

**Branchiopoda und Astacida (Arthropoda, Crustacea):  
Ihre Gene und ihre Evolution**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer.nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Dipl.-Biol. Anke Braband  
geb. 15. 01. 1963 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gerhard Scholtz  
2. Prof. Dr. Arndt von Haeseler  
3. Prof. Dr. Martin Schlegel

eingereicht: 27. 10. 2003

Datum der Promotion: 12. 03. 2004

Molekulare Systematik, Branchiopoda, Astacida, 12S rRNA, EF-1 alpha, cox 1, Introns, ribosomale Sekundärstruktur

Molecular systematics, Branchiopoda; Astacida, 12S rRNA, EF-1 alpha, cox 1, introns, secondary structure of 12S rRNA

## **Abstract**

The phylogenetic relationships of the higher arthropod taxa are still of special interest. Especially the interrelationships of the different Crustacea taxa have long been debated. The focus of this investigation is to make a contribution to the phylogenies of two Crustacea taxa using molecular markers: The Phyllopoda which belong together with the Anostraca to the branchiopods, and of the Astacoidea, one of the two higher crayfish taxa (Astacida).

The following molecular markers were used: 1) Phyllopoda: the 3rd domain of the mitochondrial encoded 12S rRNA taking into account informations of the secondary structure, the nuclear encoded proteingene EF-1 alpha and the positions of introns found in the coding region of EF-1 alpha. 2) Astacoidea: the 3<sup>rd</sup> domain of the 12S rRNA and the mitochondrial encoded proteingene cox1. The choice of the mentioned markers in combination with different computercladistical methods allowed to give a satisfying, and in the case of the Astacoidea a more surprising answer to most addressed phylogenetic questions. The gained hypotheses are then discussed in detail in the light of morphological features and hypotheses.

## **Zusammenfassung**

Innerhalb der Arthropodensystematik sind die phylogenetischen Beziehungen der höheren Crustaceataxa seit langem von besonderen Interesse. Ziel dieser Arbeit ist die Rekonstruktion der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse mit Hilfe molekularer Datensätze für die Phyllopoda, die zusammen mit den Anostraca die Branchiopoda bilden und der Astacoidea (Astacida), einer Teilgruppe der Flusskrebse.

Folgende molekulare Marker kamen zum Einsatz: 1) Für die Phyllopoda: Die 3. Domäne der mitochondrial codierten 12S rRNA, unter Berücksichtigung von Sekundärstrukturinformationen, das nukleare Gen EF-1 alpha und die Positionen von Introns im Gen EF-1 alpha. 2) Für die Astacoidea: Die 3. Domäne der 12S rRNA und das mitochondrial codierte Gen cox1. Durch die Wahl der molekularen Marker, die mit unterschiedlichen computerkladistischen Methoden ausgewertet wurden, konnten für die meisten Fragen eine eindeutige und im Fall der Astacoidea überraschende phylogenetische Aussage getroffen werden. Die gewonnenen Hypothesen werden ausführlich im Licht morphologischer Hypothesen diskutiert.

**To make progress in understanding all this, we probably need to begin with simplified (oversimplified?) models and ignore the critics' tirade that the real world is more complex. The real world is always more complex, which has the advantage that we shan't run out of work.**

John Ball (1984)

# 1 Einleitung

Seit Charles Darwin ist es ein Traum eines jeden Evolutionsbiologen, die Entstehungsgeschichte aller lebenden Organismen zu rekonstruieren und das Ergebnis in Form eines Stammbaumes (Haeckel, 1866) auszudrücken. Ein Ansatzpunkt zur Verwirklichung dieses Traums ist das Studium des fossilen Berichtes, um eine möglichst lückenlose Genealogie der Organismen mit allen phänotypischen Übergangsformen rekonstruieren zu können. Dies gelingt für Teilbereiche des Baums, so genügend fossilisierbare Strukturen vorhanden waren (wie beispielsweise bei Cormophyten, Vertebraten, Foraminiferen oder Cephalopoden), in durchaus vielversprechender Weise, versagt jedoch zwangsläufig bei Gruppen mit kaum oder nicht fossilisierbarer Morphologie. Da dies bei der Mehrzahl der Großtaxa der Fall ist, wurde schon frühzeitig auf vergleichende Methoden an rezenten Organismen zurückgegriffen. Insbesondere morphologische Methoden haben wesentlich zur Klärung einiger Teilfragen des ``tree of life`` beigetragen. Die Veränderungen morphologischer Merkmalskomplexe sind jedoch derartig komplex, dass es bis zum heutigen Tag nicht gelingt, ein im Detail klares Bild der Beziehungen der Organismen zueinander zu zeichnen. Viele Fragen der Beziehungen der Großtaxa zueinander sind nach wie vor offen und bedürfen der Bearbeitung mit innovativen Methoden.

Eine solche Vorgehensweise schlugen Zuckerkandl und Pauling (1965) vor, indem sie molekulare DNA- Sequenzen als Merkmale zur Klärung phylogenetischer Fragestellungen empfahlen. Die Erfindungen der enzymatischen DNA Sequenzierung durch Strangabbruch (Sanger et al., 1977) und der PCR (Mullis et al., 1986) liefern dazu die methodischen Werkzeuge, mit deren Hilfe es seitdem möglich wurde, eine Vielzahl von „DNA Phylogenien“ zu erstellen und in die allgemeine Diskussion einzubringen.

Die vergleichende Analyse von DNA Sequenzen hat einige Vorteile gegenüber der vergleichenden Morphologie. Die elementarste Gemeinsamkeit aller rezenten Organismen ist wohl unbestritten ihre Nutzung der DNA als Erbinformationsträger über alle Generationen hinweg. Weiterhin unbestritten ist, trotz der Beobachtung geringfügiger, seltener Abweichungen, die Universalität des genetischen Codes. Die monophyletische Entstehung der Erbinformationsweitergabe kann deshalb nicht mehr ernsthaft diskutiert werden. Für die phylogenetische Forschung ergibt sich daher die prinzipielle Möglichkeit, DNA-Sequenzen aller rezenten Organismen zu homologisieren und somit einen schier unerschöpflichen Pool an Merkmalen zu gewinnen. Dies setzt voraus, dass geeignete, problemlos homologisierbare (vergleichbare) Sequenzen gewählt werden, die eine gewisse Variabilität aufweisen (abhängig von dem zu untersuchenden taxonomischen Level). Diese Variabilität ist das Ergebnis von Mutationen der DNA, die einem mehr oder weniger gleichmäßigen Muster folgen. So ist es möglich, Evolutionsmodelle zu formulieren, die eingesetzt werden können, um auch entfernte Verwandtschaftsbeziehungen zu erforschen.

Aus genannten Gründen wird daher von der Molekularsystematik i.a. die Aufklärung vieler bislang fraglicher Beziehungen innerhalb des ``tree of life`` erwartet. Daraus sollte ein besseres Verständnis der zu beobachtenden phänotypischen Komplexität und deren Bewertung ermöglicht werden.

## 1.1 Die phylogenetische Systematik im Blickpunkt molekularer Daten

Die von Willi Hennig (1966) begründete Methode des „Cladismus“ gilt als methodische Basis der phylogenetischen Systematik. Ziel der phylogenetischen Systematik ist es, einen natürlichen Stammbaum zu rekonstruieren. Wir sind nicht Zeugen eines seit Hunderten von Millionen Jahren andauernden Prozesses. Jede Bemühung einer Rekonstruktion von Verwandtschaftsverhältnissen hat daher hypothetischen Charakter und muss der Falsifikation offen gegenüberstehen.

Durch die von W. Hennig eingeführten neuen Begriffe, wie Synapomorphie und Synplesiomorphie, gelang es der phylogenetischen Forschung, qualitativ zwischen Merkmalen und der Evolution derselben zu unterscheiden: Hierbei werden zunächst ursprüngliche (plesiomorphe) Merkmale von abgeleiteten (apomorphen) Merkmalen unterschieden. Taxa, die gegenüber ihren putativen Außengruppen abgeleitete Merkmalszustände teilen (Synapomorphien), werden zu monophyletischen Gruppen zusammengefasst, d.h. die Mitglieder dieser Gruppe stammen von einer nur ihnen gemeinsamen Stammart ab.

Aufgabe der phylogenetischen Forschung ist es nun, durch den Vergleich homologisierbarer Merkmale Abstammungsgemeinschaften (Monophyla) zu entdecken oder aber vermeintliche Monophyla als para- oder polyphyletisch zu entlarven. Die erste Quelle zur Rekonstruktion der Abstammungsgeschichte bieten paläontologische Funde, die, vorausgesetzt die geologische Datierung stimmt, einen chronologischen und typologischen Rahmen vorgeben. Verbunden mit Vergleichen homologer morphologischer Merkmale rezenter Arten versucht die phylogenetische Forschung Ähnlichkeitsreihen abzuleiten, die Hinweise auf die tatsächliche Entwicklungschronologie geben.

Die qualitative Unterscheidung eines Merkmals bezüglich seines plesiomorphen oder apomorphen Ursprungs geschieht hierbei über die Festlegung der Leserichtung, ist allerdings in der Praxis häufig nicht einfach, da sich viele Merkmale konvergent entwickelt haben. Mehrfach parallel evolvierte Merkmale können zu falsch interpretierten Verwandtschaftsverhältnissen führen. Ein zweites Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass sich der Forschung nur ein höchst unvollständiges Bild der Evolution zeigt: Fossilfunde bieten nur schlaglichtartig Einblick in die längst ausgestorbene Organismenwelt. Die Systematik rezenter Organismen muß Evolutionsszenarien hypothetisieren, die Millionen von Jahren andauerten, um Schwestergruppenverhältnisse zu erklären. Dies stellt die Wissenschaft vor ein Dilemma. Prinzipiell kann man mit etwas Phantasie fast immer eine mögliche Folge von evolutiven Veränderungen eines beobachteten Merkmals von der putativen Stammart bis zum rezenten Organismus beschreiben. Doch gäbe es hier viele verschiedene Wege für verschiedene Hypothesen. Um der Gefahr eines solchen phantastischen Chaos zu entgehen, beruft sich die empirisch arbeitende phylogenetische Forschung traditionell auf das Ockham'sche Prinzip (Parsimonie) - das Prinzip der größtmöglich anzunehmenden Sparsamkeit: Es ist der Stammbaum anzunehmen, der die geringste Schrittzahl benötigt, um beobachtete Veränderungen zu erklären. Mit anderen Worten, die Anzahl der *ad hoc* Hypothesen bezüglich einer Merkmalsverteilung zwischen verschiedenen Taxa muß minimiert werden (Rieppel, 1999). Diese Vorgehensweise setzt natürlich die

Annahme voraus, dass die Veränderung oder die Neuerwerbung eines Merkmals im Laufe der Evolution einen für uns logischen und damit direkten Weg bis hin zum Beobachtbaren gelaufen ist. Ob dies in jedem Fall bzw. bei jedem zu analysierenden Merkmal auch zutreffend ist, ist mehr als fraglich und entzieht sich dem Betrachter.

Auch die phylogenetische Analyse molekularer Datensätze lässt sich methodisch in das Ockham'schen Prinzip (Parsimonie) einbetten, d.h. es ist der Stammbaum anzunehmen, der die wenigsten Substitutionen benötigt, um einen Datensatz zu erklären. Neben der Parsimonie Methode zur Berechnung diskreter Datensätze (Camin & Sokal, 1965) kommen in zunehmendem Maß auch statistische Algorithmen zum Einsatz. Verfahren, wie Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981) oder auch Distanzmethoden, wie Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987; Studier & Keppler, 1988), beruhen jeweils auf einem *a priori* anzunehmenden Evolutionsmodell. Die Modelle leiten sich aus zahlreichen, in den unterschiedlichsten Datensätzen beobachteten, Substitutionseignissen von Nukleotiden oder Aminosäuren ab. Zur Berechnung der Datensätze werden zahlreiche Computerprogramme angeboten, in denen die o.g. Methoden und Modelle implementiert sind.

Parsimonie Analysen, die im Gegensatz zu beispielsweise Maximum Likelihood Analysen vorgeben, modellunabhängig zu arbeiten, entsprechen im wesentlichen der Tradition des vom Wissenschaftsphilosophen Karl Popper (1963) begründeten Falsifikationismus und damit den Forderungen, die Anzahl der *ad hoc* Hypothesen zu minimieren, die nötig sind, um eine neue Theorie aufzustellen. Aus der Tradition der phylogenetischen Systematik heraus und damit verbunden dem Versuch, „...die vergleichende Biologie in die Tradition des Falsifikationismus einzubetten...“ (Rieppel, 1999), wird die Anwendung von Parsimonie Verfahren gegenüber der Anwendung statistischer Verfahren kontrovers diskutiert (Kluge, 2001; De Queiroz & Poe, 2003).

Der phylogenetisch arbeitende Molekularbiologe sieht sich nun mit der Tatsache konfrontiert, dass es die unterschiedlichsten Qualitäten von Mutationen in der DNA geben kann (z.B. synonyme, nicht-synonyme Mutationen, Rückmutationen, sich gegenseitig kompensierende Mutationen, Covarianzen). Mutationen auf Nukleotidebene treten bei jeder Zellteilung auf. Im Fall von Punktmutationen können, abgesehen von Insertions- bzw. Deletionseignissen, nur vier Merkmalszustände erreicht werden. Das heißt, bei jeder Replikationsrunde könnte ein anderer Merkmalszustand realisiert werden. Es gibt daher keinen vernünftigen Grund anzunehmen, dass die DNA auf dem kürzesten, für uns logischen Weg, evolviert ist. Daraus ergibt sich ferner, dass es aufgrund des nahezu neutralen Selektionsdruckes auf ein Nukleotid (im Vergleich zu beispielsweise einer komplexen morphologischen Struktur) kaum möglich ist, objektiv zwischen Konvergenzen, Apomorphien oder Plesiomorphien zu unterscheiden. Sogenannte Likelihoodisten empfehlen daher, DNA-Evolution als stochastischen Prozess zu begreifen. Das Wissen über qualitativ unterschiedliche Mutationseignisse (z.B. Transition : Transversion) macht es möglich, Modelle über DNA-Evolutionen zu erstellen und *a priori* in die statistische Analyse mit einfließen zu lassen, ein Vorgehen, das im Sinne des Musterkladismus nicht zulässig ist. Dennoch führen die Berechnungen mit Parsimonie- und anderen, modellabhängigen Verfahren häufig zu kongruenten Ergebnissen, was die Diskussion über die verschiedenen Verfahren teilweise sehr theoretisch erscheinen lässt (Goldman, 1990; Sidall & Kluge, 1997).

