and Detachment. In: NALEPA (Hrsg): *Zebra Mussels: Biology, Impacts, and Control*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1993. 239-263
- FELSENSTEIN, J. (2006): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.66. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- GARTON D.W., HAAG W.R. (1991): Heterozygosity, Shell Length and Metabolism in the European Mussel, *Dreissena polymorpha*, from a Recently Established Population in Lake Erie. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. **99A**. No. 1/2: 45-48
- HAAS G., BRUNKE M., STREIT B. (2002): Fast turnover in dominance of exotic species in the Rhine river determines biodiversity and ecosystem function: An affair between amphipods and mussels. In: LEPPÄKOSKI E., GOLLASCH S., OLENIN, S.(eds.) 2002: *Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management*:426-432.
- HEBERT P.D.N., MUNCASTER B.W., MACKIE B.W. (1989): Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes - *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **48**; 1381-1388
- HOLT R.D. (1990): The Microevolutionary Consequences of Climate Change. *Tree* **5**(9): 311-314

HORVATH T.G., LAMBERTI G.A. (1996): Drifting Macrophytes as a Mechanism for Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) Invasion of Lake-outlet Streams. *The American Midland Naturalist* **138**:29-36

IPCC (Intergovernmental Panel Climate Change) (2001): *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* HOUGHTON J.T., DING Y., GRIGGS D.J., NOGUER M., VAN DER LINDEN P., DAI X., MASKELL K., JOHNSON C.I. (Eds.). Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press ISBN 0521 01495 6

JOHNSON L.E., CARLTON J.T. (1996): Post-establishment spread in large-scale invasions: Dispersal mechanisms of the Zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Ecology* **77**, 6; Academic Research Library. 1686.

JUNGBLUTH J.H. (1996) Einwanderer in der Molluskenfauna von Deutschland, in: GEBHARDT, H. (Hrsg.): *Gebietsfremde Tierarten: Auswirkungen auf einheimische Arten, Lebensgemeinschaften und Biotope, Situationsanalyse;* Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg

KINZELBACH R. (1992): The main features of the Phylogeny and Dispersal of the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*, *Limnologie aktuell* **4**: 5-17

KLEY A., MAIER G (2006): Reproductive characteristics of invasive gammarids in the Rhine-Main-Danube catchment, South Germany. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* **36** (2): 79-90

KWADIJK, J.C.J, ROTMANS J. (1995): The Impact of Climate Change on the River Rhine: A Scenario Study. *Climatic Change* **30**: 397-425

LEAVESLEY G.H. (1994): Modelling the effects of climate change on water resources – a review. *Climatic Change* **28**: 159-177

LECOMPTE F., GRANT W.S., DODSON J., RODRIGUEZ-SANCHEZ R., BOWEN B.W. (2004): Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology* **13**, 2169-2182

LEVITAN M., ETGES W.J. (2005): Climate change and recent genetic flux in populations of *Drosophila robusta*. *BMC Evolutionary Biology* **5**:4

- LLEWELLYN K.S., LOXDALE H.D., HARRINGTON R., BROOKES C.P., CLARK S.J. (2003): Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed by using microsatellites. *Molecular Ecology* **12**, 21-34
- LOHNINGER (2002): DistCalc V1.2 Distribution Calculator, download: http://www.vias.org/simulations/simusoftware_distcalc.html
- LUSCHÜTZKY, E. F. (2005): Bioaccumulation of heavy metals in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in the rivers Danube and Drau and its role as a bioindicator organism. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*, 2005 **17** (2): 68-76
- LYNCH M. und MILLIGAN B.G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99
- MACNEIL C, PLATVOET D. (2005): The predatory impact of the freshwater invader *Dikerogammarus villosus* on native *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda); influences of differential microdistribution and food resources. *Journal of Zoology* **267**: 31-38
- MAHUKU G., MONTOYA C., HENRIQUEZ M. A., JARA C., TERAN H., BEEBE S. (2004): Inheritance and Characterization of Angular Leaf Spot Resistance Gene Present in Common Bean Accession G 10474 and Identification of an AFLP Marker Linked to the Resistance Gene. *Crop Science* **44**(5): 1817 – 1824
- MALAKOFF D. (1999): Biological Invaders Sweep In, *Science* **285**: 1824-1843
- MARSDEN E.J. (1996): Review of Genetic Studies of *Dreissena* ssp., *Amer.Zool.* **36**: 259-270
- MARSDEN E.J., SPIDLE A., MAY B. (1995): Genetic similarity among zebra mussel populations within North America and Europe, *Can. Fish. Aquat. Sci.* **53**: 836-847
- MAY G.E., GELEMBIUK G.W., PANOV V.E., ORLOVA M.I., LEE C.E. (2006): Molecular ecology of zebra mussel invasions. *Molecular Ecology* **15**, 1021-1031
- MCCARTHY J.P. (2001): Ecological Consequences of Recent Climate Change. *Conservation Biology* **15** (2): 320-331
- MENZEL A, DOSE V. (2005): Analysis of long-term time-series of beginning of flowering by Bayesian function estimation. *Meteorol. Z.* **14**:429–34

- MERSCH, J; JEANJEAN, A; SPOR, H; PIHAN, J-C (1992): The freshwater mussel *Dreissena polymorpha* as a bioindicator for trace metals, organochlorines and radionuclides. The Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*. *Limnologie Aktuell* **4**: 227-244.
- MIDDELKOOP, H.; DAAMEN, K.; GELLENS, D.; GRABS, W.; KWADIJK, J.C.J.; LANG, H.; PARMET, B.W.A.H.; SCHÄDLER, B.; SCHULLA J.; WILKE, K. (2001): Impact of climate change on hydrological regimes and water resources management in the Rhine basin. – *Climatic Change* **49**; 105-128
- MILLER, M.P. (1997): Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A windows programm for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Software distributed by the author.
- MINCHIN D., LUCY F., SULLIVAN M. (2002): Zebra mussel: impacts and spread, in: LEPPÄKOSKI E., GOLLASCH S., OLENIN S.(eds.) 2002: Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management: 135-146
- MOON H., NICHOLSON J. S. (2007): AFLP and SCAR Markers Linked to Tomato Spotted Wilt Virus Resistance in Tobacco. *Crop Science*, **47**(5): 1887 – 1894
- MUELLER U.G., WOLFENBARGER L.L.R. (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE* **14** (10): 389- 394
- MÜLLER J. (2001b): Invasion history and genetic population structure of riverine macroinvertebrates. *Zoology* **104**: 346-355
- MÜLLER J., HIDDE D., SEITZ A. (2002a): Canal construction destroys the barrier between major European invasion lineages of the zebra mussel. *Proceedings R. Soc. Lond. B* **269**: 1139–1142
- MÜLLER J., SCHRAMM S., SEITZ A. (2002b): Genetic and morphological differentiation of *Dikerogammarus* invaders and their invasion history in Central Europe. *Freshwater Biology* **47** (11): 2039-2048
- MÜLLER J., WÖLL S., FUCHS U., SEITZ A. (2001a): Genetic Interchange of *Dreissena polymorpha* populations across a canal. *Heredity* **86**:103-109

- MÜLLER O, HERTEL A. (2003): Abundanzentwicklung der invasiven Amphipoda *Dikerogammarus villosus* (Sovinski 1894) und *D. cf. haemobaphes* (Eichwald 1841) in der deutschen Oder und den angrenzenden Kanälen (Crustacea; Amphipoda). Schriftenreihe des BMVEL „Angewandte Wissenschaft“, Heft 498 „Bedrohung der biologischen Vielfalt durch invasive gebietsfremde Arten“ (2003), 245-249
- MULLIS, K.B. (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* **262**: 56-65.
- MÜRLE U., BECKER A. & REY P. (2003): Ein neuer Flohkrebs im Bodensee: *Dikerogammarus villosus* (Grosser Höckerflohkrebs). Online-Publikation: <http://www.bodensee-ufer.de> Stand 26.6.2007
- NEHRING S. (1999): Zur Rolle der Seeschifffahrt bei der Einschleppung fremder Tierarten (Makrozoobenthos) in deutsche Gewässer. In: Gesellschaft für angewandten Umweltschutz und Sicherheit im Seeverkehr (Hrsg.), *Umweltaspekte der Seeschifffahrt*. GAUSS Forum, Bremen, 1999.
- NEHRING S. (2005a): International shipping – a risk for aquatic biodiversity in Germany. In: Nentwig W et al. (Eds.): *Biological Invasions – From Ecology to Control*. *NEOBIOTA* **6**: 125-143
- NEHRING S. (2005b): Neozoa (Makrozoobenthos) in den deutschen Gewässern - Eine Einführung. - AeT Umweltplanung Koblenz, Web-Publikation, <http://www.neozoa.de/> Stand 15.8.2007
- NEI M. AND W.H. LI (1979). Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5269-5273.
- NEI M., (1987): *Molecular evolutionary genetics*. Pp. 512. Columbia University Press, New York.
- NESEMANN H., PÖCKL M., WITTMANN M. (1995): Distribution of epigeal Malacostraca in the middle and upper Danube (Hungary, Austria, Germany). – *Miscnea Zool. Hung.* **10**: 49–68.
- NEUMANN D., BORCHERDING J., JANTZ B. (1993): Growth and Seasonal Reproduction of *Dreissena polymorpha* in the Rhine River and Adjacent Waters. In: NALEPA T.F. (Hrsg.) *Zebra Mussels: Biology, Impacts, and Control*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 95-109

- NEUMANN D.; JENNER H.A. (1992): Studies on the Ecology and Ecotoxicology of the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*, *Limnologie aktuell* **4**: 1-4
- ORLOVA M. (2002): *Dreissena (D.) polymorpha*: Evolutionary origin and biological peculiarities as prerequisites of invasion success, in: LEPPÄKOSKI E., GOLLASCH S., OLENIN, S.(eds.) 2002: Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management: 127-134
- PARMESAN C. (2006): Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **37**: 637-669
- PISCART C, DEVIN S, BEISEL JN, MORETEAU JC (2003): Growth-related life-history traits of an invasive gammarid species: evaluation with a Laird–Gompertz model. *Can. Journal. Zoology* **81**(12): 2006–2014
- PJATAKOVA G. M., TARASOV A. G. (1996): Caspian Sea amphipods: Biodiversity, systematic Position and Ecological Peculiarities of some species. – *Internat. J. of Salt Lake Res.* **5**: 63–79.
- PÖCKL,M (2007): Strategies of a successful new invader in European fresh waters: fecundity and reproductive potential of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in the Austrian Danube, compared with the indigenous *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshwater biology*, **52** (1): 50-63
- POFF N.L. (1991): Regional hydrologic response to climate chane: an ecological perspective. In: FIRTH P., FISHER S.G. (ed.): *Climate Change and Freshwater Ecosystems*. New York: Springer-Verlag 88-115
- POLLUX B., MINCHIN D., VAN DER VELDE G., VAN ALEN T., MOON-VAN DER STAAAY S.Y., HACKSTEIN J. (2003): Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in Ireland, AFLP-fingerprinting and boat traffic both indicate an origin from Britain. *Freshwater Biology* **48**: 1127-1139
- RAJAGOPAL S., VAN DER VELDE G., VAN DER GAAG M., JENNER H.A. (2003): How effective is intermittent chlorination to control adult mussel fouling in cooling water systems? *Water Research* **37** (2): 329-338
- RÉALE D., MCADAM A.G., BOUTIN S., BERTEAUX D. (2003): Genetic and plastic responses of a northern mammal to climate change. *Proc. R.Soc. Lond.* **270**: 591-596

- RICCIARDI A., RASMUSSEN J. B. (1998): Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management. – Can. J. Fish. Aquat. Sci. **55**: 1759–1765.
- SAITOU N, NEI M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol **4**(4): 406-25
- SAITOU N, NEI M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. **4**(4):406-25
- SCHMITT H. (2007): Pressemitteilung: Der Main-Donau-Kanal wird 15 Jahre alt. Lückenschluss der Wasserstraßennetze von West- und Südosteuropa. Web-Publikation, <http://www.wsv.de/wsa-n/aktuell/presse.php.html> (Stand 21.9.2007)
- SCHÖLL F., BECKER C. & TITTIZER T. (1995): Das Makrozoobenthos des schiffbaren Rheins von Basel bis Emmerich 1986-1995.- *Lauterbornia* **21**: 115-137. Dinkelscherben
- SEBESVARI Z, ETTWIG KF, EMONS H (2005): Biomonitoring of tin and arsenic in different compartments of a limnic ecosystem with emphasis on *Corbicula fluminea* and *Dikerogammarus villosus*. J. Environ. Monit. **7**: 203–207
- SIMBERLOFF, D. & VON HOLLE, B. (1999): Positive interactions of nonindigenous species: invasional meltdown? – Biological Invasions **1**: 21 –32.
- SPRUNG M. (1989): Field and laboratory observations of *Dreissena polymorpha* larvae: abundance, growth, mortality and food demands. Archiv für Hydrobiologie ISSN 0003-9136 Codenr. AHYBA4
- SPRUNG M. (1991): Costs of Reproduction: A Study on Metabolic Requirements of the Gonads and Fecundity of the bivalve *Dreissena polymorpha*, *Oecologia* **77**: 526-532
- SPRUNG M. (1992): Observations on Shell Growth and Mortality of *Dreissena polymorpha* in Lakes, *Limnologie aktuell* **4**: 20-27
- SPRUNG M. (1993): The Other Life: An Account of Present Knowledge of the Larval Phase of *Dreissena polymorpha*. In: NALEPA (Hrsg): Zebra Mussels: Biology, Impacts, and Control. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 39-53
- STANCZYKOWSKA A. (1977): Ecology of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in lakes, Pol. Arch. Hydrobiol. **24**: 461-530

- STEINMANN P. (2007): Höckerflohkrebs (*Dikerogammarus villosus*). Web-Publikation, http://www.psteinmann.net/neo_dikerogammarus.html (Stand 26.9.2007)
- TERRIAULT T.W., ORLOVA M.I., DOCKER M.F., MACISAAC H.J., HEATH D.D. (2005): Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. *Heredity* **95**: 16–23
- THIENEMANN A. (1950): Die Verbreitungsgeschichte der Süßwassertierwelt Europas. In: Die Binnengewässer **18A**. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- VAN DER VELDE G., PAFFEN B.G.P., VAN DEN BRINK F.W.B. (1994): Decline of Zebra Mussel Populations in the Rhine. Competition Between Two Mass Invaders (*Dreissena polymorpha* and *Corophium curvispinum*). *Naturwissenschaften* **81**, 32-34
- VAN DER VELDE G., PLATVOET D. (2007): Quagga mussels *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov, 1897) in the MainRiver (Germany). *Aquatic Invasions* **2**(3): 261-264
- VAN RIEL M.C., VAN DER VELDE G., BIJ DE VAATE A. (2003): Alien amphipod invasions in the river Rhine due to river connectivity: a case of competition and mutual predation. In: N. Douben & A.G. van Os (eds.): *Proceedings NCR-days 2003: Dealing with Floods within Constraints*.
- VAN RIEL M.C., VAN DER VELDE G., RAJAPOPAL S., MARGUILLIER S., DEHAIRS F., BIJ DE VAATE A. (2006): Trophic relationships in the Rhine food web during invasion and after establishment of the Ponto-Caspian invader *Dikerogammarus villosus*. *Hydrobiologica* **565**: 39-58
- VEKEMANS X. (2002): AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- VEKEMANS X., BEAUWENS T., LEMAIRE M., ROLDAN-RUIZ I. (2002): Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* **11**: 139-151.
- VISSER M.E., BOTH C. (2005): Shifts in phenology due to global climate change: the need for a yardstick. *Proceedings of the Royal Society B* (272): 2561-2569
- VITOUSEK P.M. (1992): Global Environmental Change: An Introduction. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**: 1-14

- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* **23**: 4407–4414.
- WALTHER G.-R., POST E., CONVEY P., MENZEL A., PARMESAN C., BEEBEE T.J.C., FROMENTIN J.-M., HOEGH-GULDBERG O., BAIRLEIN F. (2002): Ecological Responses to recent climate change. *Nature* **46**: 389-395
- WATSON T., ZINYOWERA M.C., MOSS R.H. (1998): *The Regional Impacts of Climate Change: An Assessment of Vulnerability*. Cambridge University Press, ISBN 0521634555
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18** (22): 6531-6535
- WILSON A.B., NAISH K.-A., BOULDING E.G. (1999): Multiple dispersal strategies of the invasive quagga mussel (*Dreissena bugensis*) as revealed by microsatellite analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56**(12): 2248–2261
- WINDER M., SCHINDLER D.E. (2004): Climate change uncouples trophic interactions in an aquatic ecosystem. *Ecology* **85**: 2100-2106
- ZHOU W., KOLB F.L, BAI G., SHANER G., DOMIER L.L. (2002): Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. *Genome* **45**: 719–727

7. Anhang

Rezepte

DNA-Extraktionsvorschrift

DNA-Extraktion nach dem Standard-Protokoll des *High Pure PCR Template Preparation Kit* der Firma Roche:

Lyse:

1. Probenmaterial in 200 µl Lyse-Puffer geben
2. Zugabe von 40 µl Proteinkinase K und einige Stunden bei 55 °C inkubieren (vortexen)

DNA-Bindung:

3. Zugabe von 200 µl Bindungspuffer (vortexen)
4. Inkubation für 10 min bei 72 °C
5. Mischen mit 100 µl Isopropanol (100%) (vortexen)
6. beschriftete Filtertubes in Auffangröhrchen setzen
7. Flüssigkeit in Filtertube umpipettieren

Zwischenschritt:

8. Elutionspuffer auf 70 °C vorwärmen

Reinigung:

9. Zentrifugieren 1 min bei 8000 U/min, Auffanggefäß verwerfen
10. 500 µl Waschpuffer in das obere Reservoir pipettieren
11. Zentrifugieren 1 min bei 8000 U/min, Durchlauf und Auffanggefäß verwerfen
12. 500 µl Waschpuffer in das obere Reservoir pipettieren
13. Zentrifugieren 1 min bei 8000 U/min
14. 10 s bei 13000 U/min zentrifugieren, Auffanggefäß verwerfen

Elution:

15. Filtertube in neues beschriftetes Eppendorf-Tube (1,5 ml) einsetzen
16. 50 µl Elutionspuffer – vorgewärmt auf 70°C – zugeben
17. Zentrifugieren 1 min bei 8000 U/min
18. Lagerung der DNA bei -20°C

1. Restriktions-Ansatz (Chemikalien von BioLabs)

Pro Probe

0,25µl	EcoRI
0,5µl	MseI
0,25µl	BSA 100x
17µl	NEBuffer 2 (1x)
18µl	

+ 7µl DNA-Lösung (ca. 30ng/µl)

1,5 Stunden bei 37°C inkubieren, danach 5µl Ligations-Ansatz hinzufügen:

2. Ligations-Ansatz

Pro Probe

4µl	T4 Ligasebuffer (1x)
0,25µl	EcoR1 Adapter (10pmol/µl)
0,5µl	MseI Adapter (50pmol/µl)
0,25µl	T4 DNA Ligase (10u/µl)
5µl	

Über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren, danach mit 30µl H₂O dest. verdünnen.

3. Präselektiver Reaktionsansatz

15,40µl	H ₂ O
2,5µl	PCR-Puffer (10x BioTherm ohne MgCl ₂)
1,25µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,25µl	dNTPs (20 mM)
0,25µl	Primer M02 (M57-1) (50 ng/µl)
0,25µl	Primer E01 (50 ng/µl)
0,1µl	Taq-Polymerase (BioTherm; 5 U/µl)
5µl	Produkt Restriktions-Ligations-Ansatz
25µl	

4. Präselektive PCR

Protokoll des Thermocyclers im Roboter MWG AG Biotech Roboseq® 4204 SE:

step	Protokoll für beide Tierarten
1	Close Cycler Lid with 150 N
2	Heat Lid to 100.0 °C
3	Hold 72.0 °C for 2 min 0 sec
4	Start Cycle Loop (20 Cycles)
5	Hold 94.0 °C for 0 min 20 sec
6	Hold 56.0 °C for 0 min 30 sec
7	Hold 72.0 °C for 2 min 0 sec
8	End Cycle Loop
9	Hold 72.0 °C for 2 min 0 sec
10	Hold 60.0 °C for 30 min 0 sec
11	Store for 1 min 0 sec at 8 °C
12	Hold 4.0 °C forever

5µl des PCR-Produktes mit 35µl H₂O dest. verdünnen.

5. Selektiver PCR-Reaktionsansatz

7,12µl	H ₂ O
1,50µl	PCR-Puffer (10x BioTherm ohne MgCl ₂)
0,75µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,15µl	dNTPs (20 mM)
0,25µl	MseI Primer-Mxx (50 ng/µl)
0,18µl	EcoRI Dye -Primer-Exx* (50 ng/µl)
0,05µl	Taq-Polymerase (BioTherm; 5 U/µl)
5,00µl	Produkt Präselektive PCR (verdünnt)
15,00µl	

6. Selektive PCR

Protokoll des Thermocyclers im Roboter MWG AG Biotech Roboseq® 4204 SE:

step	Protokoll <i>Dreissena polymorpha</i>	Protokoll <i>Dikerogammarus villosus</i>
1	Close Cycler Lid with 150 N	Close Cycler Lid with 150 N
2	Heat Lid to 100.0 °C	Heat Lid to 100.0 °C
3	Hold 94.0 °C for 2 min 0 sec	Hold 94.0 °C for 2 min 0 sec
4	Start Cycle Loop (10 Cycles)	Start Cycle Loop (14 Cycles)
5	Hold 94.0 °C for 0 min 20 sec	Hold 94.0 °C for 0 min 20 sec
6	Hold 66.0°C for 0 min 30sec (inc.-1,0)	Hold 68.0°C for 0 min 30sec (inc.-0,7)
7	Hold 72.0 °C for 2 min 0 sec	Hold 72.0 °C for 2 min 0 sec
8	End Cycle Loop	End Cycle Loop
9	Start Cycle Loop (20 Cycles)	Start Cycle Loop (20 Cycles)
10	Hold 94.0 °C for 0 min 20 sec	Hold 94.0 °C for 0 min 20 sec
11	Hold 56.0 °C for 0 min 30 sec	Hold 58.0 °C for 0 min
12	Hold 72.0 °C for 2 min 0 sec	Hold 72.0 °C for 2 min 0 sec
13	End Cycle Loop	End Cycle Loop
14	Hold 60.0 °C for 30 min 0 sec	Hold 60.0 °C for 30 min 0 sec
15	Store for 1 min 0 sec at 8 °C	Store for 1 min 0 sec at 8 °C
16	Hold 4.0 °C forever	Hold 4.0 °C forever

7. Verwendete Primer-Kombinationen:

	<i>Dreissena polymorpha</i>		<i>Dikerogammarus villosus</i>	
Blau (6-FAM)	E39*	M49	E39	M57+T
Gelb (NED)	E40*	M57	E40	M57+T
Grün (HEX)	E94*	M57	E45	M57+A

Farbmarkierte Primer (*) von Applied Biosystems UK

Unmarkierte Primer von MWG Biotech

Immer 5'-3' notiert

EcoRI-Adapter

EcoRI (-): CTC GTA GAC TGC GTA CC

EcoRI (+): AAT TGG TAC GCA GTC

MseI-Adapter

MseI (-): GAC GAT GAG TCC TGA G

MseI (+): TAC TCA GGA CTC AT

MSEI-Primer (Mxx)

Präselektive Primer

E01: GAC TGC GTA CCA ATT CA

M02: GAT GAG TCC TGA GTA AC

M57-1: GAT GAG TCC TGA GTA ACG

Selektive Primer

M49: GAT GAG TCC TGA GTA ACA G

M57: GAT GAG TCC TGA GTA ACG G

M57+T: GAT GAG TCC TGA GTA ACG GT

M57+A: GAT GAG TCC TGA GTA ACG GA

Farbmarkierte EcoRI-Primer (Exx)

E39*: GAC TGC GTA CCA ATT C A GA -FAM

E40*: GAC TGC GTA CCA ATT C A GC -NED

E45*: GAC TGC GTA CCA ATT C A TG -HEX

E94*: GAC TGC GTA CCA ATT C A AG -HEX

Gelelektrophorese

10x TBE-Puffer

540g Tris

275 g Borsäure

37,5g Titriplex III

auf 5 l mit Aqua dest. Auffüllen

zum Gebrauch 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen

Polyacrylamidgel (4,5%)

18g Harnstoff

7,5ml 30% Acrylamidlösung

23ml Aqua bidest. (Fa. ROTH)

6ml 10x TBE – Puffer

300µl 10% APS

20µl TEMED

Elektrophoresepuffer

1x TBE-Puffer (10x TBE-Puffer 1:10 = 1 + 9 verdünnen)

Loadingbuffer-Mix (Ansatz für 36 Proben)

Chemikalien von Applied Biosystems UK

Formamid	72 µl
Loadingbuffer	28 µl
GS 500 ROX-Standard	19,5 µl
	119,5 µl

Entnahmeorte

Main:

Randersacker (Main-km 258,9)

Datum 16.8.2005

Oberhalb:

Ca. 500m oberhalb des Stauwehres

Strömung < 0,1m/s

Rechte Flussseite:

Km-Stein "6"

Neue Aufschüttung (ca. 3 Monate)

Sehr wenig Dreissena, alle äußerst klein (neubesiedelt)

Dikerogammarus häufig

Linke Flussseite:

Dreissena häufiger als rechts und größer

Dikerogammarus mitteldichte Besiedlung

Unterhalb linke Flussseite

Direkt am Auslauf Wasser-Kraftwerk Randersacker

Strömung 0,6-1,1 m/s

Dreissena relativ häufig und z.T. groß

Dikerogammarus nicht sehr häufig und kleiner als oberhalb

Harrbach Ortsteil Gemünden (Main-km 219,5)

Datum 16.8.2005

Oberhalb linke Flussseite

Strömung < 0,1m/s

Steine teilweise fest einbetoniert

Dreissena meist klein mit größeren Ansammlungen pro Stein, größere Exemplare einzeln

Dikerogammarus nicht sehr häufig

Oberhalb rechte Flussseite

500m Entfernung von Staumauer

In Verwirbelungszone relativ starker Strömung (0,4 - 0,6m/s)

Steine oft lose eingeschüttet

Bestand beider Spezies relativ hoch

Insgesamt starker Bewuchs der Steine auch mit anderen Spezies (u.a. Corbicula)

Faulbach (bei Miltenberg) (Main-km 147,1)

Datum 17.8.2005

Oberhalb rechte Flussseite

Strömung < 0,1m/s

Dreissena häufig

Dikerogammarus scheinbar weniger häufig, aber nicht gut feststellbar, da Steine fest einbetoniert und daher schlecht absammelbar. Daher größerer Sammelbereich über eine Uferlänge von ca. 300m

Unterhalb linke Flussseite

Beide sehr häufig, bis ca. 35 Individuen auf einem großen Stein

Strömung sehr stark (0,8 – 1,2m/s)

Absammelorte teilweise direkt in der Strömung, hier Dreissena gut vertreten,

Dikerogammarus bei zu starker Strömung weniger; mehr in Verwirbelungszonen bzw. in Lücken, teilweise unter Dreissena.

Eddersheim (Main-km 15,6)

Datum 18.5.06

Oberhalb rechte Flussseite

Strömung < 0,1m/s

Schlickreicher Untergrund

Beide Spezies nicht sehr häufig

Unterhalb rechte Flussseite

Strömung 0,3 – 0,6 m/s

Absammlung unmittelbar in der Strömung, aber diese nicht sehr stark

Dreissena viele kleine Exemplare, große nicht sehr häufig.

Mühlheim (Main-km 53,2)

Datum 18.8.05

Oberhalb rechte Flussseite

Dreissena nicht sehr häufig

Schlickreicher Untergrund

Strömung < 0,1m/s

Entnahmestelle relativ weit von Stauwehr entfernt (ca. 1km), da vorher Uferbereich betoniert.