Ausgangspunkt für eine phylogenetische Analyse molekularer Datensätze ist das Alignment. Dem Erstellen eines Alignments ist, insbesondere wenn es sich um ein nicht proteincodierendes Gen handelt, eine besondere Bedeutung beizumessen. Ribosomale RNA Gene sind in ihrer Länge bezüglich verschiedener Organismen ungleich, da sie keinen "reading frame" wie etwa proteincodierende Gene besitzen. Durch das Einfügen sogenannter "gaps" (Lücken) in die einzelnen Sequenzen erhält das gesamte Alignment eine einheitliche Länge. Die biologische Bedeutung solcher Insertionen oder Deletionen (Li, 1997) an einer spezifischen Position bleibt zunächst unklar, formuliert wird aber dennoch eine Homologiehypothese bezüglich der benachbarten sichtbaren Nukleotidpositionen. Das Einfügen von "gaps" bzw. die Verlängerung derselben wird dabei über zu wählende Parameter gesteuert ("gap costs, gap creation, gap elongation"). Hierbei kann es häufig zu wenig vertrauenswürdig alignten Sequenzbereichen kommen, d.h. die postulierten Positionshomologien sind ungewiss. Deshalb ist das Ergebnis der phylogenetischen Analyse in diesen Fällen stark abhängig von den gewählten Parametern im Alignmentverfahren. Zur Überwindung dieser Probleme werden im wesentlichen zwei Verfahren angewandt. Entweder werden Sequenzbereiche, die "gaps" aufweisen, vor der phylogenetischen Berechnung eliminiert (Swofford et al., 1996) oder es wird eine vergleichende Sekundärstrukturanalyse durchgeführt, in der die "stem"- und "loop"-Bereiche definiert werden (Kjer, 1995; Titus & Frost, 1996). Sofern "gaps" als Insertionen oder Deletionen betrachtet werden, d.h. als tatsächlich vorhandene Merkmale, können diese auch als fünftes Merkmal (neben den vier Nukleotiden) mit in die Analyse eingehen. Dieses Verfahren ist allerdings nur in Parsimonie Analysen möglich. Maximum Likelihood Analysen sehen diese Möglichkeit aufgrund der o.g. Unsicherheiten nicht vor.

## **1.2 Molekulare Daten zur Klärung phylogenetische Beziehungen innerhalb der Metazoa**

Die Güte der phylogenetischen Informationen, die sich aus einem Sequenzvergleich ergeben, hängt maßgeblich von der Auswahl der molekularen Marker ab. Ein „universell“ anwendbares Gen sollte dabei prinzipiell die folgenden Anforderungen erfüllen (Woese, 1987):

- Das gewählte Gen muß in allen zu betrachtenden Organismen vorhanden sein und die Homologisierbarkeit gesichert.
- Die Änderungen an Sequenzpositionen sollten zufällig sein.
- Die Sequenzlänge sollte ausreichend sein, um genügend Information zu erhalten.

Bis heute wurden einige wenige Gene bzw. Genabschnitte auf ihre Anwendbarkeit für unterschiedliche systematische Fragestellungen verwendet und getestet. Hier kommt den ribosomalen Genen, insbesondere der nuklearen 18S rRNA, eine besondere Bedeutung zu. Die einfache Amplifizierbarkeit mit allseits bekannten universell einsetzbaren Primern führte in den letzten Jahren zu einer wahren „18S-Datenflut“ in den Genbanken. Obwohl die Probleme hinsichtlich des Auflösungsvermögens der 18S rRNA hinreichend publiziert sind (Wägele et al., 1999), führt die große Anzahl an 18S rRNA Daten seitdem zu immer neuen Stammbaumrekonstruktionen verschiedenster

Taxa mit z.T. sich widersprechenden Ergebnissen. Dennoch verzeichnet die Datenbank in den letzten Jahren zahlreiche Einträge verschiedenster Taxa und anderer, speziell proteincodierender Gene. Dies sollte es in naher Zukunft ermöglichen, ein großes Spektrum an relevanten Genen (z.B. "housekeeping genes") innerhalb verschiedener taxonomischer Ebenen, bezüglich eines phylogenetischen Signals, zu überprüfen um daraus gewonnene Stammbaumhypothesen miteinander zu vergleichen.

Weitere, für die Bearbeitung phylogenetischer Fragestellungen bekannte Gene sind u.a. die Gene des mitochondrialen Genoms (z.B. Curole & Kocher, 1999) und die nuklearen Gene EF-1 $\alpha$  (Moreira et al., 1999; Roger et al., 1999), EF-2 (Rivera & Lake, 1992) oder auch ein kleiner Abschnitt des Gens für die RNA Polymerase II (Shultz & Regier, 2000).

Die DNA-Sequenzdatenerhebung ermöglicht nicht nur den phylogenetischen Vergleich von Nukleotiden oder Aminosäuren, sondern kann auch in der Auswertung makromolekularer Strukturen Einblick in verwandtschaftliche Beziehungen gewähren. Hier wären zum einen Elemente der Sekundärstruktur von ribosomalen RNAs zu nennen und zum anderen die Positionen von Introns in proteincodierenden Genen. Die Identifizierung prosthetischer Positionen in Proteinen und damit die Möglichkeit der Modellierung von Proteinsekundärstrukturen bis Quartärstrukturen, wie dies das große Arbeitsfeld der "Proteomics" darstellt, werden sicherlich in Zukunft auch dem phylogenetisch interessierten Wissenschaftler zahlreiche Betätigungsfelder bieten.

### 1.2.1 Mitochondriale Gene

Generelle Eigenschaften des mitochondrialen Genoms, wie i.a. maternale Vererbung, hohe Kopienzahl pro Zelle und „single copy genes“ (Hoeh et al., 1996), machen dieses Molekül sehr attraktiv für das Studium der Phylogenie verschiedener Eukaryontentaxa (Graf & Sparks, 2000). Insbesondere Sequenzvergleiche der 12S und 16S rDNA wurden in den letzten Jahren zur Aufklärung verschiedener taxonomischer Ebenen verwendet (Ballard et al., 1992; Richter et al., 2001), aber bezüglich ihrer Auflösungskraft bei älteren Splits auch kritisch hinterfragt (Gray et al., 1999).

Die heute im allgemeinen akzeptierte Erklärung für die Entstehung von Mitochondrien (und auch Chloroplasten) ist die Endosymbiontentheorie. Diese geht von einer endosymbiontischen Aufnahme eubakterieller, aerober Vorläufer durch einen Urkaryonten aus, mit anschließender Koexistenz vor ca. 1,5 Milliarden Jahren (Gray, 1989). Sequenzvergleiche des „mitochondrienartigsten“ bekannten eubakteriellen Genoms (*Rickettsia prowazekii*, einem  $\alpha$ -Proteobakterium, (Andersson et al., 1998)) und dem „bakterienartigsten“ bekannten mitochondrialen Genom (des Protozoen *Reclinomonas americana* mit 97 Genen, (Lang et al., 1997)) machen deutlich, dass alle rezenten mitochondrialen Genome ihren Ursprung in einem einzigen sogenannten protomitochondrialen Genom haben müssen (Gray et al., 1999).

Im Laufe der Evolution wurden aus den endosymbiontisch lebenden Bakterien, durch einen regen Gentransfer in das Kerngenom, semiautonome Organellen (Mitochondrien) unter nukleärer Kontrolle (Nugent & Palmer, 1991). In molekularer Hinsicht bietet der Sequenzvergleich der mitochondrialen

ribosomalen RNAs mit denen der Eubakterien starke Argumente für die Endosymbiontentheorie. So ist die bakterielle 16S rRNA homolog zu der tierischen, mitochondrialen 12S rRNA und entsprechend die bakterielle 23S rRNA homolog zur tierischen, mitochondrial kodierten 16S rRNA.

Das mitochondriale Genom der meisten Metazoa liegt in einem zirkulären Plasmid von etwa 16-20 kb Länge vor und kodiert i.d.R. nur noch durchschnittlich für 13 Proteine der Atmungskette (Untereinheiten 1-6 und 4L des NADH Dehydrogenase Komplexes, eine UE des Cytochrom b-c1 Komplexes, UE 1-3 des Cytochrom c Oxidase Komplexes, sowie zwei UE des ATP Synthase Komplexes), zwei ribosomale RNAs (12S und 16S rRNA) und 22 tRNAs (je eine tRNA für 18 Aminosäuren und je zwei tRNAs für die Aminosäuren Serin und Leucin). Mit dieser genetischen Ausstattung sind allerdings nur ca. 20% der in den Mitochondrien benötigten Genprodukte abgedeckt. Ca. 80% der Proteine sind kerncodiert und werden aus dem Cytoplasma in die Organellen importiert. Die Organisation des Chondrioms innerhalb der Metazoa ist sehr kompakt, kann allerdings in der Anordnung speziell seiner Gene für verschiedene tRNAs stark variieren. Die Untersuchung der Rekombination der tRNAs findet eine breite Anwendung für phylogenetische Fragestellung, insbesondere zur Klärung der Stellung verschiedener Taxa innerhalb der Arthropoda (Boore et al., 1995; Kurabayashi & Ueshima, 2000; Hwang et al., 2001). Die meisten untersuchten Vertreter der Metazoa weisen keine Introns in den mitochondrialen Genomen auf (Ausnahme: *Metridium senile* mit zwei ORFs in den Genen *cox1* und *ND5*).

### 1.2.2 Die Sekundärstruktur ribosomaler Gene und ihre Anwendungsbereiche in der Phylogenie

Ribosomale RNAs bilden nach der Transkription durch Basenpaarung eine Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen aus. In dieser Form sind die Moleküle im Ribosom aktiv und mit Hilfe zahlreicher ribosomaler Proteine wesentlich an der Translation beteiligt. Die Sekundärstruktur besteht aus Helices, auch "stems" genannt (basenpaarende Doppelstrangbereiche) und nicht basenpaarende Bereiche, den sogenannten "loops". Auf diese Weise entsteht aus einer rRNA oder auch tRNA ein komplexes zweidimensionales Makromolekül. Verschiedene "stems" und auch "loops" können ebenfalls miteinander agieren und so in räumliche Nähe zueinander kommen, was dann im weiteren die dreidimensionale Struktur des Moleküls bedingt. Um die Sekundär- wie auch Tertiärstrukturen verschiedener prokaryontischer tRNA als auch rRNA Moleküle zu analysieren, wurden verschiedene Methoden wie z.B. Röntgenstrahl-Kristallographie (Kim, 1979) angewendet, was allerdings für die sehr langen rRNAs methodische Schwierigkeiten bereitet. Die meisten Sekundärstrukturen wurden durch das Auffinden positioneller Kovarianzen im vergleichenden Ansatz postuliert und konnten in experimentellen Studien bestätigt werden (Gutell et al., 1992; Gutell et al., 1994). Daher spielt insbesondere im Fall der sehr langen ribosomalen RNAs die vergleichende Sequenzanalyse zur Aufklärung von Sekundärstrukturen eine entscheidende Rolle (Woese et al., 1980; Zwieb et al., 1981; Gutell et al., 1985).

Die 16S-artigen rRNAs der Mitochondrien gehören zu den atypischsten ribosomalen RNAs. Eine große Anzahl von 16S -''stem-loop''- Strukturen aus *E.coli* sind in der mitochondrialen kleinen ribosomalen Untereinheit (12S rRNA) nicht mehr vorhanden (Gutell et al., 1985). Durch die vergleichenden Arbeiten zur Determinierung eines Sekundärstrukturmodells der mitochondrialen 12S rRNA von Gutell et al. (1985; 1994) und Gutell (1994) für verschiedene Mammalia-Spezies und nachfolgende Verbesserungen (Douzery & Catzeflis, 1995) ist es gelungen, ein im wesentlichen akzeptiertes Modell zu erstellen. Über die Verwaltung der Sekundärstrukturinformationen für eine Vielzahl von Taxa in den entsprechenden Datenbanken ist es inzwischen möglich, Elemente zur Sekundärstruktur oder komplette Sekundärstrukturen für neu sequenzierte Taxa mittels der vergleichenden Sequenzanalyse zu ermitteln.

Somit spielt die Determinierung der Sekundärstruktur von rRNA Sequenzen in einer phylogenetischen Analyse eine entscheidende Rolle. Mit zunehmender Sequenzvariabilität ribosomaler RNAs innerhalb eines Taxons wird es schwieriger, mittels mathematischer Kriterien ein verlässliches Alignment zu rekonstruieren. Über die Identifizierung von Helices und ''loops'' anhand einer Modellstruktur wird heute im allgemeinen ein Alignment derartig visuell korrigiert, dass ''stem''-Bereiche primär homologisiert werden können (Hickson et al., 1996; Titus & Frost, 1996). Auf diese Weise gehen Informationen der Sekundärstruktur in die phylogenetische Computeranalyse mit ein. Uneinigkeit herrscht jedoch über das alignen von ''loop''-Sequenzen, die eine hohe Variabilität aufweisen können und sich somit wiederum sensitiv gegenüber verschiedenen ''gap''-Gewichtungen verhalten (Wheeler & Honeycutt, 1988; Dixon & Hillis, 1993). Daher wird häufig die Eliminierung dieser Bereiche empfohlen, was allerdings andererseits zu einem erheblichen Verlust an Informationen führt.

### 1.2.3 Nukleare Gene und ihre Struktur im Genom - ''intron early'' oder ''intron late''

Viele eukaryontische, im Nucleus lokalisierte Gene sind von nicht-codierenden, intervenierenden Sequenzen durchbrochen (Exon-Intron-Struktur). Die Expression dieser Gene erfordert die Entfernung der Introns bei der Reifung der mRNA-Moleküle im Nucleus, bevor sie in das Cytoplasma transportiert und dort translatiert werden. Das ''splicing'' der Introns erfolgt bei kerncodierten Genen gewöhnlich durch ein sogenanntes Spliceosom, ein RNA-Protein-Komplex bestehend aus snRNPs (''snurps'') und assoziierten Proteinfaktoren.

Mit der Entdeckung der Introns in eukaryontischen Genen Ende der siebziger Jahre des 20. Jahrhundert stellte sich gleichzeitig die Frage nach Funktion, Ursprung und Evolution derselben.

Dies führte zu zwei gegensätzlichen Postulaten: Die ''intron early'' Hypothese, die davon ausgeht, dass bereits der Vorläuferorganismus der Prokaryonten Introns besaß (Doolittle, 1978; Gilbert, 1978) und die ''intron late'' Hypothese, die eine nachträgliche Insertion der Introns in das eukaryontische Genom postuliert (Cavalier-Smith, 1978; 1985).

Noch bis vor ca. 20 Jahren war allgemein akzeptiert, dass ausschließlich Eukaryontengene von Introns unterbrochen werden. Dies wurde auch nicht durch die ''exon shuffling'' Theorie (Gilbert,

1978;1987) widerlegt, nach der die Introns des spliceosomalen Typs mit dem Ursprung der Gene an sich coinzidieren, d.h. der ``intron early`` Hypothese folgen. Introns werden demzufolge als Rekombinationsmedien betrachtet, die die variable Verknüpfung von initialen Elementarexons und so die Evolution der heutigen Gendiversität ermöglichte. Die zu diesem Zeitpunkt geglaubte Abwesenheit von Introns in Bakterien musste konsequenterweise als sekundärer Verlust gedeutet werden und wurde mit einem starken Selektionsdruck auf eine schnelle Replikation und rationelle Genexpression zu Gunsten einer kurzen Generationsfolge erklärt.