Unterhalb rechte Flussseite

Direkt an Wasser-Kraftwerks-Auslauf, daher starke

Strömung 0,8 – 1,2 m/s

Steine lose eingeschüttet

Beide Spezies recht häufig

Dreissena mit vielen kleinen Exemplaren vertreten

Mosel:

Lehmen (Mosel-km 21)

Datum 19.8.2006

Oberhalb rechte Flussseite

Strömung < 0,1m/s

Ca. 130m von Stauwehr entfernt, auf Höhe der Baumgruppe

Schlickreicher Untergrund

Beide Arten sehr häufig, gut absammelbar

Zum Teil große Exemplare

Unterhalb rechte Flussseite

Strömung 0,9 – 1,2 m/s

Ca. 110m unterhalb Stauwehr

Dreissena nicht häufig, Dikerogammarus mittlere Dichte

Müden (Mosel-km 37)

Datum 19.8.2006

Oberhalb linke Flussseite

Strömung < 0,1m/s

Ca. 140m vom Wehr

Auf Höhe des Parkplatzes

Bestandsdichte bei beiden Spezies mittel, Dreissena seltener als Dikerogammarus

Unterhalb linke Flussseite

Strömung 0,8 – 1,1 m/s

Ca. 130m vom Wehr

Steine fest eingepasst, wenig lose Schüttung

Wenig Dikerogammarus, Dreissena selten

Bruttig-Fankel (Mosel-km 59)

Datum 16.07.2007

Oberhalb linke Flusseite

Lose Steinschüttung

Strömung < 0,1m/s

Oi 90m vom Wehr, beginnend auf Höhe der ausgestellten Turbine

Abundanzen bei beiden Spezies dicht

Oa 270m vom Wehr, auf Höhe des letzten Hauses auf der anderen Flusseite

An kleiner Anlegestelle

Abundanz: bei Dikerogammarus dicht, Dreissena mittel

Unterhalb linke Flusseite

Ui 90m vom Wehr, nahe der Treppe

Strömung 0,8 – 1m/s

Abundanzen mittel für beide Spezies

Ua 380m vom Wehr, auf Höhe des Kirchturms

Strömung 0,2 - 0,4m/s

Abundanzen für beide Spezies gut, leicht besser als bei Ui

Rhein:

Iffezheim Oberhalb

48°49'21,0"N 8°06'40,5"O

O₂:73%

Abundanz bei beiden Spezies relativ häufig

Unterhalb

O₂: 87%

Rechte Seite: Beprobung v. Dikerogammarus

48°50'01,5"N 8°06'35,5"O

Strömung ~0,4 m/s (ca. 50m vom Wehr und seitlich versetzt beprobt)

Hier Dikerogammarus relativ häufig, Dreissena praktisch nicht vorhanden, daher

Linke Seite: Beprobung von Dreissena

48°50'00,5"N

8°06'43,0"O

Abundanz Dreissena relativ gering und in größerer Tiefe ab ca.1m, Dikerogammarus besser

Strömung 0,7 – 1m/s

Gamsheim

Unterhalb

48°41'07,3"N

7°54'57,2"O

O₂: 89%

Strömung 0,7 – 0,9 m/s

Abundanzen beide mittel, Dreissena etwas seltener

Oberhalb

48°40'51,6"N

7°55'09,7"O

Strömung < 0,1m/s

Abundanz beide nur vereinzelt

Starker Algenbewuchs

Tab A-1: Daten aus AFLPSurv für *D. polymorpha* (Teil 1)

		mean fragment size 197,87 S.D. mfz 89,84				Gene diversity within populations [Lynch & Milligan method]						
						#pop	Gdiv innerh. Pop	Stabw Gdiv	Varianz von H(w)	Var.-Anteil Indiv.	Var.-Anteil Loci	Var.-Anteil Popul.
							Hw	S.E. Hw	Var(Hw)	Var'i(Hw) %	Var'L(Hw) %	Var'P(Hw) %
		Mean number of fragments per individual	Total number of segregating fragments	Total number of segregating fragments [%]	Correlation between size and #							
	alle 18 Pop	115,8	580	100,0	-0,2692	18	0,1452	0,0036	0,00001	1,19	18,55	80,26
Flüsse	alle Main	110,5	563	97,1	-0,2517	8	0,1480	0,0068	0,00005	0,81	11,47	87,72
	alle Mosel	113,7	543	93,6	-0,2548	6	0,1417	0,0064	0,00004	1,02	17,03	81,94
	alle Rhein	128,3	468	80,7	-0,1723	4	0,1449	0,0012	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
	U vs. O	alle U	116,7	580	100,0	-0,2685	9	0,1483	0,0053	0,00003	1,14	17,41
	alle O	115,0	574	99,0	-0,2637	9	0,1420	0,0050	0,00003	1,21	19,25	79,55
U	alle U Main	113,7	550	94,8	-0,2635	4	0,1555	0,0095	0,00009	0,88	11,7	87,41
	alle U Mosel	115,3	513	88,4	-0,2302	3	0,1414	0,0092	0,00009	1,00	16,26	82,74
	alle U Rhein	123,8	439	75,7	-0,1660	2	0,1445	0,0028	0,00001	k.A.	k.A.	k.A.
O	alle O Main	107,3	528	91,0	-0,2171	4	0,1405	0,0094	0,00009	0,80	12,1	87,00
	alle O Mosel	112,1	525	90,5	-0,2545	3	0,1420	0,0110	0,00012	0,69	11,77	87,54
	alle O Rhein	132,7	409	70,5	-0,1845	2	0,1452	0,0006	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
Main	Ran	103,1	483	83,3	-0,2265	2	0,1397	0,0108	0,00012	1,18	18,08	80,74
	Har	126,0	505	87,7	-0,2377	2	0,1669	0,0015	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
	Fau	106,2	445	76,1	-0,1843	2	0,1373	0,0065	0,00004	3,83	46,78	49,39
	Edd	105,2	495	89,8	-0,2326	2	0,1480	0,0243	0,00059	0,25	3,47	96,28
Mosel	Brf	110,7	394	67,9	-0,2141	2	0,1280	0,0013	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
	BrfU (i-a)	110,1	352	60,7	-0,1942	2(1)	0,1229	0,0062	0,00004	5,60	52,36	42,04
	BrfO (i-a)	111,4	354	61,0	-0,2172	2(1)	0,1333	0,0002	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
	Mud	110,8	467	80,5	-0,2361	2	0,1359	0,0032	0,00001	k.A.	k.A.	k.A.
	Leh	119,7	509	87,7	-0,2549	2	0,1611	0,0027	0,00001	k.A.	k.A.	k.A.
Rhein	Gam	127,2	400	69,0	-0,1625	2	0,1432	0,0015	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
	Iff	129,3	430	74,1	-0,1750	2	0,1466	0,0008	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.

Tab A-2: Daten aus AFLPSurv für *D. polymorpha* (Teil 2)

		Population genetic structure [Lynch & Milligan method]									
		totale Gdiv	Gdiv zw. Pop	Stabw Gdiv zw Pop	Var Gdiv zw Pop				Fst bei Permutation	Fst bei Permutation	Signifikanz Fehler 1.Art
		Ht	Hb	S.E. Hb	Var Hb	Fst	S.E. Fst	VarFst	95%Level	99%Level	p
alle 18 Pop		0,1690	0,0238	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1408	0,0181	0,0003			
Flüsse	alle Main	0,1620	0,0140	0,0013	0,0000	0,0867	0,0818	0,0067			
	alle Mosel	0,1518	0,0101	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0610	0,0000				
	alle Rhein	0,1539	0,0090	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0583	0,0000				
U vs. O	alle U	0,1731	0,0247	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1426	0,0259	0,0007			
	alle O	0,1672	0,0251	0,0023	0,0000	0,1503	0,0807	0,0065			
U	alle U Main	0,1716	0,0161	0,003155	0,00001	0,0939	0,175305	0,030732			
	alle U Mosel	0,1538	0,0124	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0803	0,0649	0,0042			
	alle U Rhein	0,1579	0,0134	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0848	0,0180	0,0003			
O	alle O Main	0,1533	0,0128	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0832	0,0334	0,0011			
	alle O Mosel	0,1532	0,0112	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0727	0,1189	0,0141			
	alle O Rhein	0,1545	0,0093	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0600	0,0037	0,0000			
Main	Ran	0,1578	0,0180	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1137	0,0678	0,0046	0,0055	0,0096	0,0000
	Har	0,1792	0,0123	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0684	0,0081	0,0001	0,0053	0,0087	0,0000
	Fau	0,1468	0,0095	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0644	0,0444	0,0020	0,0060	0,0107	0,0000
	Edd	0,1630	0,0150	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0900	0,1460	0,0213	0,0049	0,0087	0,0000
Mosel	Brf	0,1285	0,0005	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0410	0,0103	0,0001	0,0018	0,0032	0,0018
	BrfU (i-a)	0,1315	0,0016	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0124	0,0471	0,0022	0,0025	0,0051	0,0001
	BrfO(i-a)	0,1338	0,0005	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0035	0,0011	0,0000	0,0034	0,0063	0,0242
	Mud	0,1406	0,0046	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0330	0,0224	0,0005	0,0030	0,0053	0,0000
	Leh	0,1640	0,0030	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0180	0,0165	0,0003	0,0033	0,0056	0,0001
Rhein	Gam	0,1462	0,0030	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0208	0,0102	0,0001	0,0023	0,0040	0,0000
	Iff	0,1500	0,0034	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0266	0,0051	0,0000	0,0042	0,0063	0,0000

Tab A-3: Daten aus AFLPSurv für *D. villosus* (Teil 1)

mean fragment size 226,4 S.D. mFz 97,28		Mean number of fragments per individual	Total number of segregating fragments	Total number of segregating fragments [%]	Correlation between size and #	#pop	Gene diversity within populations [Lynch & Milligan method]					
							Gdiv innerh. Pop	STABW. Gdiv	Varianz von H(w)	Var.-Anteil Indiv.	Var.-Anteil Loci	Var.-Anteil Popul.
							Hw	S.E. Hw	Var(Hw)	Var'i(Hw) %	Var'L(Hw) %	Var'P(Hw) %
	alle 16 Pop	125,0	831	100	-0,2606	16	0,1148	0,0067	0,00005	0,24	3,41	96,35
Flüsse	alle Main	134,9	826	99,4	-0,3230	6	0,1416	0,0043	0,00002	1,74	23,19	75,06
	alle Mosel	113,8	700	84,2	-0,1939	6	0,0932	0,0092	0,00009	0,28	4,56	95,17
	alle Rhein	126,5	650	78,2	-0,1915	4	0,1070	0,0059	0,00003	1,46	18,43	80,11
	alle U	118,3	818	98,4	-0,2307	8	0,1076	0,0100	0,00010	0,19	2,95	96,86
U vs. O	alle O	131,9	823	99	-0,2775	8	0,1219	0,0089	0,00008	0,31	4,07	95,62
U	alle U Main	129,2	800	96,3	-0,2764	3	0,1363	0,0057	0,00003	1,94	25,11	72,95
	alle U Mosel	106,0	597	71,8	-0,1827	3	0,0858	0,0150	0,00023	0,17	3,33	96,51
	alle U Rhein	123,1	518	62,3	-0,1533	2	0,0974	0,0003	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
O	alle O Main	140,0	800	96,3	-0,3190	3	0,1470	0,0057	0,00003	2,10	28,61	69,29
	alle O Mosel	123,0	608	73,2	-0,2168	3	0,1005	0,0121	0,00015	0,39	5,48	94,13
	alle O Rhein	130,3	594	71,5	-0,2196	2	0,1165	0,0048	0,00002	4,78	55,14	40,08
Main	GRan	132,1	754	90,7	-0,2325	2	0,1318	0,0065	0,00004	1,73	28,99	69,28
	GHar	129,5	749	90,1	-0,3172	2	0,1486	0,0091	0,00008	1,68	15,43	82,89
	GMul	142,6	757	91,1	-0,2523	2	0,1445	0,0005	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
Mosel	GBrf	108,4	510	61,4	-0,1823	2	0,0910	0,0040	0,00002	3,52	71,99	24,49
	GBrfUa-i	105,3	401	48,3	-0,1611	2(1)	0,0894	0,0003	0,00000	k.A.	k.A.	k.A.
	GBrfOa-i	111,6	444	53,4	-0,1990	2(1)	0,0963	0,0077	0,00006	1,90	20,12	77,98
	GMud	82,7	400	48,1	-0,1983	2	0,0711	0,0118	0,00014	0,58	6,54	92,88
	GLeh	140,9	595	71,6	-0,1821	2	0,1175	0,0062	0,00004	1,95	36,88	61,77
Rhein	GGam	130,1	540	65	-0,1730	2	0,1095	0,0118	0,00014	0,55	9,78	89,67
	GIff	119,8	512	61,6	-0,2054	2	0,1044	0,0073	0,00005	2,31	21,92	75,77

Tab A-4: Daten aus AFLPSurv für *D. villosus* (Teil 2)

		Population genetic structure [Lynch & Milligan method]									
		totale Gdiv	Gdiv zw. Pop	Stabw Gdiv zw Pop	Var Gdiv zw Pop				Fst bei Permutation	Fst bei Permutation	Signifikanz Fehler 1.Art
		Ht	Hb	S.E. Hb	Var Hb	Fst	S.E. Fst	VarFst	95%Level	99%Level	p
	alle 18 Pop	0,1305	0,0157	0,001124	0,000001	0,1203	0,0814	0,0066			
Flüsse	alle Main	0,1523	0,0107	0,001377	0,000002	0,0702	0,1171	0,0137			
	alle Mosel	0,1061	0,0130	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1212	0,0000				
	alle Rhein	0,1235	0,0166	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1328	0,0000				
	U vs. O	alle U	0,1237	0,0161	0,001171	0,000001	0,1291	0,1085	0,0118		
	alle O	0,1381	0,0162	0,001521	0,000002	0,1167	0,1083	0,0117			
U	alle U Main	0,1451	0,0088	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0609	0,0000				
	alle U Mosel	0,1003	0,0144	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1411	0,1371	0,0188			
	alle U Rhein	0,1177	0,0203	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1722	0,0027	0,0000			
O	alle O Main	0,1579	0,0109	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0690	0,0231	0,0005			
	alle O Mosel	0,1168	0,0163	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1382	0,0491	0,0024			
	alle O Rhein	0,1398	0,0232	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,1660	0,0346	0,0012			
Main	GRan	0,1379	0,0061	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0442	0,0472	0,0022	0,0053	0,0090	<10 ⁻⁶
	GHar	0,1646	0,0161	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0973	0,0548	0,0030	0,0050	0,0089	<10 ⁻⁶
	GMul	0,1478	0,0033	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0223	0,0035	0,0000	0,0076	0,0131	0,0002
Mosel	GBrf	0,0915	0,0005	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0054	0,0438	0,0019	0,0020	0,0039	0,0011
	GBrfU i-a	0,0904	0,0010	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0110	0,0027	0,0000	0,0033	0,0065	0,0004
	GBrfUO i-a	0,1003	0,0040	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0399	0,0762	0,0058	0,0043	0,0086	<10 ⁻⁶
	GMud	0,0724	0,0013	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0179	0,1588	0,0252	0,0040	0,0069	<10 ⁻⁶
	GLeh	0,1213	0,0039	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0317	0,0510	0,0026	0,0102	0,0129	<10 ⁻⁶
Rhein	GGam	0,1131	0,0036	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0311	0,1034	0,0107	0,0280	0,0490	<10 ⁻⁶
	Giff	0,1119	0,0075	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	0,0666	0,0650	0,0042	0,0056	0,0107	<10 ⁻⁶

Tab A-5: Daten aus AFLPSurv für *D. polymorpha* (Teil 3)

	Population	Ø n	% polym. Loci	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)	VarL%
Main	RanU	37	45,9	0,1505	0,00654	0,000043	92,6
	RanO	40	38,1	0,1290	0,00681	0,000046	95,1
	HarU	36	52,1	0,1684	0,00724	0,000052	93,8
	HarO	43	48,4	0,1655	0,00686	0,000047	93,9
	FauU	32	39,5	0,1308	0,00637	0,000041	92,1
	FauO	32	43,3	0,1439	0,00677	0,000046	92,7
	EddU	40	53,8	0,1723	0,00678	0,000046	93,2
	EddO	33	35,5	0,1236	0,00647	0,000042	93,5
Mosel	BrfU	47	39,7	0,1267	0,00654	0,000043	94,7
	BrfO	47	40,9	0,1294	0,00664	0,000044	94,7
	BrfUa	23	39	0,1361	0,00682	0,000047	90,3
	BrfUi	24	36	0,1237	0,00656	0,000043	90,4
	BrfOa	23	38,6	0,1332	0,00683	0,000047	90,7
	BrfOi	23	37,2	0,1335	0,00672	0,000045	90,3
	MuedU	46	41,6	0,1391	0,00658	0,000043	94,1
	MuedO	47	39	0,1328	0,00659	0,000043	95
	LehU	43	48,6	0,1584	0,00676	0,000046	93,8
	LehO	42	47,2	0,1638	0,00685	0,000047	93,8
Rhein	GamU	44	43,6	0,1417	0,00699	0,000049	94,4
	GamO	42	42,9	0,1447	0,00714	0,000051	94,4
	IffU	43	40,2	0,1473	0,00723	0,000052	95,4
	IffO	45	45,3	0,1458	0,00695	0,000048	93,8

Tab A-6: Daten aus AFLPSurv für *D. villosus* (Teil 3)

	Population	Ø n	% polym. Loci	Hj	S.E.(Hj)	Var(Hj)	VarL%
Main	GRanU	47	39,6	0,12523	0,005	0,000025	94,3
	GRanO	46	42	0,13827	0,00521	0,000027	94,4
	GHarU	28	46,9	0,13951	0,00502	0,000025	90
	GHarO	35	46,8	0,15762	0,00556	0,000031	90,3
	GMulU	41	44,4	0,14403	0,00528	0,000028	94
	GMulO	44	42,1	0,14506	0,00555	0,000031	95
Mosel	GBrfU	48	27	0,08695	0,00486	0,000024	95,5
	GBrfO	46	28,9	0,09497	0,005	0,000025	95,2
	GBrfUa	24	25,6	0,08965	0,00495	0,000024	91,6
	GBrfUi	24	25,6	0,08915	0,00504	0,000025	91,9
	GBrfOa	24	25,2	0,08862	0,00448	0,000024	91
	GBrfOi	22	27,7	0,10402	0,00533	0,000028	91,7
	GMuedU	37	18,4	0,0593	0,0042	0,000018	93,7
	GMuedO	22	23,1	0,08292	0,0047	0,000022	90,4
	GLehU	47	31,9	0,11128	0,00544	0,000030	96
	GLehO	42	38,7	0,12369	0,00549	0,000030	94
Rhein	GGamU	47	29,2	0,09772	0,00524	0,000027	95,4
	GGamO	37	36,6	0,12137	0,00551	0,000030	94
	GIfFU	23	27,4	0,09709	0,0051	0,000026	91,2
	GIfFO	24	32,7	0,1117	0,00507	0,000026	89,7

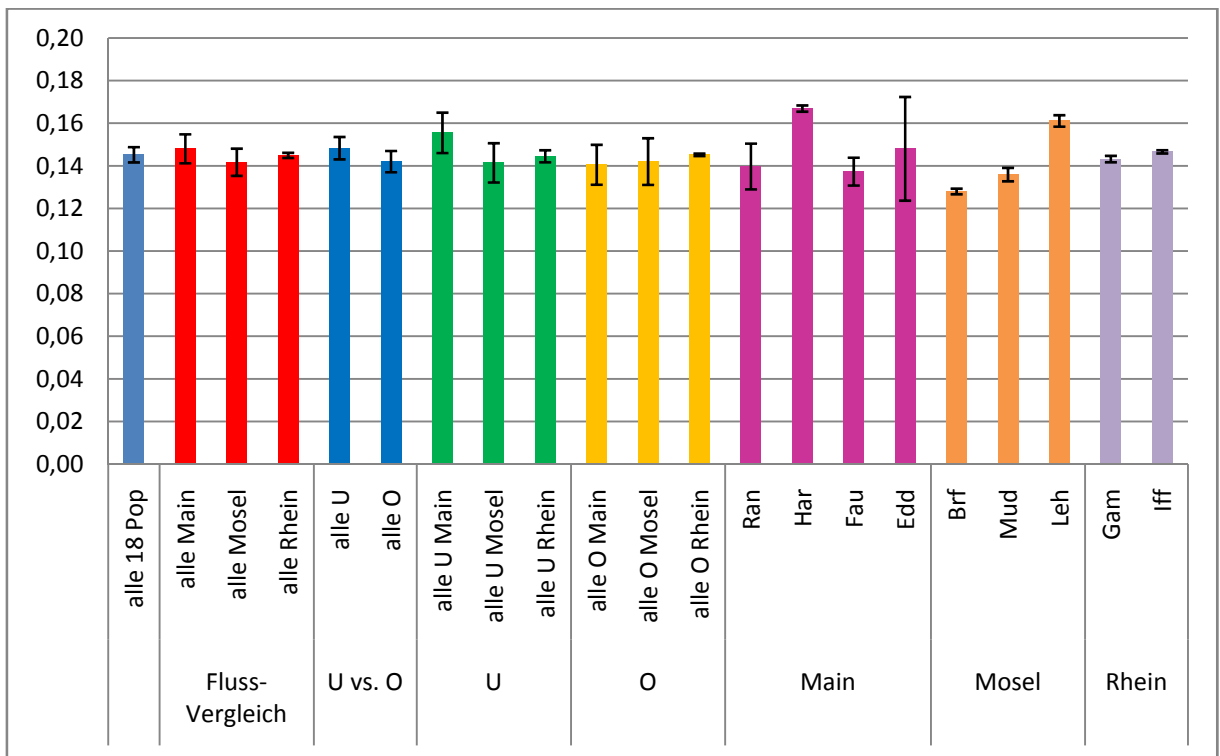


Abb. A-1: Genetic Diversity (Hw) innerhalb der zusammengefassten Populationen von *D. polymorpha*

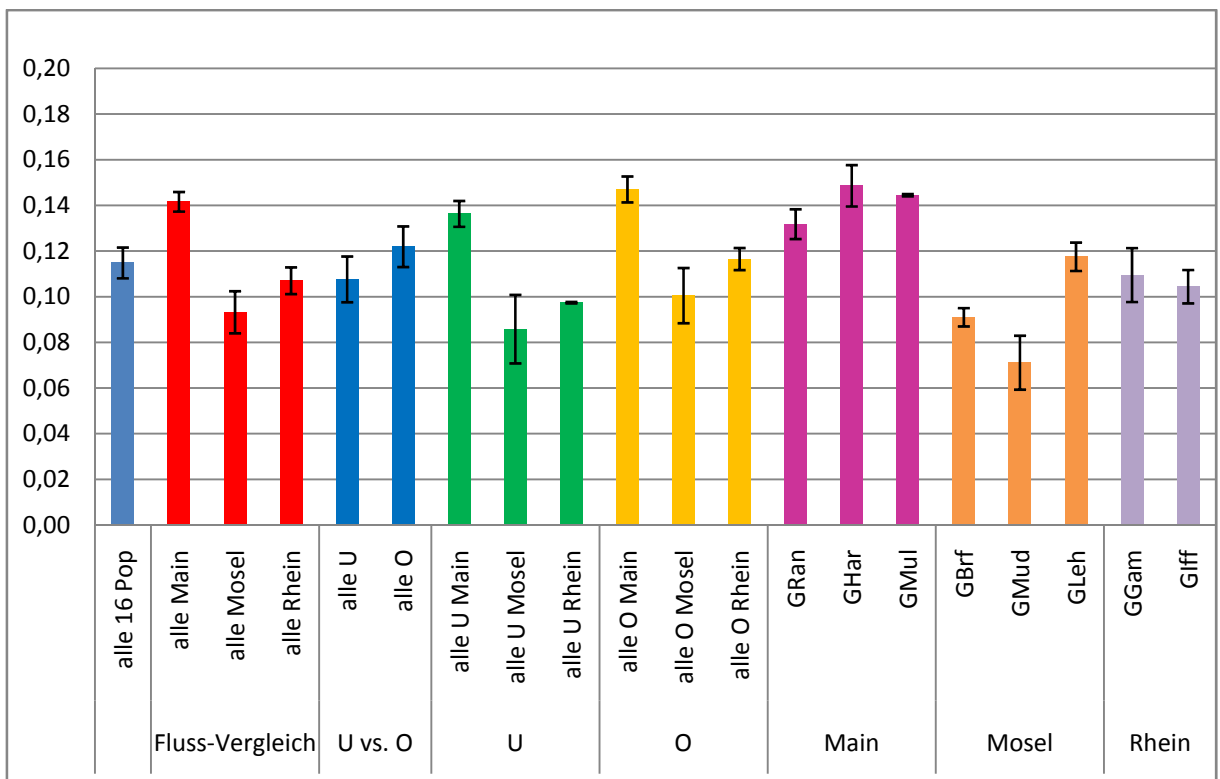


Abb.A-2: Genetic Diversity (Hw) innerhalb der zusammengefassten Populationen von *D. villosus*

Phylogramme auf Individuenbasis aus PAUP

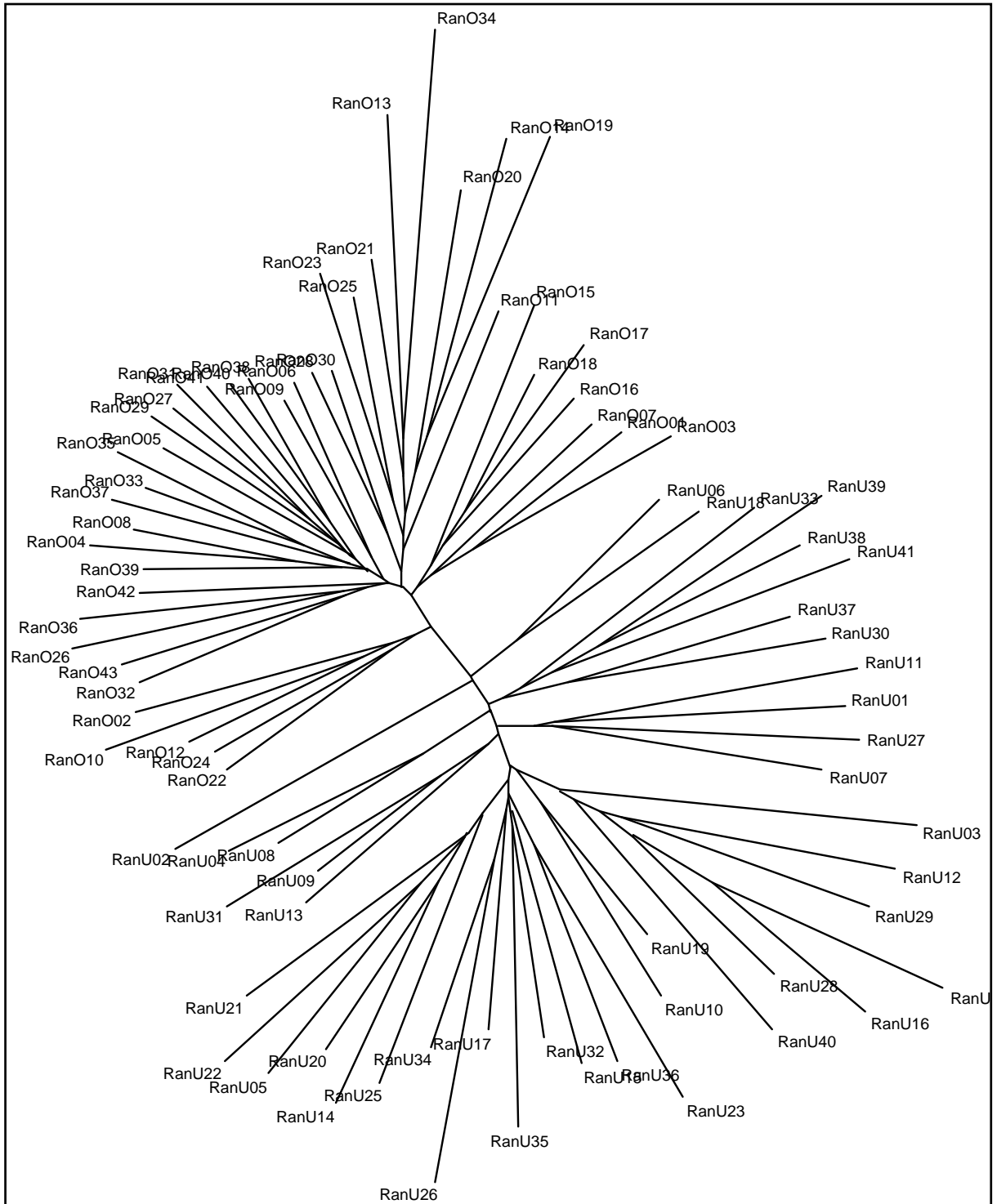


Abb. A-3: Phylogramm der Population Ran (*D. polymorpha*)