Einen neuen Denkansatz brachte Mitte der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts die erstmalige Entdeckung intervenierender Sequenzen in tRNA Genen einiger Archaebakterien, die zu einer neuen Klasse von Introns (Gruppe I Introns) gehören (Daniels et al., 1985) und bald darauf auch in Bakteriophagen und in tRNA Genen von Cyanobakterien und Proteobakterien gefunden wurden (Belford et al., 1995). In den beiden letztgenannten Organismengruppen gelangte wenig später auch eine Klasse von Introns der Gruppe II zur Entdeckung (Ferat & Michel, 1993;Ferat et al., 1994). Introns der Gruppe I und II sind autokatalytische Introns, d.h. es wird keine aufwendige spliceosomale Maschinerie zur Excision benötigt. Anstatt einer Bestätigung der ``exon shuffling`` Theorie bewirkte die Feststellung, dass Introns in allen Organismenreichen vorkommen, eine Stärkung der ``intron late`` Hypothese. Diese erklärt die Introns als Abkömmlinge ehemaliger mobiler genetischer Elemente, die in ursprünglich kontinuierlich organisierte Gene insertierten. Durch die Entdeckung der selbstspleißenden Introns in Proteobakterien und Cyanobakterien, d.h. den Prokaryontengruppen, aus denen vermutlich die Organellen via Endosymbiose hervorgingen, gewann die ``intron late`` Hypothese an Argumenten (Cavalier-Smith, 1991;Roger & Doolittle, 1993). Demzufolge liegt der Ursprung der Introns in den Eubakterien. Durch die Etablierung der Endosymbiose gelangten Gruppe I und Gruppe II Introns in die eukaryontische Zelle und von dort aus via massivem Gentransfer im Laufe der Evolution in den Nucleus. Während die Gruppe I Introns im Nucleus persistierten, vermuten Anhänger der ``intron late`` Hypothese weiterhin, dass ehemalige Gruppe II Introns in die ausschließlich in Eukaryonten zu findenden, spliceosomalen Introns evolvierten (Logsdon et al., 1998). Für diese These sprechen einige strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zueinander (Michel & Ferat, 1995;Strukla & Padgett, 2002).

Die heute weitestgehend akzeptierte Theorie, dass spliceosomale Introns ausschließlich in Eukaryonten zu finden sind und ihren ancestralen Vorläufer in prokaryontischen Gruppe II Introns haben, ermöglicht es in zunehmenden Maß eine detaillierte Aussage bezüglich der Evolution von Introns zu machen. Obwohl die Debatte der ``intron early`` *versus* ``intron late`` Hypothesen nicht an Aktualität verloren hat, mehren sich doch die Evidenzen für eine weitgehend rezente, autonome Ausbreitung und auch Verluste spleiceosomaler Introns innerhalb der Eukaryonten (Stoltzfus et al., 1997;DeSouza et al., 1998). Die Betrachtung der phylogenetischen Verteilung von Intronpositionen, d.h. von Gewinn und Verlust innerhalb der Eukaryonten (Logsdon Jr., 1998) und auch die vergleichende Analyse mit den inzwischen zahlreich sequenzierten bakteriellen Genomen und deren Introns auf der Basis der rekombinanten Molekularbiologie (Lynch & Richardson, 2002) werden hier in Zukunft einen entscheidenden Beitrag liefern können.

Für eine phylogenetische Betrachtung von Intronverteilungen ist zunächst die Frage der Mechanismen von Intronverlust und Gewinn zu klären, wobei nicht vergessen werden darf, dass diese Vorstellungen Modellcharakter besitzen, da sie nicht direkt beobachtbar sind:

Der Intronverlust kann wie folgt erklärt werden:

- Die reverse Transkription einer bereits prozessierten mRNA und folgende Rekombination via Genkonversion in das Genom (Palmer & Logsdon, 1991) führt zu einer intronlosen Kopie. Die reverse Transkription wird hierbei den sogenannten Retrotransposons "long interspersed nuclear elements" (LINEs) zugeschrieben, die häufig in Eukaryontengenomen zu finden sind (Kidwell & Lisch, 2001; Weiner, 2002).
- Die einfache genomische Deletion eines Introns kann ebenfalls zu einem spontanen Verlust führen. Hierbei kann es unter Umständen durch Ungenauigkeit bei der Deletion zu einer Addition oder Deletion mehrerer Codons im Wirtsgenom kommen (Llopart et al., 2002).

Die Mechanismen des Introngewinns:

- Über den Vorgang der Retrotransposition kann es zur Insertion von Introns kommen (Sharp, 1985; Bonen & Vogel, 2001). Dieser Vorgang setzt voraus, dass Komponenten des Spliceosoms transient am zuvor exizierten Intron verbleiben, dieser Lariat-Spliceosom-Komplex an einer unbesetzten "protosplice-site" einer nicht homologen prä-mRNA bindet und als reverse Reaktion die Insertion eines Introns katalysiert. Wenn diese modifizierte prä-mRNA vor ihrer Prozessierung revers transkribiert wird, kann dieses Produkt mit der homologen DNA rekombinieren, was wiederum zur Etablierung eines neuen Introns auf genomischer Ebene führt.

Wenngleich dieses Szenarium zunächst recht aufwendig und unwahrscheinlich klingt, so gibt es doch einige Hinweise für diese Annahme:

- Die snRNPs U2, U5 und U6 bleiben nach dem Spleißvorgang noch einige Zeit mit dem Lariat verbunden (Burge et al., 1999).
- Die Halbwertszeiten der Lariate erscheinen lang genug (~10 bis 30 min.) für eine Retrotransposition und reverse Transkription (Clement et al., 2001).

### **1.3 Crustacea und ihre Teiltaxa**

Krebse bilden eines der artenreichsten und darüber hinaus eines der diversesten Taxa innerhalb der Arthropoda. Sie sind primär aquatisch, haben aber auch teilweise das Land erobert (z.B. einige Teiltaxa der Brachyura, der Isopoda und der Amphipoda). Die Crustacea umfassen die rezenten Teiltaxa der Remipedia, Cephalocarida, Maxillopoda (incl. Ostracoda), Branchiopoda und Malacostraca.

Seit der Intensivierung molekularer Studien zur Arthropodensystematik wird einerseits die traditionelle Annahme einer Monophylie der Crustacea und andererseits ihre Schwestergruppenbeziehung zu den

Tracheata (Myriapoda + Hexapoda), zusammengefasst als Mandibulata bezeichnet, zunehmend kontrovers diskutiert. Erste molekulare Studien führten zur Formulierung der Hypothese einer Schwestergruppenbeziehung von Crustacea-Teiltaxa (Malacostraca) zu den Hexapoda (Turbeville et al., 1991; Ballard et al., 1992; Wheeler et al., 1993; Friedrich & Tautz, 1995). Diese Hypothese wurde nachfolgend durch Analysen verschiedener morphologischer Merkmalskomplexe erhärtet (Richter, 2002) und führte schließlich zu den Pancrustacea (Zrzavý & Stys, 1997) bzw. Tetraconata (Dohle, 2001), wobei allerdings erst jüngst auch die Monophylie der Hexapoda in Zweifel gezogen wurde (Nardi et al., 2003). Viele molekulare Analysen suggerieren neben einer engeren Beziehung eines Teiltaxons der Crustacea zu den Hexapoda gleichzeitig die Paraphylie der Crustacea (Garchia-Machado et al., 1999; Shultz & Regier, 2000; Wilson et al., 2000; Hwang et al., 2001). Verwandtschaftsbeziehungen von Teiltaxa innerhalb der Crustacea bedürfen ebenfalls weiterer Klärung (Giribet & Ribera, 2000). Dies betrifft insbesondere die Stellung der Remipedia und Cephalocarida und die Mono- oder Paraphylie der Maxillopoda. So werden z.B. die Cephalocarida, Branchiopoda und Maxillopoda, zusammengefasst als Entomostraca, den Malacostraca gegenübergestellt, wobei die Remipedia nicht betrachtet wurden (Walossek, 1999). Das Thoracopoda-Konzept, welches die Cephalocarida, Branchiopoda und Malacostraca vereinigt und den Remipedia und Maxillopoda gegenüberstellt, findet in den Analysen basierend auf kombinierten molekularen und morphologischen Merkmalen (‘‘total evidence’’) von Edgecombe et al. (2000) und auch durch Ax (1999) Unterstützung.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Anhand ausgewählter Genbereiche und weiterer genetischer Marker (Intronpositionen und ribosomale Sekundärstrukturen) sollen die phylogenetischen Beziehungen innerhalb zweier sehr unterschiedlicher Teiltaxa der Crustacea erarbeitet werden. Dabei steht neben der systematischen Bewertung der Taxa die kritische Bewertung der gewählten Marker für unterschiedliche taxonomische Ebenen im Vordergrund. Die beiden Taxa umfassen einmal die Branchiopoda (Blattfußkrebse), die eine sehr hohe Diversität aufweisen und stammesgeschichtlich vermutlich sehr alt sind (Oberes Kambrium) und andererseits die Astacoidea, ein Teiltaxon der Astacida (Malacostraca), die vermutlich erst im Jura evolvierten. (Für eine genauere Beschreibung der beiden Taxa siehe Kapitel 3)

Für die Branchiopoda kommen folgende Genbereiche zum Einsatz:

- Das mitochondrial codierte Gen für die kleine ribosomale Untereinheit (12S rDNA).
- Das im Kern lokalisierte Gen EF-1 $\alpha$ .

Aus den generierten Sequenzen ergeben sich weitere genetische Marker, die einer phylogenetischen Bewertung unterzogen werden.

- Informationen der Sekundärstruktur der dritten Domäne der 12S rRNA implementiert in einem alternativen Alignment.

- Das phylogenetische Signal der Intronpositionen innerhalb des EF-1 $\alpha$  Gens.

Für die Astacoidea werden folgende Genbereiche phylogenetisch analysiert.

- Das Gen für die 12S rRNA (dritte Domäne).
- Das ebenfalls mitochondrial codierte Proteingen cox1.

Alle generierten Datensätze (Ausnahme: Intronpositionen) werden computercladistisch mit Parsimonie- und Maximum Likelihood Verfahren berechnet und die Ergebnisse mit einigen bestehenden morphologischen, molekularen und im Fall der Astacoidea zoogeographischen Hypothesen verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

In der vorliegenden Arbeit werden im wesentlichen Geräte genutzt, die zur Standardausstattung eines molekularbiologischen Labors gehören, wie z.B. diverse Kleingeräte (Tischzentrifuge, Heizblöcke, Agarose Gelelektrophoresekammern, etc.) und zur Durchführung von PCR-Reaktionen und Cyclesequenzierungen Thermocycler der Hersteller Perkin Elmer bzw. MJ Research. Darüber hinaus kommt der Gradientencycler der Firma Eppendorf zur Optimierung von Annealingtemperaturen universeller Primer für einige Arten zur Anwendung. Die Sequenz Gelelektrophorese wird auf ALF Sequenzern für Fluoreszein Sequenzierungen und ALF Express Sequenzern für Cy5 - Sequenzierungen (beide Pharmacia) durchgeführt.

#### 2.1.2 Hardware und Software

Für die Auswertung der Sequenzdaten und die phylogenetische Analyse der erhobenen Sequenzen wird ein zur Verfügung stehender Personal Computer (Pentium IV, 2,4 GHz Prozessor, 256 MB RAM Arbeitsspeicher) genutzt.

Die Auswertung der Sequenzläufe wird mit der Software ALFwin Vers. 2.00 (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Sequenz Assemblies und Analyse der ``reading frames`` erfolgt mit dem Software Paket Sequencher™ Vers. 4.0 (Gene Codes Corporation).

Alignments und phylogenetische Analysen der Sequenzdaten werden mit den Programmpaketen Clustal X (Thompson et al., 1997a) (``multiple`` Alignmentprogramm) und POY (Gladstein & Wheeler, 1996-2000) (Alignment + Topologie).

Für die Parsimonie Analysen werden die Programme POY (Gladstein & Wheeler, 1996-2000), NONA, PHAST (Goloboff, 1993-2000), Winclada, Vers. 0.9.9 als Shellsoftware (Nixon, 1999-2000) und PAUP Vers. 4.0 (Beta) (Sinauer Associates) genutzt.

Maximum Likelihood Analysen werden ausschließlich mit dem Programm TREE-PUZZLE Vers. 5.0 (Strimmer & von Haeseler, 1996; Schmidt et al., 1999-2000; 2002) durchgeführt. Consensus Dendrogramme für ML Berechnungen werden mit dem Programm Phylip Vers. 3.5c (Felsenstein, 1986-1995) erzeugt (siehe auch Kapitel 2.2.7.3). Für die ``likelihood mapping`` Analysen und das Kishino-Hasegawa-Testverfahren (Kishino & Hasegawa, 1989) wird ebenfalls das Programm TREE-PUZZLE benutzt.

Grafiken der in dieser Arbeit gezeigten Stammbäume werden mit dem Programm TreeView (Page, 1996) erzeugt. Zur Erstellung des manuellen Alignments wird die Software Seaview (Galtier et al., 1996) zu Hilfe genommen. Alle weiteren graphischen Darstellungen wie Sekundärstrukturen oder Colorierungen der Stammbäume werden mit CorelDraw Vers. 10 (Microsoft) angefertigt.

### 2.1.3 Labormaterialien

PCR -Reaktionen werden mit der Taq-Polymerase GenTherm™ (5u/μl), dem dazugehörigen 10x Puffer (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCL (pH 8,8 bei 25°C), 0,1% Tween 20), MgCl<sub>2</sub> (Stammlösung 50 mM) und Desoxyribonukleotiden (100 mM Stammlösung) der Firma GeneCraft durchgeführt.

Zur Evaluierung der PCR Produkte auf dem Agarosegel werden 5μl des Längenstandards ``1 kb Ladder`` (1μg/μl) von Boehringer Mannheim eingesetzt. Zur Aufreinigung von PCR Reaktionen werden Ultrazentrifugationsröhrchen Microcon 30 bzw. 50 der Firma Amicon verwendet.

Elutionen von PCR Fragmenten aus Agarosegelen erfolgen mit dem PCR Purification Kit der Firma Machery und Nagel nach Herstellerangaben.

Als weitere Kits zur DNA Sequenzierung und Klonierung kommen zum Einsatz: Original TA Cloning Kit (Invitrogen), Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia) und T7-Sequencing-Kit (Amersham-Pharmacia). Plasmid DNA wurde mit mittels eines Mini Plasmid Kits (Machery und Nagel) präpariert. Klonierungen und Sequenzreaktionen erfolgen nach Herstellerangaben. Alle eingesetzten Primer werden von der Firma TibMolBiol (Berlin) synthetisiert. Der Lieferumfang beträgt 1 OD<sub>260</sub> eines lyophilisierten Pellets und wird vor Gebrauch mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Lösung von 10 pmol/μl (PCR Primer) bzw. 2 pmol/μl (Sequenzierprimer) eingestellt.