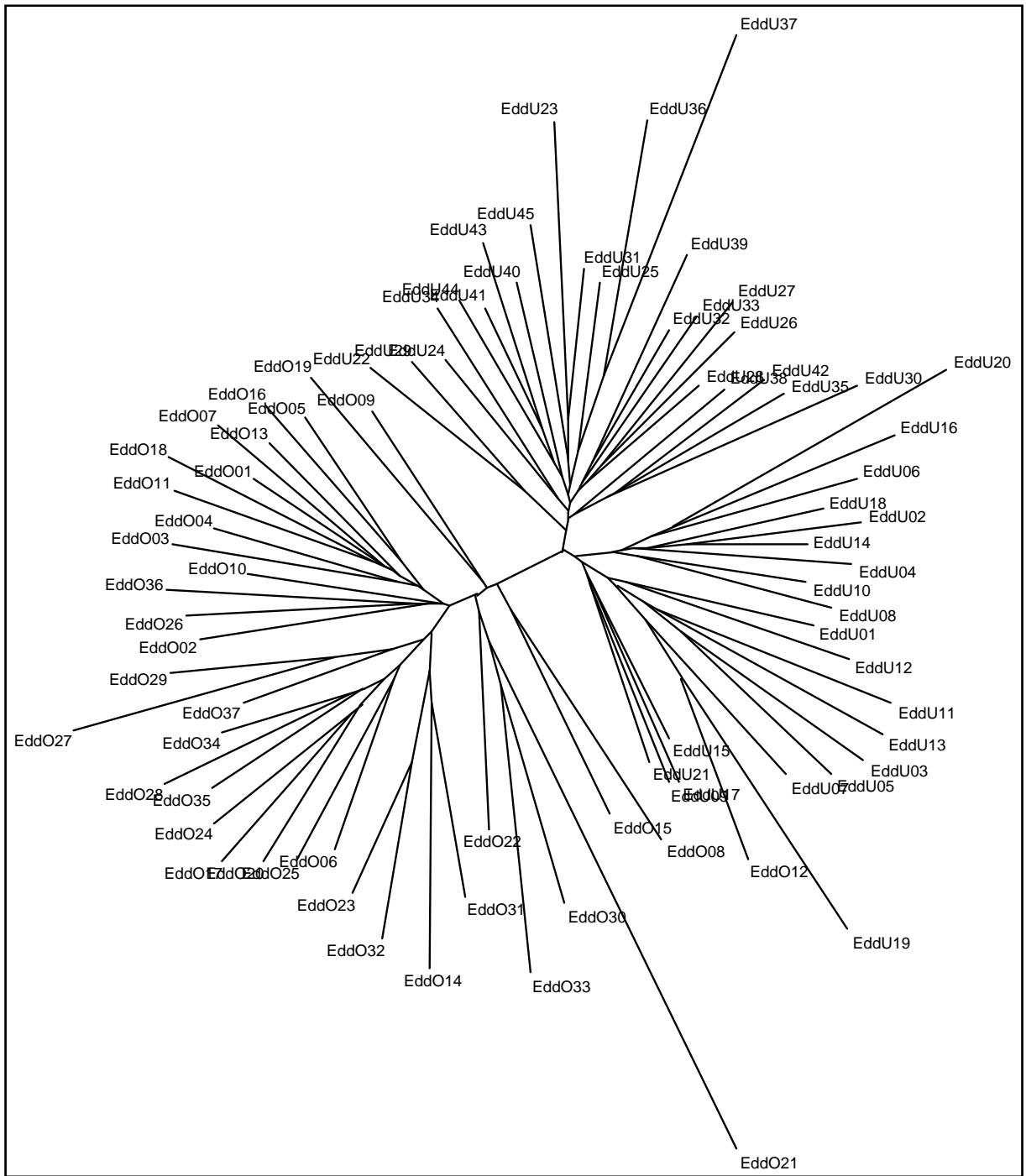


Abb. A-5: Phylogramm der Population Edd (*D. polymorpha*)

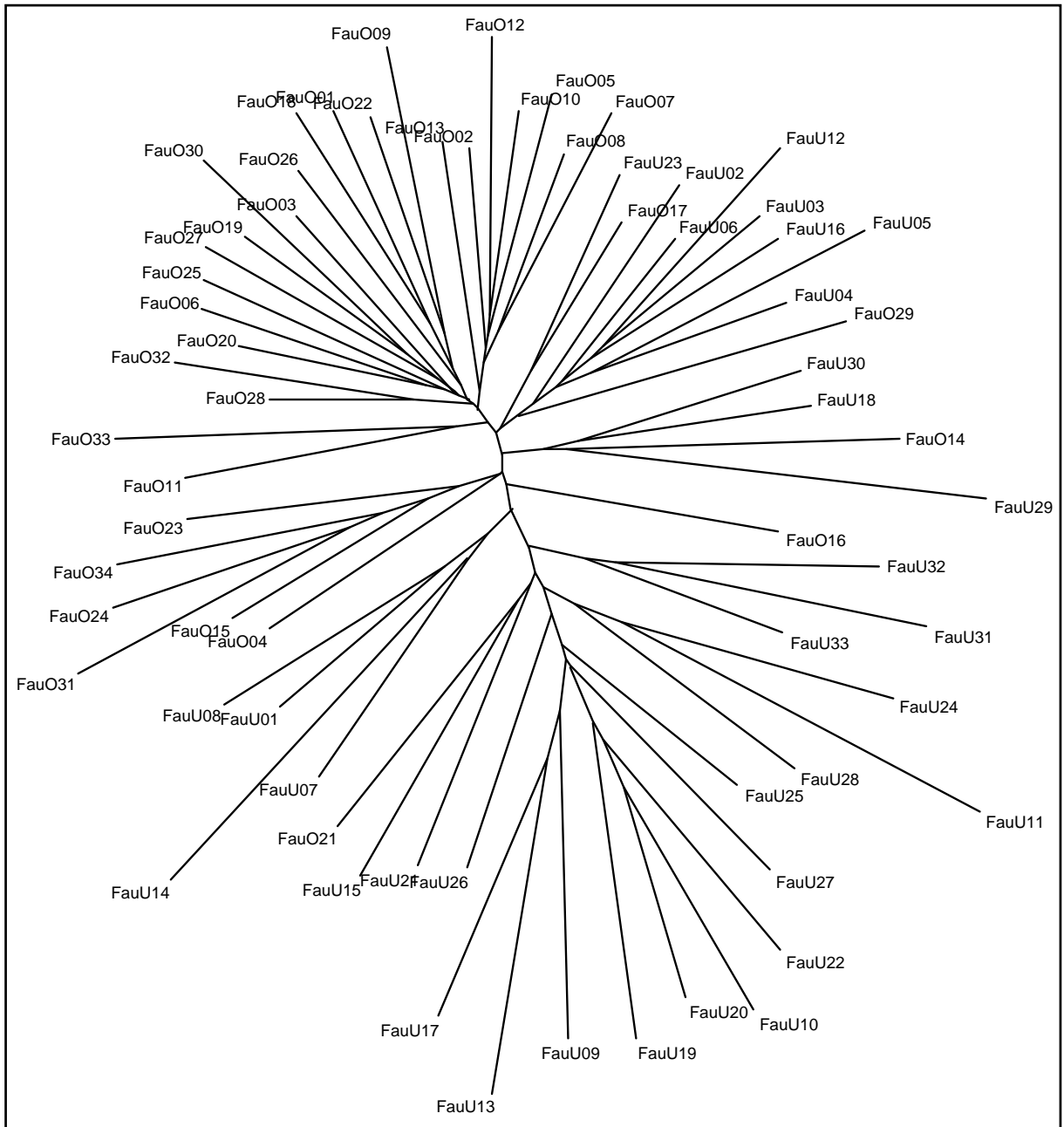


Abb. A-6: Phylogramm der Population Fau (*D. polymorpha*)

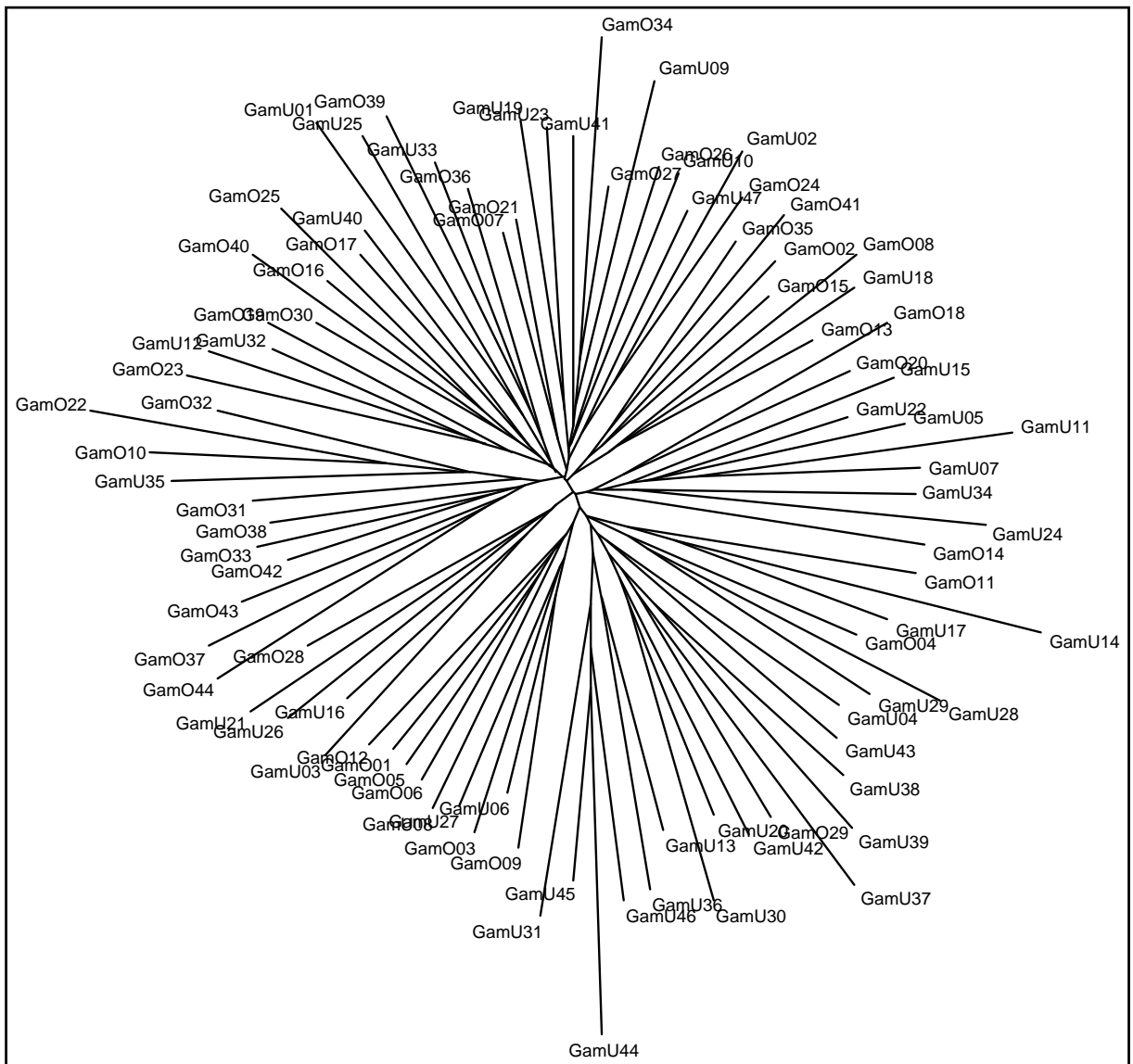


Abb. A-7: Phylogramm der Population Gam (*D. polymorpha*)

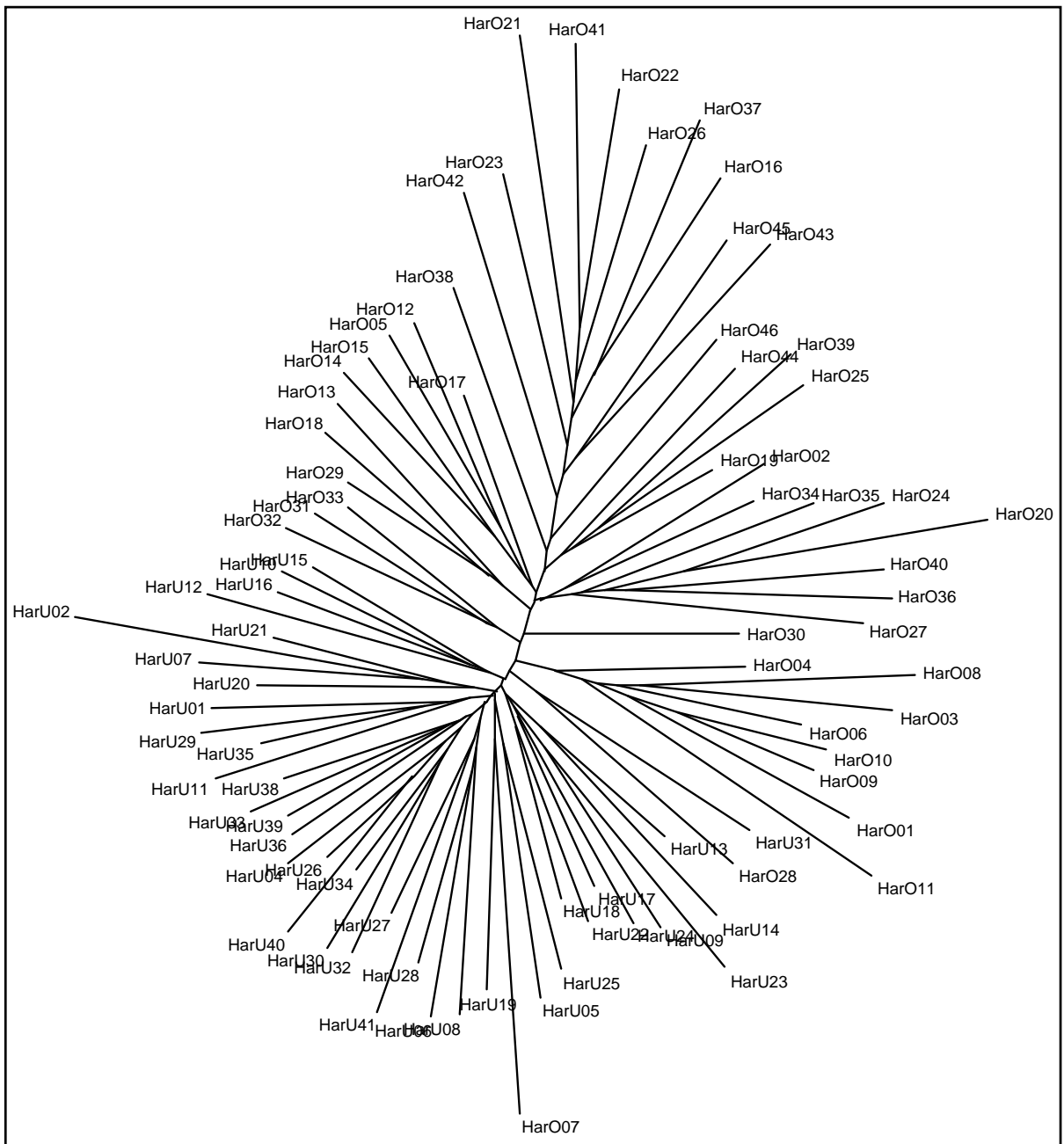


Abb. A-8: Phylogramm der Population Har (*D. polymorpha*)

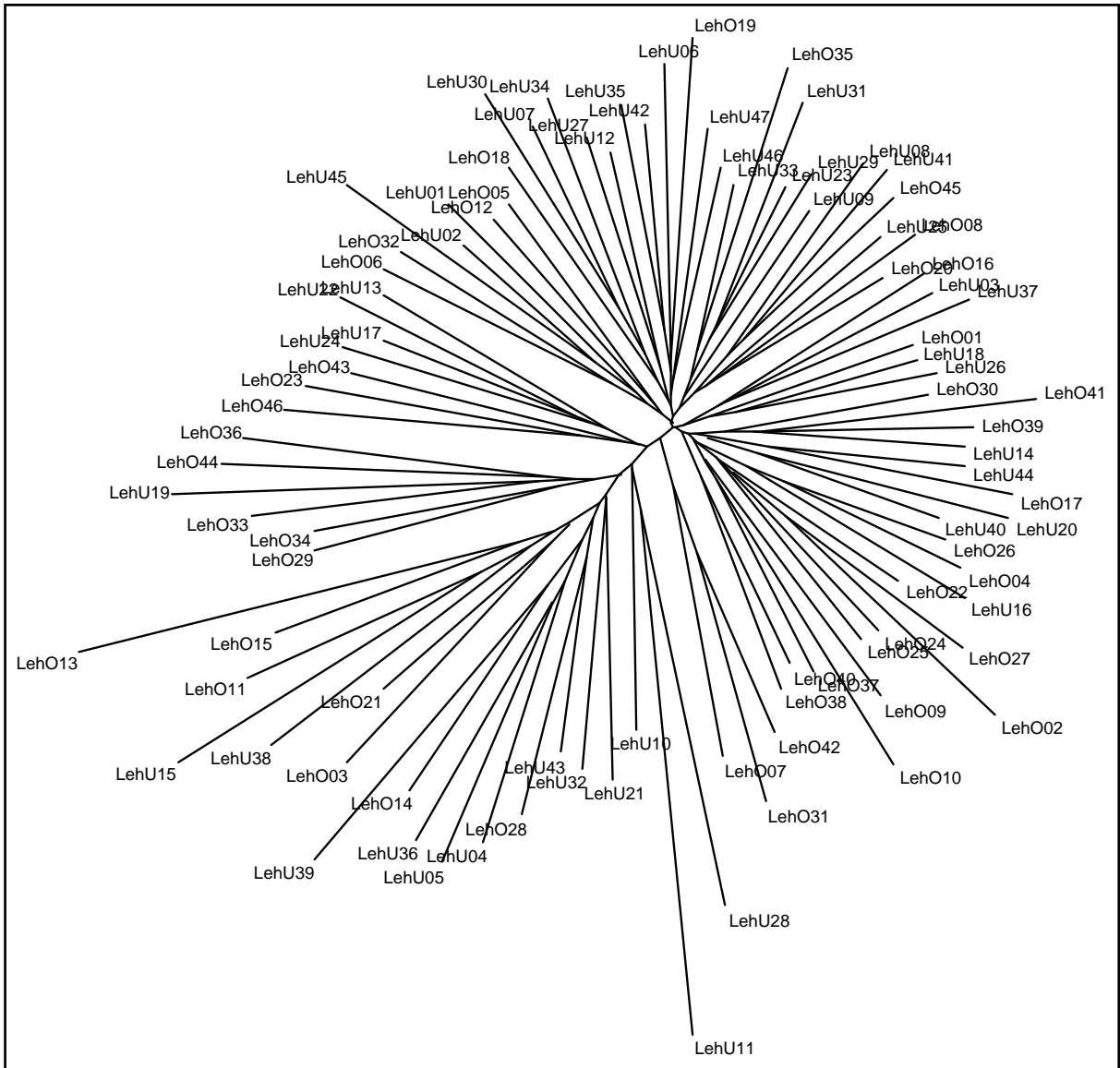


Abb. A-10: Phylogramm der Population Leh (*D. polymorpha*)

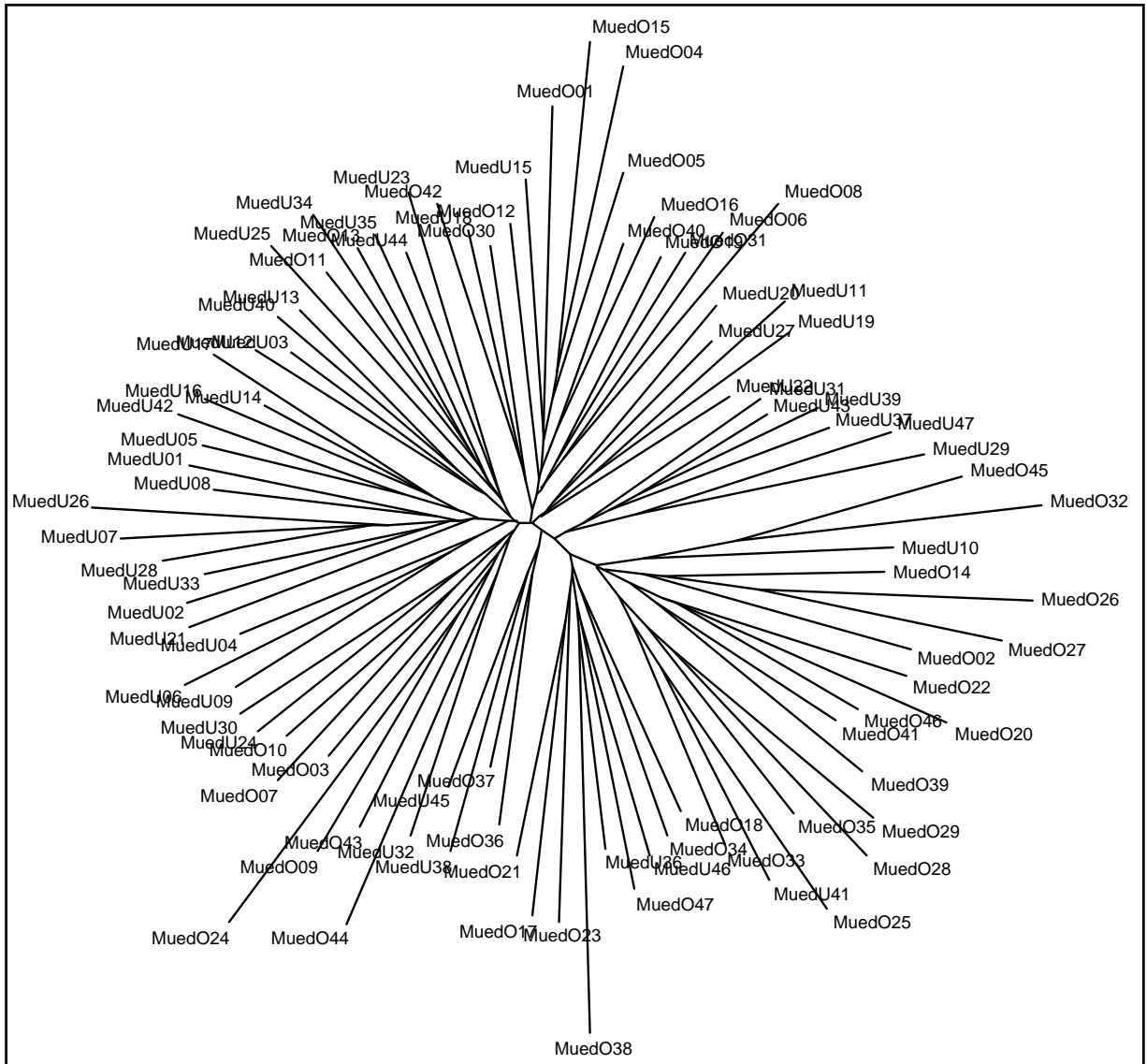


Abb. A-11: Phylogramm der Population Mud (*D. polymorpha*)

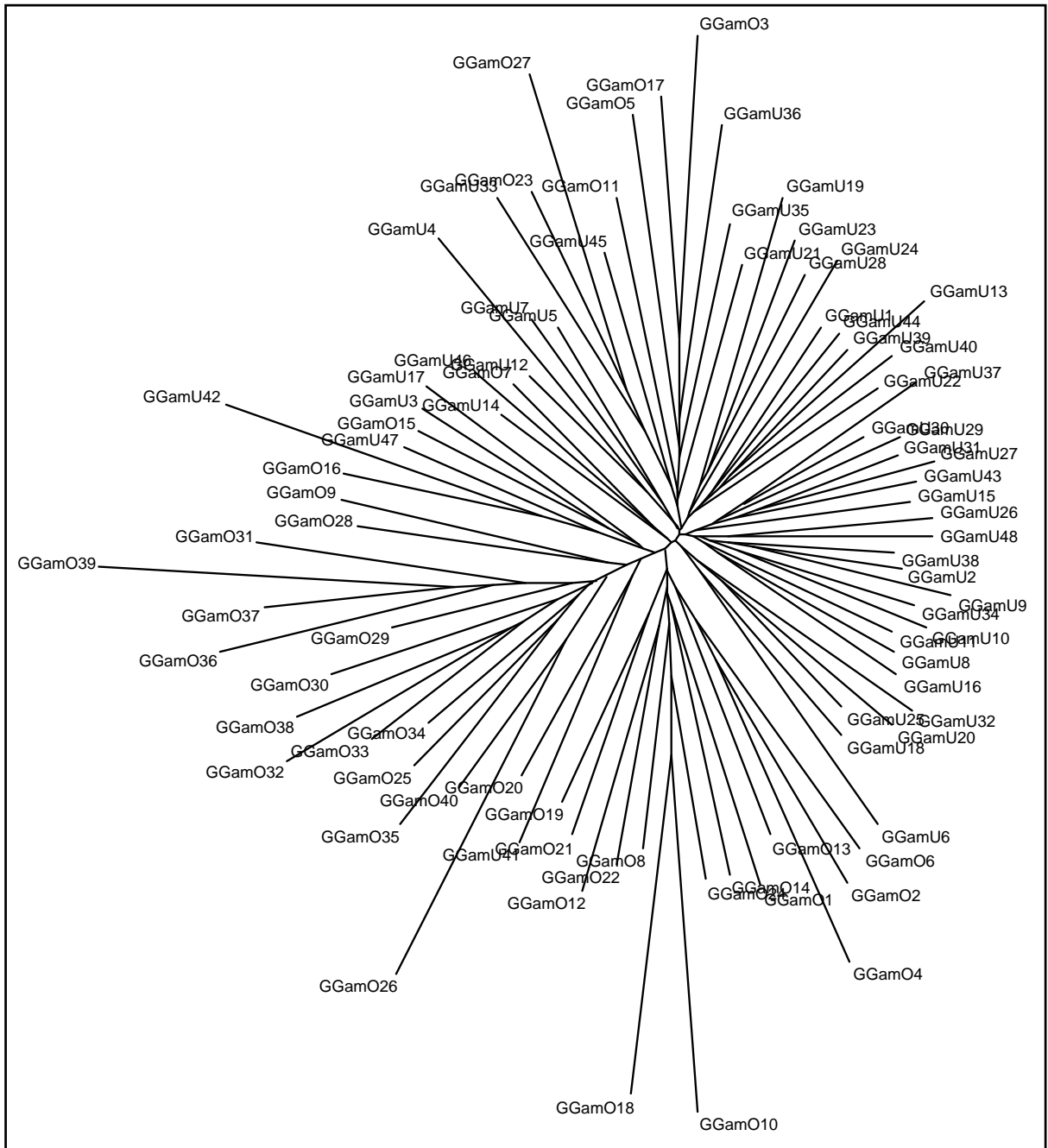


Abb. A-14: Phylogramm der Population GMud (*D. villosus*)

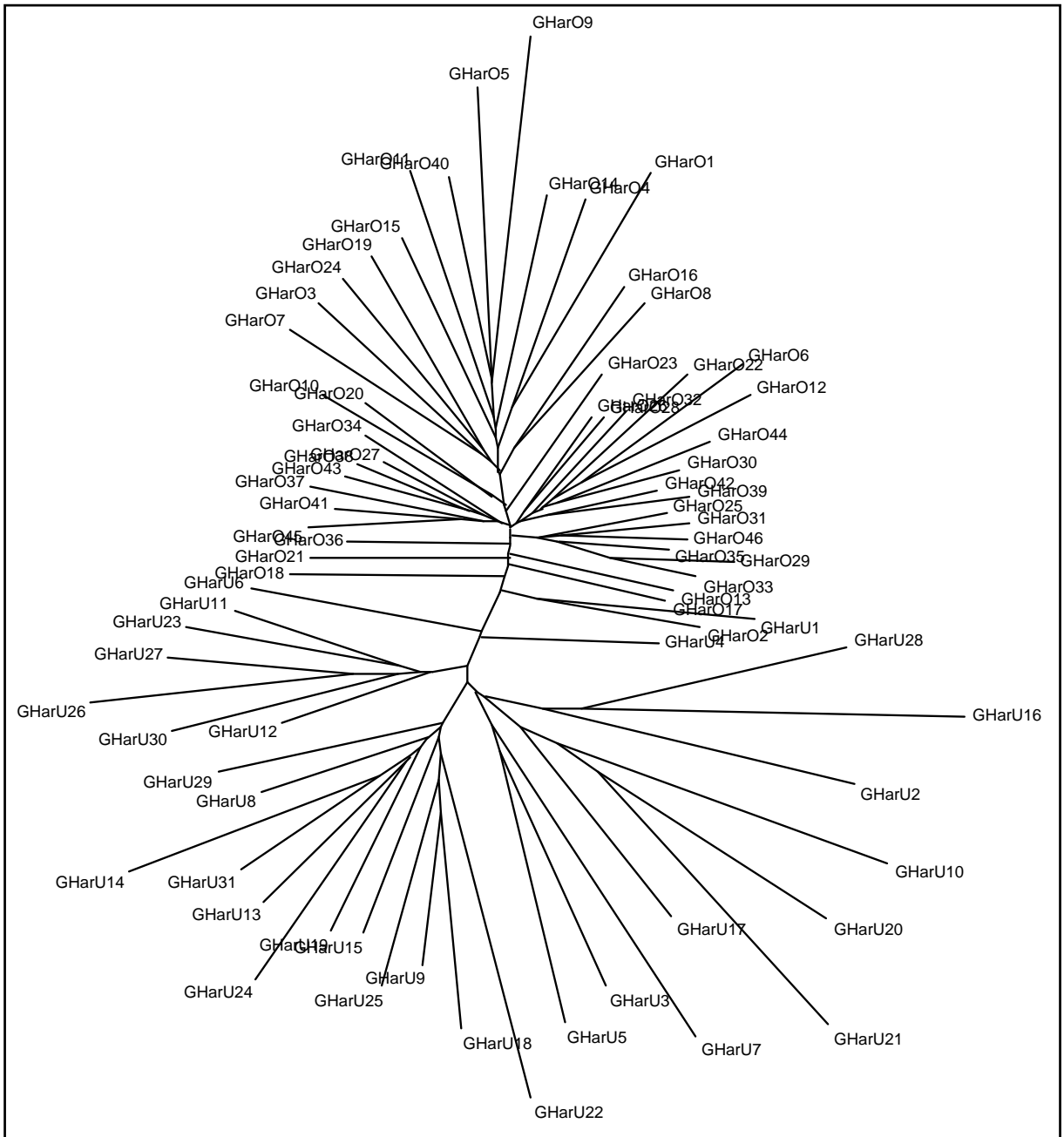


Abb. A-15: Phylogramm der Population GHar (*D. villosus*)