### 2.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

**Standardpuffer und Lösungen:** 0,5 M EDTA (pH 8); 8 M LiCl; 5 M NaCl; 1 M Tris-HCL (pH 8,2 bei 25°C); 70% EtOH (unvergällt); 100% EtOH; 100% Isopropanol; Chloroform/Isoamylalkohol (24:1); TE Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA, pH 8,0).

**DNA Präparation, Lysepuffer:** 4% CTAB Lysepuffer (4 g Cetyltrimethylammoniumbromid; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCL, pH 8,2) + 100 mM β- Mercaptoethanol.

**Elektrophoresepuffer Stammlösung:** 10 x TBE Puffer (90 mM Tris base; 90 mM Borsäure; 20 mM EDTA).

**6% iges Sequenzgel (60 ml):** 13,5 ml einer 30% Polyacrylamid Gelmatrix (19:1 Acrylamid / Bisacrylamid); 6 M Urea, 3,6 ml 10xTBE Puffer (Endkonz. 0,6x). ca. 30 μl Repal Silane (20 ml 100% EtOH, 75 μl 100% Repal Silane, 5 ml 10% Essigsäure) zur Stabilisierung der Sequenzgeltaschen

sowie 10% APS (Ammoniumpersulfat) und 60 µl Temed ( $C_6H_{16}N_2$ ) zur Beschleunigung der Polymerisation.

``Loading solution`` für die Sequenzgelelektrophorese: 95% Formamid (deionisiert in Amberlite IRN-150L); 500 mM EDTA (pH 8); 60 mg Dextran Blue.

``Loading solution`` für Agarosegelelektrophorese: 0,25% Bromphenolblau; 40% (w/v) Sucrose (in  $H_2O$ ).

**Anfärben der DNA in Agarosegelen:** Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Stammlösung 100 mg/ml  $H_2O$ ) in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml.

**Medien zur Anzucht von Bakterien:** LB (Luria–Bertani) Flüssigmedium (1l). 10 g NaCl, 10g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 30% (v/v) Glycerin und zusätzlich 15 g Agar für LB Festmedium. Zur Selektion rekombinanter Bakterien wurde Ampicillin, IPTG und X-Gal, wie in Kapitel: 2.2.6 beschrieben, auf die Festmedien aufgetragen.

### 2.1.5 Verwendete Spezies

Sämtliche Arten werden in 100% EtOH bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Aufgrund der geringen Größe einiger Spezies der Branchiopoda werden zumeist komplette Tiere verarbeitet. Von den bearbeiteten Astacida stand jeweils ein Pereiod zur Verfügung, von welchem zur DNA Präparation das Muskelgewebe ausgelöst und homogenisiert wird. In den Tabelle 1 und Tabelle 2 werden alle in dieser Arbeit sequenzierten Arten aufgelistet. Sofern Referenzdaten aus der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zur phylogenetischen Analyse zum Einsatz kommen, werden diese mit Accessionnummer und Referenz im Text (siehe auch Kapitel: 3) benannt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der in der Arbeit sequenzierten Spezies und weitere Literaturdaten, bzw. Genbankeinträge des Taxons Branchiopoda.

Branchiopoda	Familie	Speziesbezeichnung	Fundort
Haplouoda	Lentodoridae	<i>Lentodora kindti</i> (Focke, 1844)	Tegeler See, Berlin, Deutschland
Ctenopoda	Sididae	<i>Diaphanosoma brachyurum</i> (Liévin, 1848)	Nikolassee, Berlin, Deutschland
		<i>Sida crystallina</i> (O.F.Müller, 1776)	Untere Oder, Brandenburg, Deutschland
Anomopoda	Daphniidae	<i>Daphnia pulex</i> Leydig, 1860	Fischfutter, kommerziell
		<i>Simocephalus vetulus</i> (O.F.Müller, 1776)	Untere Oder, Brandenburg, Deutschland
		<i>Scapholeberis mucronata</i> (O.F.Müller, 1785)	Untere Oder, Brandenburg, Deutschland
		<i>Ceriodaphnia megops</i> G.O.Sars, 1862	Nikolassee, Berlin, Deutschland
	Bosminidae	<i>Bosmina coregoni</i> Baird, 1857	Spree, Berlin, Deutschland
	Moinidae	<i>Moina brachycephala</i>	Acc.no nicht vorhanden, (Hanner & Fugate, 1997)
	Chydoridae	<i>Eurycerus lamallata</i> (O.F.Müller, 1785)	Untere Oder, Brandenburg, Deutschland
		<i>Pseudochydorus globosus</i> (Baird, 1843)	Untere Oder, Brandenburg, Deutschland
	Macrothricidae	<i>Ilyocryptus spec.</i>	Nikolassee, Berlin, Deutschland
Onychopoda	Cercopagididae	<i>Bythotrephes longimanus</i> Leydig, 1860	Tegeler See, Berlin, Deutschland
	Polyphemidae	<i>Polyphemus pediculus</i> (Linnaeus, 1761)	Nikolassee, Berlin, Deutschland
	Podonidae	<i>Podon leuckarti</i> (Sars, 1862)	Sylt, Schleswig-Holstein, Deutschland
		<i>Evadne nordmanni</i> Lovén, 1836	Sylt, Schleswig-Holstein, Deutschland
Spinicaudata	Limnadiidae	<i>Limnadia yeyetta</i> Hertzog, 1935	Morava flood plain, Österreich
		<i>Eulimnadia texana</i> Packard, 1871	Acc.no nicht vorhanden, (Hanner & Fugate, 1997)
		<i>Limnadia lenticularis</i> (Linnaeus, 1761)	Morava flood plain, Österreich
		<i>Limnadopsis birchii</i> (Baird, 1860)	Paroo area, NSW, Australien
	Cyzicidae	<i>Cyzicus mexicanus</i> (Claus, 1860)	Acc.no nicht vorhanden, (Hanner & Fugate, 1997)
		<i>Eocyclus spec.</i>	Paroo area, NSW, Australien
		<i>Caenestheriella spec.</i>	Paroo area, NSW, Australien
		<i>Caenestheria spec.</i>	Paroo area, NSW, Australien
	Leptestheriidae	<i>Leptestheria dahalacensis</i> (Rüpell, 1837)	Morava flood plain, Österreich
		<i>Leptestheria kawachiensis</i> Uéno, 1927	Lake Biwa area, Japan
	Cyclestheriidae	<i>Cyclestheria hislopi</i> (Baird, 1859)	Kakadu National Park, NT, Australien
Laevicaudata	Lynceidae	<i>Lynceus tatei</i> (Brady, 1886)	Paroo area, NSW, Australien
		<i>Lynceus brachyurus</i> (O.F.Müller, 1776)	Kopenhagen, Dänemark
		<i>Lynceus biformis</i> (Ishikawa, 1895)	Lake Biwa area, Japan
Notostraca	Triopsidae	<i>Triops longicaudatus</i> (Leconte, 1846)	Acc.no nicht vorhanden, (Hanner & Fugate, 1997)
		<i>Triops cancriformis</i> (Bosc, 1801)	Morava flood plain, Österreich
		<i>Triops australiensis</i> (Spencer et Hall, 1896)	Paroo area, NSW, Australien
		<i>Lepidurus bilobatus</i> Packard, 1877	Acc.no nicht vorhanden, (Hanner & Fugate, 1997)
		<i>Lepidurus apus</i> (Linnaeus, 1758)	Spandauer Forst, Berlin, Deutschland
Anostraca	Streptocephalidae	<i>Streptocephalus texanus</i> Packard, 1871	Acc.no nicht vorhanden, (Hanner & Fugate, 1997)
	Linderiellidae	<i>Linderiella santarosae</i> Thiéry et Fugate, 1994	Acc.no nicht vorhanden, (Hanner & Fugate, 1997)
	Artemiidae	<i>Artemia franciscana</i> Kellog, 1906	Genbank
	Branchipodidae	<i>Parartemia minuta</i> Geddes, 1973	Paroo area, NSW, Australien
	Thamnocephalidae	<i>Branchinella occidentalis</i> Dakin, 1914	Paroo area, NSW, Australien
		<i>Branchinella pinnata</i> Geddes, 1981	Paroo area, NSW, Australien

Tabelle 2: Zusammenstellung der in der Arbeit analysierten Spezies des Taxons Astacida.

<b>Astacida</b>	<b>Familie</b>	<b>Speziesbezeichnung</b>	<b>Vorkommen/Fundort</b>
Astacoidea	Cambaridae	<i>Cambaroides similis</i> , Koelbel, 1892 <i>Cambaroides dauricus</i> , Pallas 1773 <i>Cambaroides japonicus</i> , de Haan, 1842 <i>Cambaroides schrenckii</i> , Kessler, 1874 <i>Procambarus clarkii</i> , Girard, 1852 <i>Orconectes limosus</i> , Rafinesque, 1817 <i>Procambarus fallax</i> , Hagen Marmorkrebs, nicht beschrieben	Korea Mongolei Hokkaido, Japan Mongolei USA Havel, Berlin Florida, USA Private Zucht, A.Reimann
	Astacidae	<i>Austrapotamobius torrentium</i> , Schrank, 1903 <i>Austrapotamobius pallipes</i> , Lereboullet, 1858 <i>Astacus astacus</i> , Linnaeus, 1758 <i>Astacus leptodactylus</i> , Eschscholtz, 1832 <i>Pacifastacus leniusculus</i> , Dana, 1852	Bayern, Deutschland Bayern, Deutschland Bayern, Deutschland Türkei USA
Parastacoidea	Parastacidae	<i>Astacopsis franklini</i> <i>Parastacoides</i> sp., Erichson, 1946 <i>Paranephrops zealandicus</i>	Tasmanien Tasmanien Neuseeland

### 2.1.6 Primer

In Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgelistet. (A) enthält die Sequenzen der PCR-Primer für die Branchiopoda (12S und EF-1 $\alpha$ ) und für die Astacida (12S und *cox1*) und die für die PCR eingesetzten Annealingtemperaturen. Zur Ansequenzierung der PCR-Produkte vom 5' und 3' Ende her sind die Sequenzen der Standard-Sequenzierprimer (5'- Label Fluoreszein) vermerkt. (B) enthält alle für die komplette Sequenzierung des EF-1 $\alpha$  Gens eingesetzten internen "walking"-Primer.

Tabelle 3: (A) Aufstellung der verwendeten genspezifischen PCR- und Sequenzierprimer für die verschiedenen Taxa. „Tm“ bezeichnet die i. a. verwendeten Annealingtemperaturen während der PCR. Sofern für einzelne Spezies keine andere Annealingtemperatur verzeichnet ist, wird die für das entsprechende Großtaxon angegebene Temperatur gewählt. Sequenzen taxonspezifischer PCR-Primer sind fett gedruckt. Nicht fettgedruckte Primerbereiche entsprechen den komplementären Sequenzen der Standardprimer. (B) Aufstellung der verwendeten internen „walking“-Primer zur Sequenzierung des Gens EF-1 $\alpha$ . Sofern nicht anders angegeben, werden die internen Primer für alle Spezies angewendet.

### A.

Taxon	Gen	1. PCR Primer forward (5' → 3') 2. PCR Primer backward (5' → 3')	Tm PCR	Sequenzierprimer (5' → 3'); Label: Fluoreszein (FI)
Branchiopoda	12S	1. 12CR3UP (20 pmol) GGG TAA AAC GAC GGC CAG TGA CTT TGT TAC GAC TTA TCT C	40°C	FI-M13 -20 (UP) (4 pmol) GTA AAA CGA CGG CCA GT Forward FI-M13 Reverse (RP) (4 pmol) AAC AGC TAT GAC CAT G Backward
Ausnahme: Onychopoda	12S	Primer s.o. 1. + 2.	42°C	
Astacida	12S	1. CF12FOR-T7T (10 pmol) AAA GCT AGT TAT TGC TCA GCG GAM ATG ARA GCG ACG GGC GAT	45°C	FI-T7term (4 pmol) GCT AGT TAT TGC TCA GCG G Forward FI-T7prom (4 pmol) TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG Backward
	Cox1	1. CoxFOR-T7T (10 pmol) AAA GCT AGT TAT TGC TCA GCG GGG KCA YCC YGA RGT YAT AT	50°C	FI-T7term (4 pmol) GCT AGT TAT TGC TCA GCG G Forward FI-T7prom (4 pmol) TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG Backward
Branchiopoda	EF-1 $\alpha$	1. M44-1UP (Cho et al., 1995) (10 pmol) GGG TAA AAC GAC GGC CAG TGG CTG AGC GYG ARC GTG GTA TCA C	53°C	FI-M13-20 (UP) (4 pmol) forward (s.o.) FI-M13 Reverse (RP) (4 pmol) backward (s.o.)
		2. 3'EF1 RP (10 pmol) GGG AAC AGC TTA TGA CCA TGG GAA GTC AGA GAA GGA CTC		

## B.

Interne walking primer zur Sequenzierung des Gens EF-1 $\alpha$ . Label: Fluoreszein (FI) oder CY5		
Primername	Sequenz 5'→3'	Bemerkungen
3'EF1	FI- 5'- GGA AGT CAG AGA AGG ACT C	
Flv1B	CY5- 5'- GGC TAC GTT GCC GGT GAC TC	
EF2B	FI- 5'- ACG GAC TTG ACT TCA GTG GT	
EF3B	FI- 5'- ATG TGG GCG GTG TGG CAA TC	
EF4B	CY5- 5'- ATG TTG TCT CCG TGC CAT CC	
EF5B	FI- 5'- GTC AAG GAA TTG CGT CGT GG	
EF6B	FI- 5'- ATA CCA GCC TCG AAT TCA CC	
EF14F	FI- 5'- AAC ATG ATY ACT GGT ACC TC	
EF-18F	FI- 5'- GGY TTC RAC GTC AAG AAC GT	
11/17EF3b	CY5- 5'- CCA TAC CCG GCT TGA TGA C	spez. für <i>Scapholeberis</i>
10/14EF-7	FI- 5'- AAG ATG GAT TCC ACT GAG CC	spez. für <i>Eurycercus</i> und <i>Simocephalus</i>
8-EF10F	CY5- 5'- GAC TTG TTC GCC CAG GTC	spez. für <i>Evadne</i>
8-EF9b	CY5- 5'- GCG ACG ATG AGC ACA GCG CA	spez. für <i>Evadne</i>
44-EF16F	FI- 5'- GGA CAT CGT GAT TTC ATC	spez. für <i>Lynceus</i>
43-17F	FI- 5'- CCT ACA GTG AAG CTC GTT A	spez. für <i>Cyclestheria</i>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle hier im Text aufgeführten Standardmethoden, wie Chloroformextraktionen, Alkoholfällungen und Agarosegelelektrophorese und die Präparation kompetenter Bakterienzellen (sofern erforderlich) werden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

### 2.2.2 Datenerhebung

Die zur Datenerhebung durchgeführten Methoden umfassen die Gesamtnukleinsäurenpräparation, die anschließende PCR Amplifikation des gewünschten Genabschnittes mit universellen Primern und die Direktsequenzierung der PCR Produkte. In Ausnahmefällen, z.B. wenn das PCR Produkt zu schwach ist, um direkt sequenziert zu werden, werden diese Produkte kloniert. Im Regelfall wurden 10 positive Klone gescreent und auf die Richtigkeit ihrer Inserts mittels Sequenzierung überprüft.

### 2.2.3 DNA Präparation

Von ca. 1-20 Individuen (Branchiopoda) und ca. 10-20 mg Muskelgewebe der Astacida werden Nukleinsäureextraktionen mit dem 4%-igen Lysepuffer CTAB (s. Kap. 2.1.4) in abgewandelter Form nach der Methode von Doyle & Doyle (1990) angefertigt. Die Homogenisation findet direkt in 500 µl Lysepuffer + 100 mM β-Mercaptoethanol in Gegenwart einiger Körnchen Seesand statt. Durch die Zugabe von Seesand wird die Menge der extrahierten Nukleinsäuren enorm erhöht, da das Gewebe der zum Teil sehr kleinen Tiere besser aufgeschlossen werden konnte. Besonders in Fällen, wo nur ein bis zwei sehr kleine Individuen zur Verfügung standen, ermöglicht erst die Zugabe von Seesand eine Extraktion in ausreichender Menge. Das Homogenisat wird nach einer Inkubationszeit von ca. 30 min bei 65°C mit einem Volumen Chloroform versetzt und ca. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend werden die Nukleinsäuren mit 0,8 Volumen Isopropanol aus dem Überstand gefällt. Die Nukleinsäure-Pellets werden je nach ihrer Größe in 5 - 30 µl TE Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert. Menge und Qualität von je 1 µl der Präparationen wurde auf einem 1%-igen Agarosegel abgeschätzt. In einigen Fällen, in denen die DNA Präparationen einer folgenden enzymatischen Reaktion nicht zugänglich waren, wird mit 8 M LiCl (2 h bei 65°C) erneut präzipitiert.

### 2.2.4 Primerdesign und PCR Amplifikation

Der Einsatz von universell anwendbaren PCR Primern ermöglicht es, mit nur einem Primerpaar einen definierten Genbereich unterschiedlicher Spezies zu amplifizieren.

Die zur Anwendung kommenden PCR Primer (Tabelle 3) werden an ihrem 5'-Ende artifiziell verlängert, sofern die PCR Produkte direkt in der Cyclesequenzierung eingesetzt werden können. Als zusätzliche Sequenzen werden die "primingsites" von Standardprimern gewählt: Die Primer, die zur Amplifikation der Branchiopoda des 12S und EF-1 $\alpha$  Gens genutzt werden, werden mit den Sequenzen für die Standardprimer M13 universe und M13 reverse verlängert. Die Primer zur Amplifikation der Gene 12S und cox1 der Astacoidea werden mit den "primingsites" für T7<sub>term</sub> und T7<sub>prom</sub> verlängert. Die Methode der künstlichen Verlängerung der PCR Primer (Cho et al., 1995) ermöglicht die routinemäßige Cyclesequenzierung unterschiedlicher Templates bei einer gegebenen Temperatur mit den angegebenen Standardprimern. In den Fällen, in denen das PCR Produkt kloniert wird, kann auf eine artifizielle Verlängerung der PCR Primer verzichtet werden.

Die PCR Amplifikationen (Gesamtvolumen 50-100 µl) erfolgen nach einem Standardprotokoll mit ca. 100 ng DNA Template und je 20 pmol Primer für die 12S rDNA, bzw. 10 pmol je Primer für die Genbereiche cox1 und EF-1 $\alpha$ . Nach einer einmaligen Denaturierung der DNA für 3-5 min folgen 35-40 Zyklen mit einer Denaturierung bei 94°C (30 s), "primerannealing" bei 40-53°C für 45 s und einer Elongation bei 72°C (45 s bis 1 min15 s). Eine einmalige Extension bei 72°C für 3-7 min beenden die Amplifikation. Durch die je nach gewünschtem Gen eingesetzten Primer werden für die 12S rRNA ein Amplifikat von durchschnittlich 500 bp., für das Gen EF-1 $\alpha$  Produkte von 1063-~1200 bp. (inklusive

Introns) und für das Gen *cox1* Produkte mit einer Länge von 450 bp. generiert. Die genauen Annealingtemperaturen werden, sofern sie abweichend zum Standard sind, in einem Gradientencycler (Eppendorf) optimiert. Annealingtemperaturen sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Von sämtlichen PCR Produkten wird ein Aliquot von 5 µl auf einem 1-1,2% igen Agarosegel näherungsweise quantifiziert. In der Regel kann erfahrungsgemäß für die Sequenzierung und Elektrophorese auf ALF-Sequenzern auf eine Aufreinigung der PCR-Produkte verzichtet werden. Sofern allerdings die Analyse auf dem Agarosegel eine noch erhebliche Menge an freien Primern oder Primerdimeren zeigt und das PCR Produkt in nur geringer Menge generiert werden konnte, werden die PCR Produkte mittels Microcon PCR 50 Ultrafiltrationsröhrchen (Millipore) gefiltert. Nicht incorporierte Primer bzw. Dimere werden auf diese Weise quantitativ entfernt. Gleichzeitig wird der PCR Ansatz auf ein erheblich kleineres Volumen (5-10 µl) konzentriert, sodass sich vielfach eine schwache Amplifikation trotzdem für eine anschließende direkte Sequenzierung als adäquat erweist. Die Filtration der PCR Produkte ist nur bei einigen Spezies nötig.

### 2.2.5 Cyclesequenzierung der PCR Produkte

Die Sequenzierung erfolgt mittels der von Sanger und Kollegen (1977) entwickelten Methode des Strangaufbaus und definierten Strangabbruchs durch den Einsatz von Dideoxynukleotiden. Die Kettenabbruchmethode ist inzwischen die Routinemethode zur Bestimmung von Nukleotidsequenzen einer DNA und hat sich in der Laborroutine gegenüber der Maxam-Gilbert Sequenzierung (Maxam & Gilbert, 1977) durchgesetzt: DNA-Doppelstränge werden hierbei zunächst denaturiert (durch Hitze- oder Alkalibehandlung). Zur Neusynthese von DNA mit einer DNA-Polymerase ist immer ein kurzer Doppelstrangbereich erforderlich, bei dem ein 3'-Ende anhand des überstehenden 5'-Endes des Gegenstranges als Template verlängert werden kann. Solch eine kurze Doppelstrangregion wird zur Sequenzierung (wie bei der PCR-Reaktion) künstlich durch einen Oligonukleotid-Primer erzeugt, der mit der einzelsträngigen Template-DNA hybridisieren muß. An dem auf diese Weise gebildeten 5'-Überhang kann nun die Neusynthese ansetzen. Die Neusynthese geschieht in Gegenwart der vier monomeren dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP). Um nun einen definierten Strangabbruch zu erzeugen, werden der Reaktion zusätzlich Dideoxynukleotide zugefügt. Diesen ddNTPs fehlt ausser in der 2'- Position auch in der 3'- Position der Ribose eine OH-Gruppe, d.h. es steht keine notwendige OH-Gruppe zur Bildung einer folgenden Phosphodiesterbindung zur Verfügung, die Synthese bricht ab. In vier verschiedenen Ansätzen mit jeweils einem Dideoxynukleotid, neben den normalen vier dNTPs, entsteht so eine Population unterschiedlich langer Moleküle, deren jeweils letztes Nukleotid dem zuvor eingesetzten ddNTP entspricht. Statistisch gesehen enthält so z.B. die ddATP-Reaktion an jedem im Template auftretenden Thymin eine detektierbare Menge an Abbrüchen. Die vier Reaktionsansätze einer Sequenzierung werden getrennt (im Fall des ALF Sequenziersystems) der Elektrophorese zugeführt (im idealen Fall einem Sequenzautomaten). Ein Polyacrylamidgel hat die Auflösungskraft um Moleküle mit nur einer Base Unterschied in der Kettenlänge voneinander zu unterscheiden. Um die Moleküle detektieren zu können, ist der in der Sequenzreaktion eingesetzte Primer an seinem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (für die hier eingesetzten Systeme

ALF und ALF-Express sind Fluorescein bzw. CY5-Fluoreszenzfarbstoffe erforderlich). Eine automatische Lesevorrichtung erlaubt die simultane Erfassung auf einem Computer nach Anregung und Detektierung des Farbstoffes (und damit des Moleküls) durch einen Laserstrahl.

Um die Syntheseeffizienz zu erhöhen, wird auch hier zur Sequenzierung (wie bei der PCR) mit thermostabilen Polymerasen gearbeitet, die es erlauben, in einem Ansatz, in mehreren Zyklen eine neue Synthese zu starten (Cycle-Sequenzierung). Diese Synthese verläuft allerdings linear, da nur ein Primer eingesetzt wird, im Gegensatz zur exponentiellen Synthese der PCR mit zwei gegenläufigen Primern. Die Methode der PCR-Direktsequenzierung hat des Weiteren den Vorteil, dass mögliche Fehler beim Strangaufbau, die durch den Einsatz von Taq-Polymerase für die Amplifikation entstehen, ausgemittelt werden.

Sofern die Amplifikation ein in Qualität und Quantität ausreichendes Produkt ergibt, wird das Amplifikat direkt sequenziert. Die einzusetzende Menge an Template richtet sich nach Menge und Länge desselben. Es werden ca. 0,5 µg Template pro 500 bp. Länge (des PCR Produktes) eingesetzt. Die Cyclesequenzierungen erfolgen mit dem Thermosequense Kit nach Herstellerangaben (Amersham Pharmacia) mit 4 pmol Primer pro Sequenzierung und einer Annealingtemperatur von 57°C.

Alle 12S und cox1- PCR Produkte werden doppelsträngig sequenziert. Als Sequenzierprimer für die Gene 12S und cox1 wurden die Standardprimer M13 universe bzw. reverse (12S) und T7<sub>term</sub> bzw. T7<sub>prom</sub> (cox1) eingesetzt.

Das Gen EF-1 $\alpha$  konnte zunächst nur von zwei Branchiopoda-Spezies (*Sida* und *Lepidurus*) mit den Literaturprimern amplifiziert werden. Diese Amplifikate wurden mit M13 universe und M13 reverse ansequenziert und aus den Sequenzen wurden sowohl PCR spezifische universelle Primer für die erfolgreiche Amplifikation anderer Branchiopoda abgeleitet, als auch weiterführende (sogenannte interne Primer), soweit möglich universelle Sequenzierprimer, die es in den folgenden Sequenzreaktionen ermöglichen, die Exons der Produkte doppelsträngig zu sequenzieren (``primerwalking``). Introns werden zumeist nur einzelsträngig sequenziert.

Für die Gene 12S und cox1 werden durchschnittlich 0,3 - 0,5 µg PCR Produkt eingesetzt, für das Gen EF-1 $\alpha$  ca. 0,8-1 µg.

Die Sequenzgel-Elektrophorese erfolgt auf ALF- Sequenzern (bei Fluorescein-markierten Sequenzen) bzw. auf ALF Express Sequenzern, sofern die Sequenzierungen mit CY5 gelabelten Primern durchgeführt wurden. Die Herstellung des 6,5% Polyacrylamid- Sequenzgels erfolgt nach Angaben des Herstellers (Pharmacia). Die Auftrennung der Sequenzierungen im elektrischen Feld wird bei einer Temperatur von 50°C, 30 Watt, 1500 Volt, 38 mA und einer Laserpower von 3 mW durchgeführt.

## 2.2.6 Klonierungen

Im Falle quantitativ ungenügender Amplifikation wird kloniert, um eine Sequenzierung zu ermöglichen. Die Ligationen der PCR Produkte werden mit dem Kit „TA Cloning“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend werden die Plasmide (Vektor pCR 2.1 + 1 Molekül des PCR Produktes) mittels Elektroschock (1 Puls á 2,5 kV mit einer Feldstärke von 12,5 kV/cm) in den elektrokompetenten *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$  transformiert und auf LB+Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) Medium in Gegenwart von IPTG (24  $\mu$ g/ml) und X-Gal (50  $\mu$ g/ml) selektioniert. Von allen Transformationen werden 10-15 Klone auf das Vorhandensein eines Inserts und auf die Richtigkeit überprüft. Dazu werden 10-15 Kolonien einzeln gepickt und in 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O für 5 min bei 96°C lysiert. Anschließend wird das Lysat bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 rpm) 5 min. zentrifugiert um Zelltrümmer zu pelletieren. 1  $\mu$ l des Überstandes wird als Template in einen 50  $\mu$ l PCR Ansatz mit je 2,5 pmol LacZ A (5'-GGTAGTGGGATACGACGATA) und LacZ B (5'-CAACAATCGATCCTACTAAA) Primern gegeben. Der Vektor pCR2.1 enthält die ``priming sites`` der Standardprimer LacZ A und B, sodass man auf diese Weise in einfacher und sehr effizienter Weise positive, d.h. Plasmide mit erfolgreich kloniertem PCR Produkt von negativen Klonen unterscheiden kann. Alle positiven PCR Produkte werden danach direkt cyclesequenziert. Die ausgewerteten Inserts werden mittels eines ``Blast-Search`` (Altschul et al., 1997), mit allen in der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vorhandenen Sequenzen verglichen und die Richtigkeit der Inserts bestätigt.

## 2.2.7 Phylogenetische Analyse

Alle im Rahmen dieser Arbeit generierten Sequenzdaten wurden phylogenetisch ausgewertet. Zur Klärung der Aussengruppenfrage der Phyllopora (Branchiopoda) wurde ein Arthropodenalignment, basierend auf den konservierten Bereichen der Aminosäuresequenzen mitochondrialen Proteine, herangezogen (Hwang et al., 2001) und durch einige seitdem neu publizierte mitochondrialen Proteinsequenzen ergänzt (weitere Erläuterungen dazu siehe Kapitel: 3.1.2.1).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewendeten Methoden in umgekehrter Reihenfolge, zuerst die Berechnungsmethoden der Cladogramme und anschließend die Erstellung der Alignments, beschrieben. Dies erscheint sinnvoll, da das hier u.a. verwendete Programm POY sowohl Alignments als auch Topologien erzeugt.