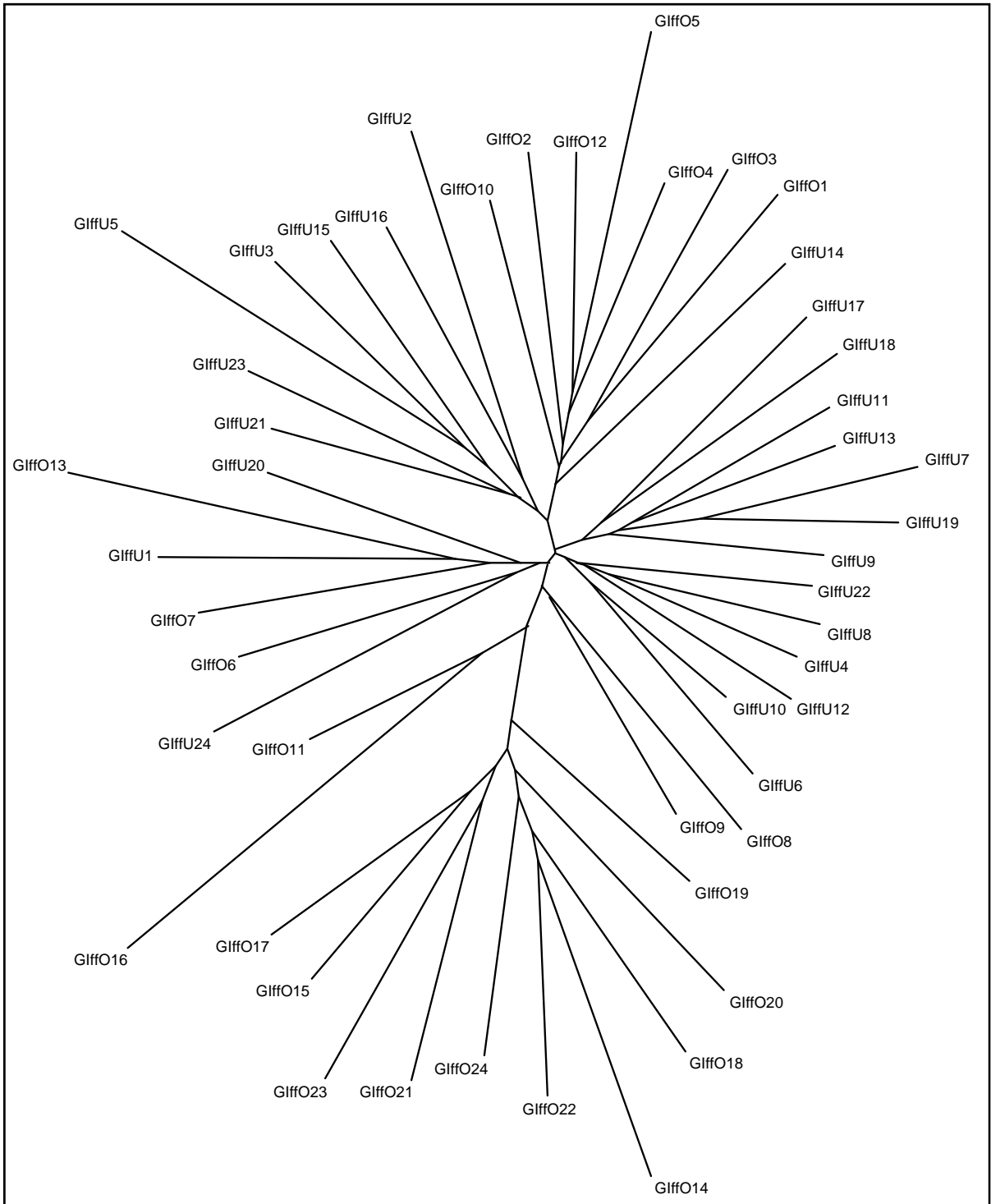


Abb. A-16: Phylogramm der Population Giff (*D. villosus*)

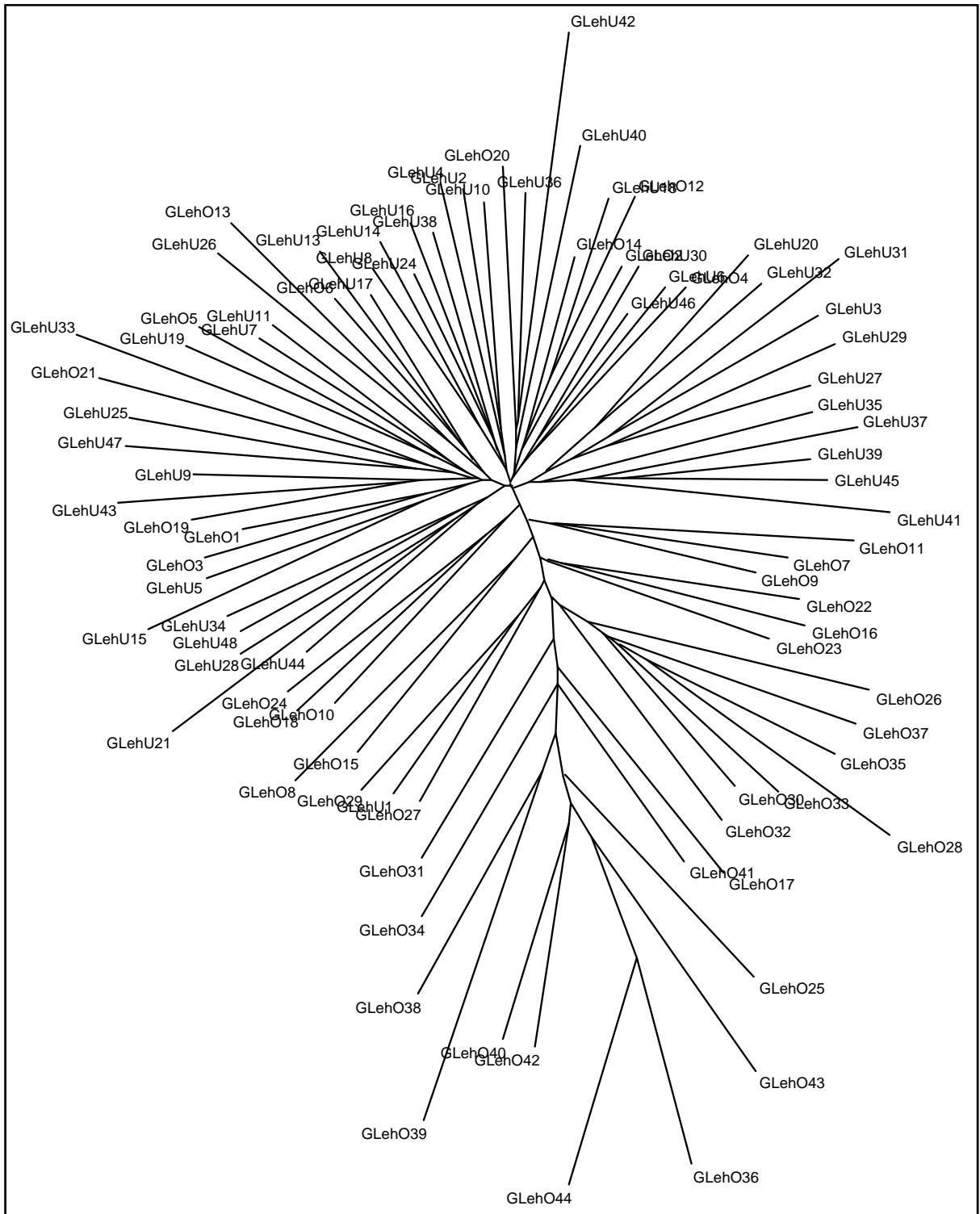


Abb. A-17: Phylogramm der Population GLeh (*D. villosus*)

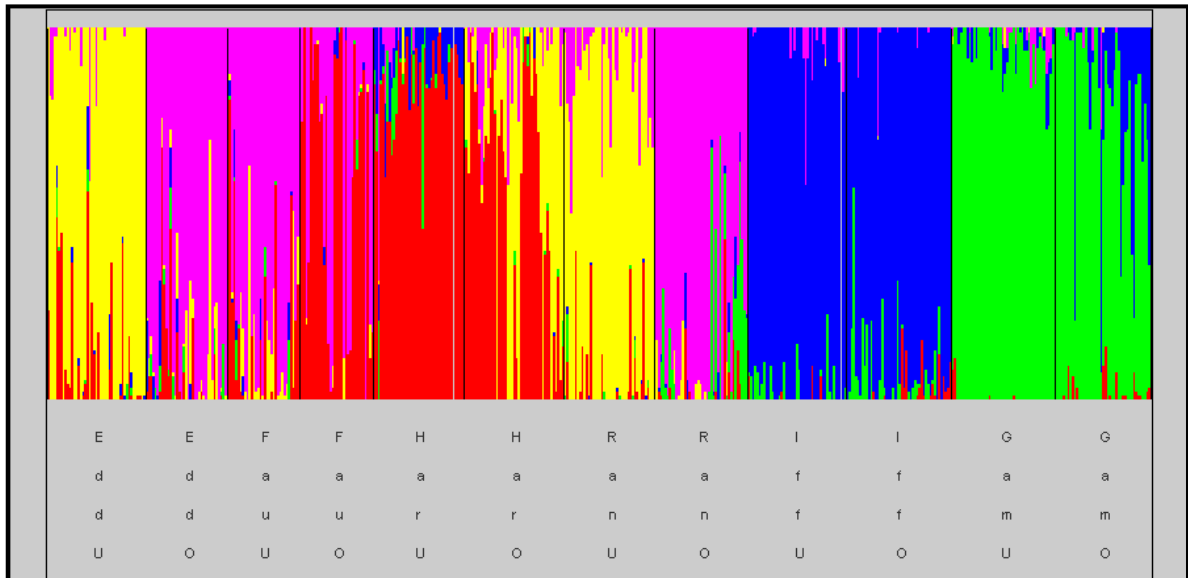


Abb. A-20: Admixture-Zuordnung Rhein- und Mainpopulationen von *D. polymorpha*

Abgebildet sind die untersuchten acht Subpopulationen des Mains sowie die Subpopulationen aus dem Rhein (IffU, IffO, GamU und GamO). Jedes Individuum wird durch einen ggf. mehrfarbigen senkrechten Strich repräsentiert. Die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zur jeweiligen Gruppe wird durch den Anteil der zur Gruppe gehörenden Farbe an diesem Strich dargestellt.

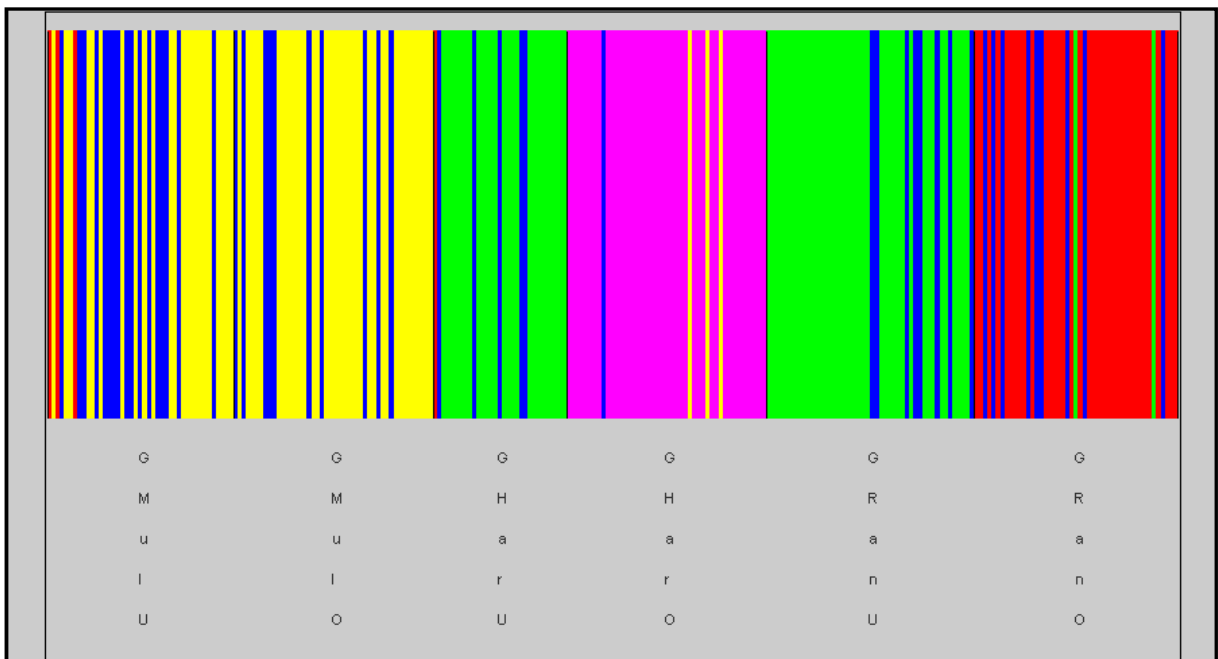


Abb. A-21: Individuen-Clustering Mainpopulationen von *D. villosus*

Abgebildet sind die untersuchten sechs Subpopulationen aus Mülheim (GMuU, GMuO), Harrbach (GHarU, GHarO) sowie Randersacker (GRanU, GRanO). Jedes Individuum wird durch einen senkrechten Strich in einer Farbe dargestellt, die die Zugehörigkeit zu einer der von BAPS postulierten Gruppen wiedergibt. Das Programm ordnet die Individuen der Subpopulationen jeweils einer Gruppe zu (farbig dargestellt durch rot, blau, gelb, grün, lila).