### 2.2.7.1 Phylogenetische Stammbäume

Eine gegebene DNA Datenmatrix (Alignment) ist definiert durch die Anzahl an Taxa (Arten) und die Anzahl an Merkmalen (Nukleotide, bzw. Aminosäuren). Anhand der Formel

$$N(u) = (2n-5)! / [2^{n-3} (n-3)!]$$

lassen sich von „n“ Taxa „N(u)“ ungewurzelte Topologien erzeugen (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). D.h. für 10 Taxa wären  $2 \times 10^6$ , bei 20 Taxa schon  $2 \times 10^{20}$  Topologien theoretisch möglich. Um aus dieser Fülle von ungewurzelten Topologien die sinnvollen herauszufinden, sind verschiedene Rechenalgorithmen nutzbar. Man unterscheidet hier zunächst zwischen heuristischen und exakten Verfahren. Das exakte Verfahren garantiert, unter der gegebenen Berechnungsmethode (Parsimonie oder Maximum Likelihood), den wahrscheinlichsten bzw. kürzesten Stammbaum zu finden, weil alle Möglichkeiten berechnet werden. Dies ist allerdings nur für maximal 10-12 Taxa durchführbar, da sonst die Rechenkapazitäten gängiger PCs nicht ausreichen. Größere Artenzahlen werden mit heuristischen Verfahren berechnet. Hierbei wird zunächst durch schrittweises Hinzufügen jeweils eines Taxons (``stepwise addition``) an zunächst optimal erscheinende Stellen und anschließendes Variieren der einzelnen Äste (``branch swapping``) die kürzeste (Parsimonie) oder wahrscheinlichste (Maximum Likelihood) Topologie gesucht.

Die im Folgenden beschriebenen Methoden Maximum Parsimonie und Maximum Likelihood betrachten die Nukleotidpositionen als Einzelmerkmale und versuchen die Merkmalsänderungen in der Rekonstruktion des Stammbaums zu reflektieren.

Alle im Rahmen dieser Arbeit sequenzierten Gene und zusätzlich die in der Datenbank oder Literatur erhältlichen Daten werden zunächst gesondert und dann auch als kombinierte Datensätze phylogenetisch ausgewertet.

### 2.2.7.2 Parsimonie

Parsimonie Methoden waren die ersten, die zur Rekonstruktion von Phylogenese breitere Anwendung fanden. Ihnen liegt die Philosophie des sogenannten „Occam's razor“ -die größtmögliche Sparsamkeit zugrunde, d.h. es wird hier die generelle Vorstellung der Naturwissenschaft umgesetzt, zunächst die einfachere gegenüber einer komplizierteren Hypothese zu bevorzugen und *ad hoc* Hypothesen weitestgehend zu vermeiden (Swofford et al., 1996). Ziel der Maximum Parsimonie Methode in der Systematik ist es, das Cladogramm zu finden, welches die geringste Anzahl von Evolutionsschritten benötigt, um den beobachteten Datensatz zu erklären. Parsimonie Methoden berücksichtigen nur variable Positionen, sogenannte Parsimonie-informative Merkmale. Tritt in einer Position des Alignments nur ein bestimmtes Nukleotid oder Aminosäure auf, so ist dieses Merkmal nicht informativ. Wird in nur einem Taxon eine andere Merkmalsausprägung beobachtet, so ist diese Position ebenfalls nicht informativ. Treten hingegen in mehr als einem Taxon unterschiedliche Nukleotide (Aminosäuren) auf, so ist dieses Merkmal Parsimonie-informativ und wird durch die entsprechenden Algorithmen

rechnerisch erfasst. Je mehr allerdings eine Position variiert, desto stärker kann unter Umständen ihr Homoplasiegehalt sein und damit ein ungewolltes „verrauschen“ phylogenetischer Signale verursachen. Desweiteren können unterschiedliche Substitutionsereignisse (Transitionen *versus* Transversionen *versus* „gaps“) pro Position unterschiedlich gewichtet werden. Damit wird dem Umstand Rechnung getragen, dass in der Regel Transitionen häufiger vorkommen als Transversionen. Zusätzlich können „gaps“ als fünftes Merkmal mit in die Berechnung einfließen.

### 2.2.7.3 Maximum Likelihood

Die Idee, die den Maximum Likelihood Verfahren zugrunde liegen, beruht auf der Vermutung, dass Evolution auf der Ebene von DNA Molekülen ein stochastischer Prozess ist, d.h. es wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der eine gegebene Topologie durch einen Datensatz unter der Annahme eines Modells begründbar ist.

Unter einem gegebenen Modell, welches die Wahrscheinlichkeiten der beobachteten Ereignisse (Substitutionen) spezifiziert, kann der „likelihood“  $L$  für den gegebenen Datensatz berechnet werden als

$$L_{tree} = P(D | H),$$

wobei  $P(D | H)$  die Wahrscheinlichkeit ist, einen Datensatz  $D$  unter einer gegebenen Hypothese  $H$  zu beschreiben. Da der „likelihood“  $L$  sehr klein ist, wird der Wert als „log likelihood“, bzw. als natürlicher Logarithmus einer Wahrscheinlichkeit ( $\ln L$ ) ausgedrückt.

Die zugrunde liegenden Algorithmen zur Berechnung von Nukleotiddatensätzen wurden von Felsenstein (Felsenstein, 1973;1981) entwickelt.

Zwei gegebene Sequenzen (1 und 2) unterscheiden sich durchschnittlich um  $d$  Substitutionen pro Position. Diese Distanz  $d$  entspricht  $\mu t$ , wobei  $\mu$  die Mutationsrate ist und  $t$  die Zeit. Gegeben ist im Folgenden ein Substitutionsmodell (siehe unten), sodass für jede Position die Wahrscheinlichkeit  $P_{ij}(d)$  berechnet werden kann, dass diese beiden Sequenzen, separiert durch  $d$ , die Nukleotide  $i$  bzw.  $j$  aufweisen. Die Wahrscheinlichkeit ist nun der „likelihood“ der Substitution der betrachteten Position, der beiden Sequenzen (Taxa). Der „log likelihood“ die gegebenen Daten zu erklären, ist folglich die Summe der „log likelihoods“ jeder individuellen Position.

$$\ln L = \sum_{i=1}^k \ln L(i),$$

, wobei  $k$ = Anzahl der Merkmale und  $i$  = Position 1- $k$

Auch in diesem Fall werden in einer heuristischen Suche eine große Anzahl an ungewurzelten Topologien ermittelt.

Die Gesamttopologie, die mit höchster Wahrscheinlichkeit den gegebenen Datensatz unter dem angenommenen Modell erklärt, wird als Maximum Likelihood Baum präsentiert. Hier ist anzumerken, dass der „output“ ein gewurzeltes Dendrogramm darstellt. Die Wurzel wird Eingangs vom Benutzer

festgelegt, geht aber nicht als gegebene Forderung in die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten ein. Die Leserichtung ist daher als *a posteriori* Entscheidung anzusehen.

Besondere Bedeutung kommt der Wahl des Evolutionsmodells zu. Es dient der Schätzung der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Substitution. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl von Modellen entwickelt, die in immer differenzierterer Weise versuchen, den unterschiedlichen Substitutionsraten Rechnung zu tragen. Im Gegensatz zum einfachsten Jukes-Cantor-Modell (gleiche Mutationsrate von  $\alpha = 0,25$  für jedes Nukleotid) (Jukes & Cantor, 1969) bedienen sich alle weiteren Modelle der Annahmen, dass

1. die Häufigkeit der beobachteten Nukleotide in einem Alignment (Basenfrequenz) nicht gleich sein muß (z.B. sind tierische mitochondriale Genome sehr A/T reich) und daher für jedes Nukleotid im Durchschnitt ermittelt wird ( $\pi_i$ ) und
2. Transitionen und Transversionen unterschiedliche Substitutionsraten haben. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Transition  $\alpha$  (Purin  $\leftrightarrow$  Purin, Pyrimidin  $\leftrightarrow$  Pyrimidin) ist höher als die Wahrscheinlichkeit einer Transversion  $\beta$  (Purin  $\leftrightarrow$  Pyrimidin), andererseits hat eine Base nur eine Möglichkeit via Transition in ein anderes Nukleotid zu substituieren, dagegen kann sie aber via Transversion in zwei andere Basen substituieren. In den hier vorgestellten Analysen der Nukleotidsequenzen kommen folgende Modelle zum Einsatz:
  - HKY: Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa et al., 1985) mit zwei Parametern: Variable Basenfrequenz und Transitionen:Transversionen.
  - TN: Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) mit drei Substitutionstypen: Variable Basenfrequenz, Transitionen:Transversionen und Y:R-Transitionsparameter.

Optional kann jedes Modell mit der zusätzlichen Forderung der Variabilität eines Merkmals, abhängig von seiner Position, die sogenannte „rate heterogeneity“, versehen werden. Hierbei wird der Beobachtung Rechnung getragen, dass Nukleotide abhängig von ihrer Position unterschiedliche Evolutionsgeschwindigkeiten aufweisen. Diese Evolutionsraten können nach der Gamma Verteilung (Yang, 1993) spezifiziert werden.

Für die Maximum Likelihood Analysen werden alle Nukleotiddatensätze mit dem Programm TREE-PUZZLE Vers. 5.0 (Strimmer & von Haeseler, 1996; Schmidt et al., 1999-2000; 2002) berechnet. In einem ersten Schritt werden die Alignments jeweils unter den oben genannten Modellen einmal ohne Berücksichtigung und einmal mit Berücksichtigung der „rate heterogeneity“ im „fast approximate“ Modus berechnet. Für die genauen Berechnungen wird dann das Modell, das die höchste Wahrscheinlichkeit ergab, gewählt und erneut im „exact slow“ Modus berechnet. Die Option „list puzzling step trees“ wird aktiviert, um eine Liste aller gefundenen Topologien zu erhalten. Die Liste aller Topologien wird im weiteren mittels des Kishino-Hasegawa-Tests (Kishino & Hasegawa, 1989) getestet. Der „output“ dieses Tests stellt eine Liste dar, aus der die Topologie mit der höchsten Wahrscheinlichkeit erkennbar ist („best tree“), aber auch allen Topologien, die nicht signifikant schlechter sind als der „best tree“ („not significantly worse“) und die Topologien die das Signifikanzlevel von 5% nicht erreichen („significantly worse“). Sofern die Gesamtanzahl der

errechneten Topologien einen vertretbaren, d.h. im ``textfile`` überschaubaren Umfang aufweisen (bis zu 1000 Topologien) und die Anzahl der signifikant schlechteren Topologien mehr als 50% aller errechneten Möglichkeiten überschreitet, wird aus allen signifikant guten Topologien ein ``strict`` Consensusbaum (im Programm Phylip, Vers. 3.5c) generiert, der auch mittels prozentualer Angaben die Unterstützungen einzelner Verzweigungen angibt, die aus allen im Consensus repräsentierten Topologien ermittelt werden. Für die erzeugte Consensustopologie wird die Wahrscheinlichkeit und die entsprechenden Astlängen gesondert als ``user tree`` mit TREE-PUZZLE berechnet. Mit dieser Methode kann garantiert werden, dass der Consensusbaum aus allen wahrscheinlichsten Topologien resultiert. Anderenfalls würde in diesen Fällen bei einem durch TREE-PUZZLE automatisch generierten ``50% majority consensus tree`` ein gewisser Anteil an signifikant schlechteren Topologien repräsentiert sein. Die Anwendung dieser Methode erwies sich in einigen Fällen als adäquat, da weit weniger als 50% aller Topologien das Signifikanzlevel erreichten. Die Unterstützung der Dichotomien gibt die Prozentualität an, mit der diese Verzweigung in allen Topologien vertreten ist und wird im Folgenden mit „CML“ (Consensus ML) abgekürzt. Sofern die Anzahl der signifikant schlechteren Topologien unter 50% der Gesamtanzahl blieb, wurde der durch TREE-PUZZLE erzeugte ``50% majority rule consensus tree`` verwendet. Bei einer Gesamtanzahl von über 1000 zu testenden Topologien wird die nach dem entsprechenden Kishino-Hasegawa-Test als ``best tree`` ausgewiesene Topologie gezeigt.

Die Anzahl aller möglichen Quartet-Puzzle-Topologien errechnet sich durch

$$\binom{n}{4} = \frac{n!}{4!(n-4)!}, \text{ wobei } n = \text{Anzahl der Taxa}$$

wobei die obere Grenze der Gesamtopologien programmbedingt auf 10.000 Topologien limitiert ist.

#### 2.2.7.4 Alignmentmethoden

Streng genommen spiegelt ein Alignment in sich schon die Evolutionsgeschichte wieder und muß daher mit besonderer Sorgfalt aufgestellt werden.

Prinzipiell entspricht der Aufbau eines Alignments dem einer morphologischen Datenmatrix, wobei die einzelnen Nukleotide, bzw. Aminosäuren für die verschiedenen Spezies so untereinander geschrieben werden, dass die daraus resultierenden Nukleotid- (Aminosäure) Spalten als homolog zueinander hypothetisiert werden (Positionshomologie). Folglich ist jede Spalte (Position) eines Alignments ein Merkmal, die Art der Nukleotide (Aminosäuren) in dieser Position sind dagegen die unterschiedliche Ausprägungen des Merkmals. Während des Alignmentprozesses wird die Anzahl der übereinstimmenden Nukleotide (Aminosäuren) durch das Einfügen von Lücken (``gaps`` oder ``indels``) maximiert. Die biologische Bedeutung von ``gaps`` sind im Lauf der Evolution erfolgte Insertionen oder Deletionen. Das Einsetzen von ``gaps`` ist insbesondere bei ribosomalen Genen, die keinen ``reading frame`` aufweisen, im höchsten Maß hypothetisch. Um ein aussagekräftiges Alignment zu erhalten, können die Parameter (Maluspunkte) zur Eröffnung bzw. Verlängerung von ``gaps`` variiert werden.

Sofern ``gaps`` in den Alignments vorkommen, werden diese in den nachfolgenden phylogenetischen Rechenverfahren unterschiedlich bewertet. Hier ist zunächst anzumerken, dass Parsimonie Verfahren eine Wertung der ``gaps`` als fünftes Merkmal (bei Nukleotidalalignments) oder 21stes Merkmal (bei Aminosäurealignments) erlauben, Maximum Likelihood Verfahren werten ``gaps`` grundsätzlich nicht.

Zur Erstellung eines Alignments werden verschiedene Computerprogramme im Internet angeboten, die auf der Basis unterschiedlicher Algorithmen arbeiten. Die in dieser Arbeit verwendeten Programme sind Clustal X (Thompson et al., 1997b) und POY (Gladstein & Wheeler, 1996-2000). Darüberhinaus kommt für das ribosomale Gen (12S) ein drittes, visuell erstelltes Alignment zur Anwendung.

#### 2.2.7.4.1 Clustal X

Dieses sogenannte ``multiple alignment`` Verfahren (Thompson et al., 1997b) gehört zu den am weitesten genutzten Programmen, um homologe Sequenzen miteinander zu vergleichen.

Hierbei werden aus einem gegebenen Datensatz alle Sequenzen paarweise miteinander verglichen, und eine Distanzmatrix für den gegebenen Datensatz wird errechnet. Auf der Basis der Distanzmatrix wird ein, den multiplen Alignmentprozess initiiender, sogenannter ``guide tree`` erstellt. Im zweiten Schritt werden jeweils die Sequenzen miteinander aligned, die die geringsten Distanzen zueinander aufweisen. Von jedem paarweisen Alignment wird eine Consensussequenz generiert und anschließend die paarweisen Alignments bzw. deren Consensussequenzen, wieder auf der Basis der kleinsten Distanzen, zueinander aligned. Während des multiplen Alignmentprozesses werden, wo dies notwendig erscheint, ``gaps`` eingeführt.

Clustal X wird unter Verwendung der vorgegebenen Parameter (``default``) Optionen zur Erstellung von Alignments für die Gene 12S (im Vergleich zum POY Alignment), EF-1 $\alpha$  der Branchiopoda, cox1, 12S der Astacoidea und für die Vervollständigung des Arthropodendatensatzes (Aminosäuren) verwendet.

#### 2.2.7.4.2 POY

Das Programm POY ist im eigentlichen Sinn kein ``stand alone`` Alignmentprogramm, sondern verbindet Alignment mit der phylogenetischen Analyse in einem Schritt. Hierbei wird aus einem gegebenen Datensatz in einer heuristischen Suche eine Vielzahl möglicher Alignments generiert und anschließend in einer phylogenetischen Rekonstruktion nach dem Parsimonie Prinzip für jedes ermittelte Alignment eine Topologie erzeugt, für die dann schließlich die benötigte Anzahl der Substitutionen (Schritte) berechnet wird. Dieser Vorgang wird so häufig wiederholt, bis das Alignment und die dazugehörige Topologie mit der kürzesten Schrittzahl festgestellt ist. Somit wird ein konsequenter Weg der gewählten Parameter garantiert, von der Erzeugung eines Alignments bis zur phylogenetischen Rekonstruktion (Phillips et al., 2000). Insbesondere für die Analyse nicht-proteincodierender Gene, bei denen das Einfügen von ``indels``(=**I**nser**I**on/**D**e**L**etion) die

Positionshomologie der benachbarten Nukleotide enorm beeinflussen, findet das Programm breite Zustimmung. Ein großer Nachteil ist, dass die Analyse eine enorm hohe Rechenzeit benötigt.

#### 2.2.7.5 Testverfahren bezüglich der Zuverlässigkeit einzelner Topologien

Um Qualität und Stabilität der Cladogramme, insbesondere einzelner Monophyliehypothesen, zu testen, bieten sich mittlerweile eine große Anzahl verschiedener Testmöglichkeiten an, von denen hier eine kleine Auswahl zum Einsatz kommen.

##### 2.2.7.5.1 ``Bootstrap`` Analyse

Dieser Test wurde für alle Parsimonie Cladogramme angewendet. Die ``bootstrap`` Analyse (Felsenstein, 1985) besteht aus einer Generierung von zufällig veränderten Datensätzen (Replikaten). Die Änderung des ursprünglichen Datensatzes erfolgt in der zufälligen Löschung einzelner Merkmale und gleichzeitiger Verdopplung anderer Merkmale im Alignment. Für jedes auf diese Weise generierte Alignment (i.d.R. 1000 Replikate) wird die optimale Topologie berechnet. Aus allen Topologien wird im zweiten Schritt ein Consensusbaum berechnet, der an jedem Monophylum die prozentuale Unterstützung ausweist, also die Häufigkeit mit der dieses Monophylum in allen artifiziellen Datensätzen vorkommt. Sofern im Text erwähnt, werden die ``bootstrap`` Werte mit „BA“ abgekürzt.

##### 2.2.7.5.2 ``Decay`` Index oder Bremer ``support``

Die Berechnung des Bremer ``supports`` (Bremer, 1994) ist eine indirekte Überprüfung, durch wieviele Apomorphien ein Monophylum gestützt wird (Wägele, 2000) und wird hier als Alternative oder parallel zum ``bootstrap`` Verfahren angewendet. Der Bremer Index gibt für jedes Monophylum eines Cladogramms an, wieviele Schritte notwendig sind, um eine Schwestergruppenbeziehung zu Fall zu bringen. Die angegebenen Werte sind ganze Zahlen von 1 -  $\infty$  (abhängig von der Anzahl der Apomorphien in einer Schwestergruppenbeziehung). Im Text wird der ``decay`` Index mit „DI“ abgekürzt. Zur Berechnung der ``decay`` Indices wird das Programm NONA genutzt.

##### 2.2.7.5.3 ``Quartet- Puzzling- support`` (TREE-PUZZLE)

Dieser Test ist im Programm TREE-PUZZLE Vers. 5.0 implementiert und wird für die ML Analysen der beiden 12S Alignments für alle Branchiopoda, sowie die der Astacoidea angewendet. Der ``Quartet-Puzzling-support``, im folgenden ``QP-support`` genannt, ist der ``bootstrap`` Analyse insofern ähnlich, als das für jedes Monophylum eine prozentuale Unterstützung errechnet wird. Dieser Wert ermittelt sich allerdings nicht aus der artifiziellen Änderung des Datensatzes (s. o. ``bootstrap`` Analyse), sondern beschreibt die Häufigkeit der gefundenen Monophyla während des Quartet-

Puzzling -Prozesses unter dem ``50% majority rule consensus`` (Margush & McMorris, 1981). Dieser ``QP-support`` wird anschließend auf die dargestellten besten ML Stammbäume (Branchiopoda) bzw. ``50% majority rule consensus`` Dendrogramme der Astacoidea übertragen.

#### 2.2.7.5.4 Sensitivitätsanalyse (POY)

Mittels einer Sensitivitätsanalyse (Wheeler, 1995) (``gap X`` oder ``molecularmatrix Y``) wird der 12S rDNA-Datensatz unter verschiedenen Gewichtungannahmen berechnet (Transitionen: Transversionen: Indels = 1:1:1, 1:1:2, 1:2:2, 1:2:4, 1:1:10). Auf diese Weise können Aussagen über die Robustheit einzelner Monophylien in der Gesamttopologie gemacht werden. Das Schema 1:1:2 gilt hierbei als die für Arthropoda favorisierte Gewichtung (Wheeler, 1995;Whiting et al., 1997).

#### 2.2.7.5.5 Kishino-Hasegawa-Test

Durch dieses Testverfahrens ist es möglich, verschiedene Hypothesen (Topologien) bezüglich ihrer Signifikanz zu überprüfen. Es erlaubt eine Bewertung von unterschiedlichen Cladogrammen bzw. Dendrogrammen auf der Basis des 5% Signifikanzlevels. Der K-H-Test (Kishino & Hasegawa, 1989) kommt in zweifacher Hinsicht zum Einsatz, einerseits bei der Ermittlung der wahrscheinlichsten und aller nicht signifikant schlechteren Topologien nach einer Quartet-Puzzle-Analyse (wie oben beschrieben) andererseits für eine Hypothesenbewertung der Topologien aus den Parsimonie und ML Analysen. Dabei werden von jeweils beiden Hypothesen die ``log likelihood`` Werte unter den Parametern der zugrundegelegten Modelle verglichen, d.h. beide Hypothesen werden bezüglich ihrer Signifikanz in den Wahrscheinlichkeitswerten gegeneinander getestet.

#### 2.2.7.5.6 ``Likelihood mapping``

Das ``likelihood mapping`` (Strimmer & von Haeseler, 1997) (implementiert im Programm TREE-PUZZLE, Vers. 5) ist eine graphische Methode, die die phylogenetische Information eines Datensatzes *a priori* visualisiert und einen ersten Eindruck über die Qualität der zu erwartenden phylogenetischen Analyse vermittelt. Die Methode basiert auf der Wahrscheinlichkeitsberechnung aller möglichen Quartet-Topologien. Jede Topologie wird mittels eines Punktes in einem Dreieck dargestellt, wobei die Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer Topologie durch die Lage im Dreieck bestimmt wird. Die drei Eckpunktregionen repräsentieren die Situation, in der eine Topologie über die beiden anderen klar favorisiert werden kann. Punkte im Bereich der Seitenkanten repräsentieren die Situationen, in denen nicht eindeutig eine Topologie favorisiert wird. Das Zentrum umfasst die Menge der Topologien, die nicht aufgelöst sind (``star-like``). Das heißt, je stärker sich die Punktwolken in den Eckpunkten des Dreiecks konzentrieren, desto größer ist das phylogenetische Signal des Datensatzes.

Das "likelihood-mapping" kann auch zur Überprüfung von Hypothesen herangezogen werden (Strimmer & von Haeseler, 1997). Zu diesem Zweck werden verschiedene Spezies des Alignments in einem Cluster zusammengefasst und einem oder mehreren anderen zu definierenden Clustern gegenübergestellt (maximal vier Cluster). Jedes Cluster wird somit als Monophylum behandelt. Nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben, werden die Beziehungen dieser Cluster (Monophyla) zueinander in einem Dreieck dargestellt, wobei jede Ecke eine Hypothese bezüglich der wahrscheinlichen Schwestergruppenbeziehungen der maximal vier Cluster darstellt.

Beide Methoden des "likelihood mappings" finden für die Datensätzen der Astacoidea Anwendung.

## 2.2.8 Die 12S Datensätze der Branchiopoda und Astacida

### 2.2.8.1 Branchiopoda

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Alignments des 12S rRNA Datensatzes für die Parsimonie Analysen und Maximum Likelihood Analysen der Branchiopoda erstellt. Ein Alignment folgt hierbei strikt dem Parsimonie Prinzip und wird mit dem Programm POY berechnet, ein weiteres Alignment wird visuell anhand der Sekundärstruktur erstellt (siehe auch Kapitel: 3.1.2.5), wobei die "loop"-Bereiche (sofern in Länge zwischen den Taxa unterschiedlich) mit Clustal X ("default") aligned werden.

Für die POY Analyse wird der 12S Datensatz zunächst in drei sinnvolle Teile geteilt, wobei jeder Teilbereich mit einer "stem"-Hälfte beginnt und endet. Die drei Teildatensätze werden im ersten Schritt getrennt voneinander aligned, jeweils die kürzeste Schrittzahl benötigend und im zweiten Schritt zusammengesetzt.

Der erste Datensatz umfasst die "stem"-Hälften 27', 22' und 31', der zweite Datensatz erstreckt sich von "stem" 32 bis 33' und der letzte Datensatz von "stem" 48 bis 32' (Abbildung 5). Es sei an dieser Stelle deutlich darauf hingewiesen, dass die Analyse der Sekundärstruktur für diese Berechnung nur zur sinnvollen Teilung des Datensatzes herangezogen wird. Die Berechnung der drei Datensätze erfolgt nicht auf der Basis der sich innerhalb der Datensätze befindlichen Sekundärstrukturen.

Die POY Analysen werden mittels der Kommandokaskade „maxtrees 10, fitchtrees, checkslop 10, multibuild 10, treefuse, buildmaxtrees 5, treefuse, random 100, stopat 5 und minstop 3“ durchgeführt. Aus den so ermittelten, gleich sparsamen Cladogrammen wird das "strict consensus" Cladogramm mit der favorisierten Gewichtung 1:1:2 ermittelt (jack2hen.exe) errechnet. "Decay" Indices (Bremer, 1994) werden mit dem Programm PHAST kalkuliert: „hold X, sub Y, find, bs“. Anschließend wird noch eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt, um die Stabilität einzelner Verzweigungen unter anderen Gewichtungen zu überprüfen (siehe Kapitel: 2.2.7.5.4).

#### 2.2.8.2 Astacida

Der 12S rRNA Datensatz der Astacida wird mit dem Programm Clustal X (``default``) aligned und visuell bezüglich der korrekten Positionshomologien anhand der Sekundärstruktur der dritten Domäne überprüft.

#### 2.2.9 Erstellung der Nukleotidalignments der proteincodierenden Gene der Branchiopoda und Astacida

Die proteinkodierenden Bereiche der Gene EF-1 $\alpha$  der Branchiopoda und cox1 der Astacida werden ohne Ambiguitäten aligned, insofern stellt sich hier die Frage nach dem „richtigen“ Alignment nicht. Es wird das Programm Clustal X unter ``default`` Optionen angewendet. Während der Datenerhebung offenbarte sich die Existenz kleiner hochvariabler Introns im Gen EF-1 $\alpha$  der Branchiopoda. Eine Homologisierung der Intronsequenzen lässt sich allerdings nicht rechtfertigen, daher werden die Intronsequenzen vor der Erstellung des Alignments entfernt.

### 3 Einzelstudien

Die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen werden mehrteilig unter unterschiedlichen Aspekten dargestellt. Die beiden Hauptabschnitte präsentieren die Resultate der phylogenetischen Untersuchungen der Phyllopoda (Branchiopoda) und der Astacoidea (Astacida) mit jeweils einer Einleitung zur Organismengruppe, den dazugehörigen Analysen und einer Diskussion. Die Analysen sind jeweils unterteilt in die computerkladistischen Einzelanalysen der Gene und den Analysen der kombinierten Datensätzen. Alle Analysen werden unter Parsimonie und Maximum Likelihood Kriterien und im Fall der Phyllopoda mit verschiedenen Alignmentmethoden dargestellt. Im Abschnitt Phyllopoda werden zusätzlich die Resultate der Sekundärstrukturanalyse der 12S rRNA beschrieben und ein auf dieser Basis erstelltes Alignment mit der anschließenden computerkladistischen Auswertung den anderen Ergebnissen gegenübergestellt. Die im Gen EF-1 $\alpha$  existierenden Introns werden bezüglich ihrer Position gesondert betrachtet.

#### 3.1 TEIL A: Die Branchiopoda

##### 3.1.1 Einleitung - Historie der Hypothesenbildung

Die Branchiopoda, auch Blattfußkrebse genannt, sind mit ca. 800 beschriebenen Arten weltweit verbreitet. Das bislang älteste bekannte Fossil, *Rehbachella kinnekullensis* (Anostraca), das in den südschwedischen Fundschichten "Orsten" entdeckt wurde, wird auf das Obere Kambrium vor ca. 500 Millionen Jahren datiert (Walossek, 1993).

Das Taxon Branchiopoda vereinigt in der traditionellen Classifikation vier rezente Gruppen: Die Anostraca (Feenkrebse), Notostraca (Rückenschaler), Conchostraca (Muschelschaler) und Cladocera (Wasserflöhe). Sie sind vermutlich marinen Ursprungs, die meisten Vertreter sind aber schon vor langer Zeit ins Süßwasser ausgewichen. Dieser Habitatwechsel wurde wahrscheinlich durch räuberische Fische ausgelöst (Kerfoot & Lynch, 1987). Seitdem leben einige Gruppen der Branchiopoda, wie Anostraca, Notostraca und Conchostraca, in temporären Süßgewässern wie z.B. Tümpel und Laken. Diese sehr instabilen Habitate, die durch periodisches Austrocknen oder Ausfrieren gekennzeichnet sind, erfordern ein hohes Maß an Anpassung an z.B. Temperaturtoleranz oder auch wechselnden Sauerstoffgehalt. So können beispielsweise die Eier von *Triops cancriformis* (Notostraca) mehrere Jahrzehnte im Trockenschlamm „überleben“. Bei erneut eintreffenden günstigen Bedingungen wie Regen und Temperaturoptima, beginnt die Entwicklung der Embryonen, sodass mit dem Schlüpfen der Larven ein neuer Lebenszyklus beginnt. Die meisten Arten der Cladocera (Wasserflöhe) leben dagegen in permanenten Süßgewässern, einige Vertreter sogar in marinen Gewässern.