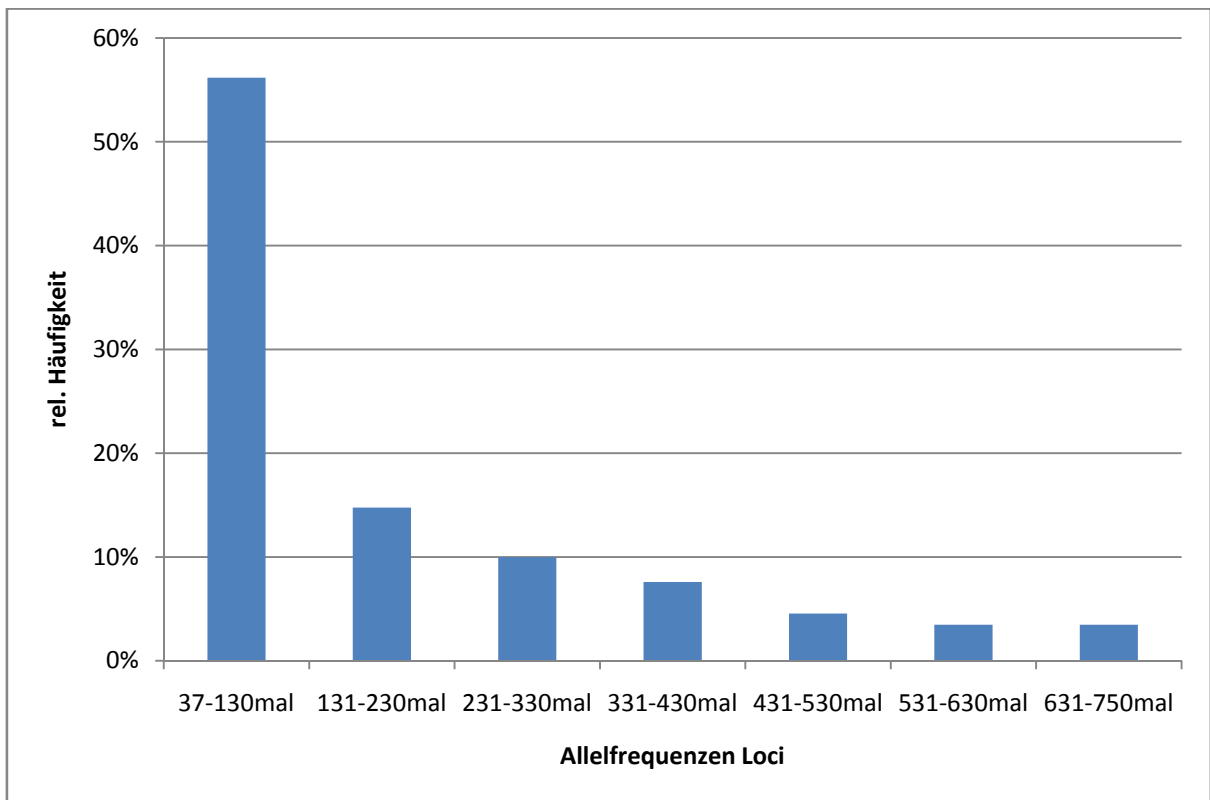


Abb.A-22: Häufigkeitsklassen Loci von *D. villosus*.

Aufgetragen sind die Allelfrequenzen der einzelnen Loci in der gesamten Population (in Häufigkeits-Klassen zusammengefasst) über deren prozentualen Anteil an der Gesamtanzahl der Loci.

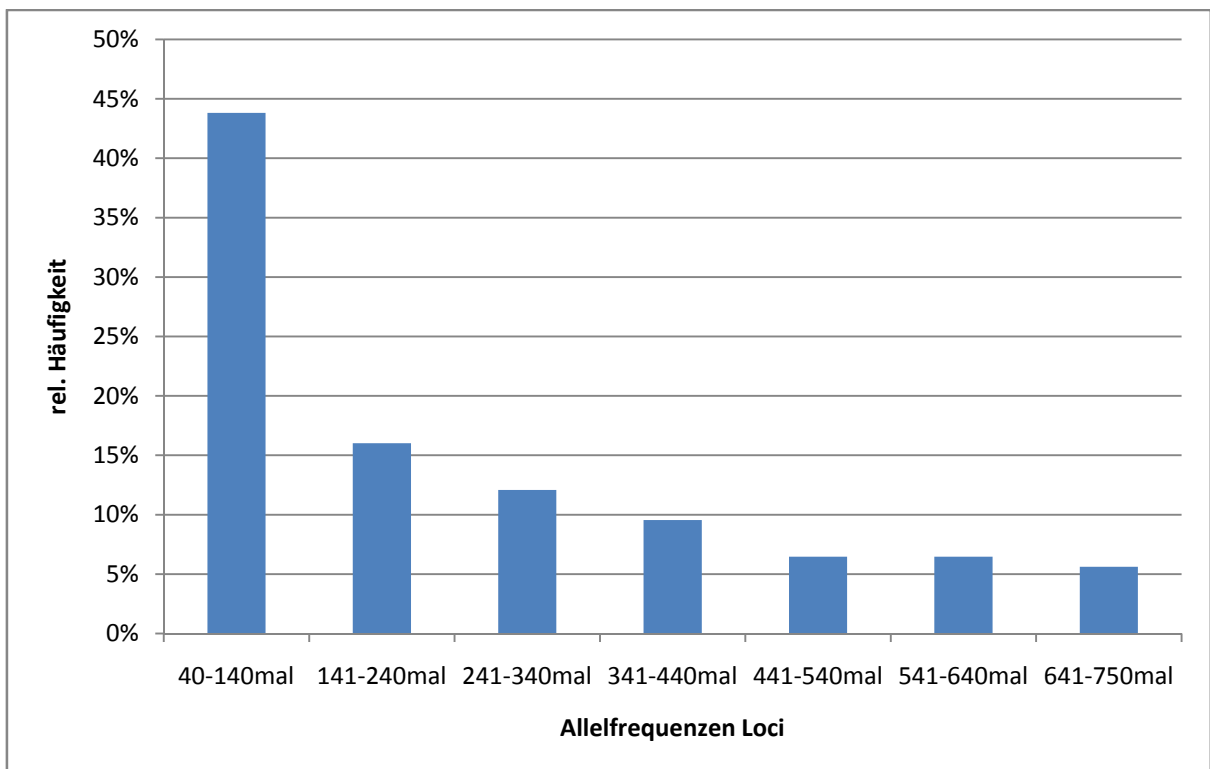


Abb.A-23: Häufigkeitsklassen Loci von *D. polymorpha*.

Aufgetragen sind die Allelfrequenzen der einzelnen Loci in der gesamten Population (in Häufigkeits-Klassen zusammengefasst) über deren prozentualen Anteil an der Gesamtanzahl der Loci.

Tab. A-7: ANOVA-Resultate für *D. polymorpha*

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	1.3708E-04	2	6.8538E-05	0.2683
error	3.8322E-03	15	2.5548E-04	
total	3.9693E-03	17		

The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.768

Main: Number of items= 8

0.124 0.129 0.131 0.144 0.150 0.166 0.168 0.172

Mean = 0.148

95% confidence interval for Mean: 0.1359 thru 0.1600

Standard Deviation = 1.922E-02

Hi = 0.172 Low = 0.124

Median = 0.147

Average Absolute Deviation from Median = 1.617E-02

Mosel: Number of items= 6

0.127 0.129 0.133 0.139 0.158 0.164

Mean = 0.142

95% confidence interval for Mean: 0.1278 thru 0.1556

Standard Deviation = 1.568E-02

Hi = 0.164 Low = 0.127

Median = 0.136

Average Absolute Deviation from Median = 1.207E-02

Rhein: Number of items= 4

0.142 0.145 0.146 0.147

Mean = 0.145

95% confidence interval for Mean: 0.1278 thru 0.1619

Standard Deviation = 2.407E-03

Hi = 0.147 Low = 0.142

Median = 0.145

Average Absolute Deviation from Median = 1.710E-03

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>

Tab. A-8: ANOVA-Resultate für *D. villosus*

The results of a ANOVA statistical test performed at 08:05 on 15-FEB-2008

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	7.3644E-03	2	3.6822E-03	13.58
error	3.5245E-03	13	2.7111E-04	
total	1.0889E-02	15		

The probability of this result, assuming the null hypothesis, is 0.001

Main: Number of items= 6
0.125 0.138 0.140 0.144 0.145 0.158

Mean = 0.142
95% confidence interval for Mean: 0.1271 thru 0.1561
Standard Deviation = 1.056E-02
Hi = 0.158 Low = 0.125
Median = 0.142
Average Absolute Deviation from Median = 7.283E-03

Mosel: Number of items= 6
5.930E-02 8.292E-02 8.695E-02 9.497E-02 0.111 0.124

Mean = 9.319E-02
95% confidence interval for Mean: 7.8663E-02 thru 0.1077
Standard Deviation = 2.260E-02
Hi = 0.124 Low = 5.930E-02
Median = 9.096E-02
Average Absolute Deviation from Median = 1.680E-02

Rhein.709E-02 9.772E-02 0.112 0.121

Mean = 0.107
95% confidence interval for Mean: 8.9184E-02 thru 0.1248
Standard Deviation = 1.173E-02
Hi = 0.121 Low = 9.709E-02
Median = 0.105
Average Absolute Deviation from Median = 9.565E-03

<http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Dreissena polymorpha</i> , versch. Phänotypen	9
Abb. 2: <i>Dikerogammarus villosus</i>	13
Abb. 3: Mittlerer Pegel Rhein bei Kehl in den Jahren 2003-2007	15
Abb. 4: Mittlerer Pegel Mosel bei Cochem in den Jahren 2001-2007	16
Abb. 5: Mittlerer Pegel Main bei Würzburg in den Jahren 2001-2007.....	16
Abb. 6: Entnahmestellen im Untersuchungsgebiet.....	18
Abb. 7: Staustufe Lehmen/Mosel	18
Abb. 8: Staustufe Randersacker/Main	19
Abb. 9: Staustufe Iffezheim/Rhein	19
Abb. 10: Entnahmestelle oberhalb einer Staustufe	21
Abb. 11: Entnahmestelle unterhalb einer Staustufe	21
Abb. 12: <i>Dreissena polymorpha</i> , geöffnet. Aus: NAPLEA <i>et al.</i> 1993, veränd.....	34
Abb. 13: Phylogramm <i>D. polymorpha</i> Population Fau aus PAUP	34
Abb. 14: Phylogramm <i>D. polymorpha</i> Population Brf aus PAUP	35
Abb. 15: Phylogramm <i>D. polymorpha</i> Population Edd aus PAUP	36
Abb.16: Gene Diversity H_j für jede Subpopulation von <i>D. polymorpha</i>	39
Abb.17: Gene Diversity H_j für jede Subpopulation von <i>D. villosus</i>	39
Abb.18: Logarithmus des Quotienten der Werte der gene diversity H_j Oberhalb / H_j Unterhalb	40
Abb.19: Phenogramm (UPGMA) <i>D. villosus</i> (l.) und <i>D. polymorpha</i> (r.).....	44
Abb.20: Individuen-clustering Rheinpopulationen von <i>D. polymorpha</i>	46
Abb.21: Admixture-Zuordnung Rheinpopulationen von <i>D. polymorpha</i>	46
Abb.22: Individuen-Clustering Moselpopulationen von <i>D. polymorpha</i>	47
Abb.23: Admixture-Zuordnung Moselpopulationen von <i>D. polymorpha</i>	48
Abb.24: Admixture-Zuordnung Mainpopulationen von <i>D. polymorpha</i>	49
Abb.25: Admixture-Zuordnung Rheinpopulationen von <i>D. villosus</i>	50
Abb.26: Admixture-Zuordnung Moselpopulationen von <i>D. villosus</i>	50
Abb.27: Admixture-Zuordnung Mainpopulationen von <i>D. villosus</i>	51
Abb.28: Phenogramm <i>D. polymorpha</i> (UPGMA)	53
Abb.29: Phenogramm <i>D. polymorpha</i> (Fitch-Margoliash)	54
Abb.30: Admixture-Zuordnung Mosel-und Rheinpopulationen von <i>D. villosus</i>	55
Abb.31: Phenogramm <i>D. villosus</i> (UPGMA).....	56
Abb.32: Phenogramm <i>D. villosus</i> (Fitch-Margoliash)	57

Abb. A-1: Genetic Diversity (Hw) innerhalb der zusammengefassten Populationen von <i>D. polymorpha</i>	106
Abb.A-2: Genetic Diversity (Hw) innerhalb der zusammengefassten Populationen von <i>D. villosus</i>	106
Abb. A-3: Phylogramm der Population Ran (<i>D. polymorpha</i>)	107
Abb. A-4: Phylogramm der Population Brf (<i>D. polymorpha</i>).....	108
Abb. A-5: Phylogramm der Population Edd (<i>D. polymorpha</i>)	109
Abb. A-6: Phylogramm der Population Fau (<i>D. polymorpha</i>)	110
Abb. A-7: Phylogramm der Population Gam (<i>D. polymorpha</i>)	111
Abb. A-8: Phylogramm der Population Har (<i>D. polymorpha</i>)	112
Abb. A-9: Phylogramm der Population Iff (<i>D. polymorpha</i>)	113
Abb. A-10: Phylogramm der Population Leh (<i>D. polymorpha</i>).....	114
Abb. A-11: Phylogramm der Population Mud (<i>D. polymorpha</i>)	115
Abb. A-12: Phylogramm der Population GMud (<i>D. villosus</i>).....	116
Abb. A-13: Phylogramm der Population GBrf (<i>D. villosus</i>).....	117
Abb. A-14: Phylogramm der Population GMud (<i>D. villosus</i>).....	118
Abb. A-15: Phylogramm der Population GHar (<i>D. villosus</i>)	119
Abb. A-16: Phylogramm der Population Giff (<i>D. villosus</i>)	120
Abb. A-17: Phylogramm der Population GLeh (<i>D. villosus</i>)	121
Abb. A-18: Phylogramm der Population GMul (<i>D. villosus</i>)	122
Abb. A-19: Phylogramm der Population GRan (<i>D. villosus</i>).....	123
Abb. A-20: Admixture-Zuordnung Rhein- und Mainpopulationen von <i>D. polymorpha</i>	124
Abb. A-21: Individuen-Clustering Mainpopulationen von <i>D. villosus</i>	124
Abb.A-22: Häufigkeitsklassen Loci von <i>D. villosus</i>	125
Abb.A-23: Häufigkeitsklassen Loci von <i>D. polymorpha</i>	125