Branchiopoda ernähren sich durch Filtration von z.B. Detritus oder Algen aus dem freien Wasser. Einige Vertreter der Cladocera leben räuberisch (z.B. *Bythotrephes* oder *Leptodora*).

Schon bei oberflächlicher Betrachtung der Morphologie unterscheiden sich die einzelnen Branchiopoden-Taxa erheblich voneinander. So haben die Notostraca einen schildförmigen, platten Carapax, während die Conchostraca und Cladocera einen zweiklappigen oder muschelförmigen Carapax besitzen. Die Conchostraca werden durch ihren Carapax fast vollständig umhüllt, während der Carapax bei den Cladocera den Rumpf umschließt oder sehr stark reduziert ist und häufig als Brutbeutel fungiert. Die Anostraca besitzen keinen Carapax, wobei nicht geklärt ist, ob der Carapax nie angelegt war oder ob es sich um eine völlige sekundäre Reduktion handelt. Laut (Ax, 1999) bestehen keine Indizien für eine sekundäre Reduktion, sodass man das Fehlen eines Carapax (wie auch bei den Cephalocarida) als plesiomorph bewerten müsse. Innerhalb der einzelnen Branchiopoden-Taxa, ausgenommen bei den Cladocera, ist die Morphologie sehr konserviert. So gleichen z.B. die rezenten Arten der Notostraca und Conchostraca weitestgehend den fossilen Funden aus dem Silur (Walossek, 1993). Auch die rezenten Anostraca verfügen über einen sehr konservierten Phänotyp. Morphologisch unterscheiden sie sich allerdings erheblich von den Phyllopoda, da sie keinen Carapax besitzen. Das ausgestorbene Taxon *Rehbachella kinnekullensis*, welches einen Carapax aufweist, wird von Walossek (Walossek, 1995) allerdings als Vertreter der Stammlinie der Anostraca gewertet. Insofern muss das Fehlen eines Carapax bei den Anostraca als sekundärer Verlust gewertet werden.

Im Gegensatz zu allen anderen Hauptgruppen der Branchiopoda erfahren die Vertreter der Cladocera eine enorme morphologische Vielfalt, was die Bewertung der verwandtschaftlichen Verhältnisse der Taxa zueinander in der Vergangenheit sehr erschwerte.

### *Phylogenie*

Die Branchiopoda werden von den meisten Autoren als monophyletisch anerkannt, was auf morphologischen (Wingstrand, 1978;Walossek, 1995;Negrea et al., 1999) und auch jüngeren molekularen Analysen (Spears & Abele, 2000) beruht (Abbildung 1 A). Es sei jedoch erwähnt, dass von (Ax, 1999) eine entgegengesetzte Auffassung vertreten wird: In seinem Buch „Das System der Metazoa, Band 2“ werden die Branchiopoda als paraphyletisch gewertet, mit den Anostraca gegenüber den verbleibenden Phyllopoda. Die Phyllopoda bilden, laut Ax, ein Schwestergruppenverhältnis mit den Malacostraca (Abbildung 1 B). Auch Preuss wies schon 1951 darauf hin (Preuss, 1951), dass die Branchiopoda häufig nur aufgrund plesiomorpher Merkmale als geschlossene Abstammungsgemeinschaft beschrieben wurden - ein Vorgehen, das nach phylogenetischer Methode unzulässig ist.

Heutige phylogenetische Rekonstruktionen innerhalb der Branchiopoda gehen auf das von Calman (1909) aufgestellte System zurück . Dieses System gruppiert die branchiopoden Crustacea in vier Ordnungen: Die Anostraca, Notostraca, Conchostraca und die Cladocera. Notostraca, Conchostraca und Cladocera werden zu dem gut begründeten Monophylum Phyllopoda zusammengefaßt (Olesen, 1998) und den Anostraca als Schwestergruppe gegenübergestellt (Walossek, 1995). Als Apomorphie

der Phyllopoda gelten z.B. die versenkten, eng zusammen stehenden Komplexaugen in der Mitte der Kopfoberfläche; im Gegensatz dazu haben die Anostraca gestielte Komplexaugen.

Über die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Phyllopoda entstanden in den letzten Jahrzehnten kontroverse Diskussionen. Die wesentlichen hier im Folgenden beschriebenen Diskussionspunkte sind in Abbildung 1 C-D dargestellt. Als Schwerpunkte sind hier die traditionell als Monophyla angesehenen Conchostraca und Cladocera zu nennen: Obwohl einige Autoren auf die enormen Unterschiede innerhalb der Conchostraca (Laevicaudata und Spinicaudata) hinweisen (Linder, 1945;), werden beide Subtaxa traditionell zu den Conchostraca vereinigt. Die Taxa Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda und Onychopoda werden in der traditionellen Sichtweise zum Monophylum Cladocera zusammengefaßt. Da aber innerhalb der Cladocera eine enorme Diversität besteht, bekamen auch die Teiltaxa Anomopoda, Ctenopoda, Onychopoda und Haplopoda von Fryer (Fryer, 1987b) den Status von Ordnungen. Nach Fryers eingehender Analyse aller Branchiopoden Teiltaxa (Fryer, 1987a) wurden von ihm 10 Ordnungen benannt, phylogenetische Beziehungen der einzelnen Taxa zueinander bezeichnet er jedoch nicht.

1. Anostraca
2. Lipostraca (†)<sup>1</sup>
3. Notostraca
4. Kazacharthra (†)<sup>1</sup>
5. Spinicaudata
6. Laevicaudata
7. Anomopoda
8. Ctenopoda
9. Onychopoda
10. Haplopoda

Walossek (1993;1995) beschreibt zwei Hauptlinien innerhalb der Phyllopoda: Die Calmanostraca (das Taxon vereinigt die Notostraca und die ausgestorbenen Kazacharthra) und die Onychura (Conchostraca und Cladocera) als Schwestergruppe zu den Calmanostraca. Mit diesem System folgt er einer schon durch Gerstaecker (1866-1979) formulierten Idee, dass Conchostraca und Cladocera zusammen ein Monophylum bilden. Gerstaecker fasst beide Gruppen als Diplostraca zusammen; der von Walossek verwendete Begriff „Onychura“ wird erstmals 1934 von Eriksson (1934) eingeführt. Onychura und Diplostraca werden als Synonyme verwendet.

---

<sup>1</sup> Die als ausgestorben geltenden Taxa Lipostraca und Kazacharthra werden hier der Vollständigkeit wegen erwähnt. Die Lipostraca bilden die Schwestergruppe zu den rezenten Anostraca, während die Kazacharthra die Schwestergruppe zu den Notostraca bilden. In der hier vorliegenden Analyse und Stammbaumrekonstruktionen werden ausschließlich rezente Arten analysiert.

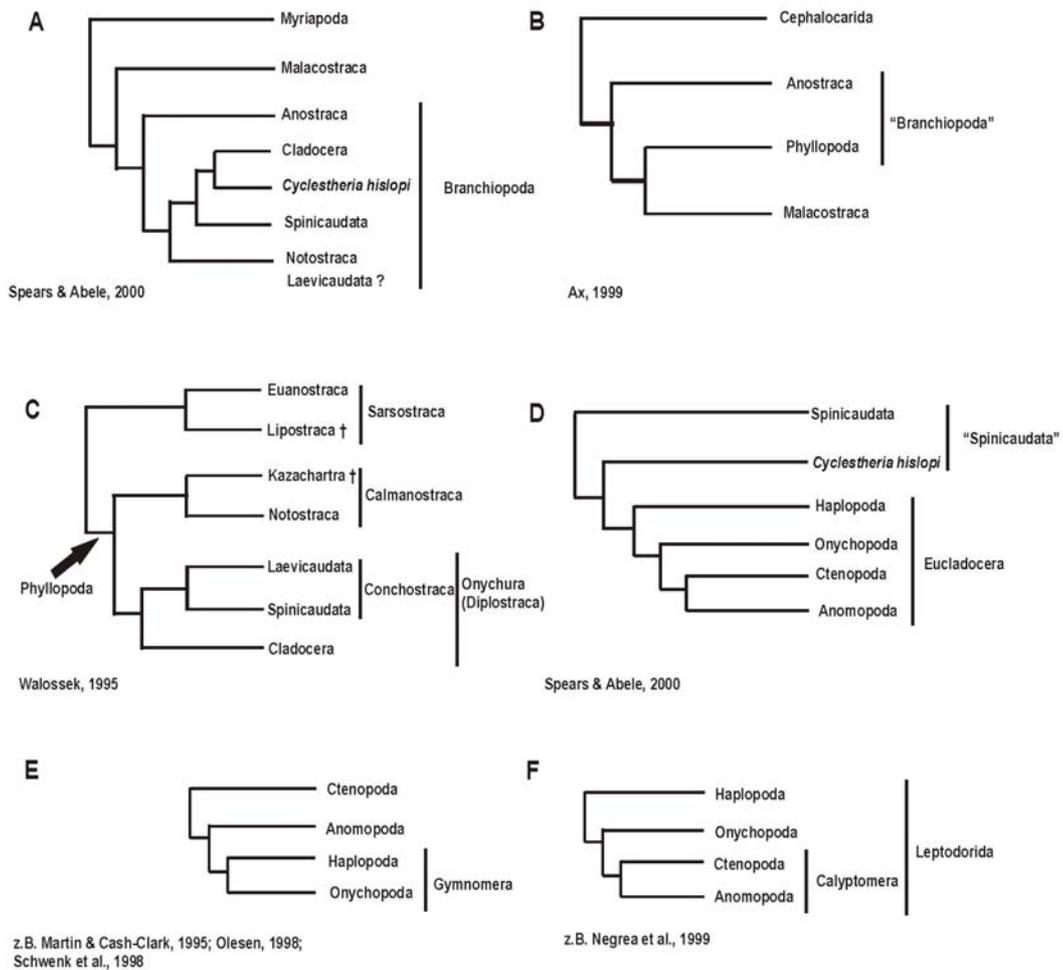


Abbildung 1: Hypothesen über die Verwandtschaftsbeziehungen der Branchiopoda und innerhalb der Phyllopoda (Branchiopoda). (A) Hypothese der Monophylie der Branchiopoda auf der Basis von 18S rDNA Daten (Spears & Abele, 2000). (B) Hypothese der Paraphylie der Branchiopoda nach (Ax, 1999). (C) Verwandtschaftliche Beziehungen innerhalb der Phyllopoda unter Einbeziehungen fossiler Daten nach Walossek (1995). (D) Die Paraphylie der Spinicaudata; 18S rDNA Daten (Spears & Abele, 2000). (E und F) Gegensätzliche Hypothesen der Beziehungen innerhalb der Cladocera bezüglich der Stellung der Haplopoda, (E) das Gymnomera- Konzept und (F) das Leptodorida- Konzept (Negrea et al., 1999). Das Leptodorida- Konzept entspricht bezüglich der Namensgebung dem Eucladocera- Konzept (Spears & Abele, 2000).

Hervorgerufen durch die unklaren Beziehungen der Laevicaudata und Spinicaudata (Conchostraca), (Martin & Cash-Clark, 1995; Olesen et al., 1996) und der vier Teiltaxa der Cladocera (Schminke, 1996) innerhalb der Phyllopoda, wurde auch das Monophylum „Diplostraca“ immer wieder hinterfragt. Durch molekulare Analysen der 18S rDNA (Spears & Abele, 2000) und der 18S rRNA Sekundärstruktur der V4 und V7 Regionen (Crease & Taylor, 1998) wird eine Paraphylie der Conchostraca unterstützt. Demnach sind die Spinicaudata paraphyletisch, da *Cyclestheria hislopi* (einziger rezenter Vertreter der Cyclestheriidae und traditionell zu den Spinicaudata gehörig) Schwestertaxon zu den Cladoceren ist. Konsequenterweise muß *Cyclestheria hislopi* daher aus den verbleibenden Spinicaudata ausgeschlossen werden; das Monophylum Spinicaudata würde damit zerfallen (Abbildung 1D). Dieses

Konzept wird auch von Ax (1999) favorisiert, der *Cyclestheria hislopi* und die Cladoceren als monophyletisch begründet und den Namen Cladoceromorpha vorschlägt. Die Cladoceromorpha werden den verbleibenden Spinicaudata als Schwestergruppe gegenübergestellt.

Die Stellung der Laevicaudata innerhalb der Phyllozoa ist ungewiss. Fryer (1987a) deutet zwar einerseits auf die oberflächlich betrachtete Ähnlichkeit der Laevicaudata und der Spinicaudata hin und spricht damit insbesondere den zweiklappigen Carapax an, der die Tiere fast oder vollständig umhüllt, wertet aber die meisten in der Literatur angeführten potentiellen Apomorphien, die für ein Schwestergruppenverhältnis der Laevicaudata zu den Spinicaudata sprechen, als Konvergenzen. Botnariuc (1947) wies auf die ähnlichen Strukturen des ersten Rumpfbeinpaars bei den Männchen beider Taxa hin. Dieses Beinpaar fungiert als Greiforgan während der Kopulation. Er betont allerdings die unterschiedliche Entwicklung dieses Greiforgans und bewertet es deshalb als konvergent. Im Gegensatz dazu steht wiederum die unterschiedliche Anordnung der Antennenmuskulatur bei Laevicaudata und Spinicaudata. Die Anordnung der Muskulatur der Laevicaudata weist gewisse Ähnlichkeiten zu der Anordnung in den Cladocera auf (Fryer, 1987a). Einer morphologischen Analyse zufolge kamen Negrea et al. (1999) zu dem Resultat, dass die Laevicaudata Schwestergruppe zu den Spinicaudata (ohne *Cyclestheria hislopi*) sind. Molekulare Analysen der 18S rDNA zur Stellung der Laevicaudata sind wiederum ohne Auflösung (Spears & Abele, 2000).

Schon (1876) wurde von Claus die Hypothese aufgestellt, dass die Cladocera möglicherweise durch Neotenie aus verschiedenen Conchostraca Linien hervorgegangen sein könnten. Die Konsequenz wäre, dass die Conchostraca paraphyletisch und die Cladocera polyphyletisch sind (Schminke, 1981;1996). Bezogen auf die Cladocera betont Fryer (1987b) die immensen morphologischen Unterschiede zwischen den vier Gruppen Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda und Onychopoda und kommt zu dem Ergebnis, dass die Cladocera keine geschlossene taxonomische Einheit bilden. Martin und Cash-Clark (1995) hingegen postulieren die Monophyly der Cladocera und nehmen an, dass die Stammart ein cyclestheriiden-artiger Vorfahre war. Die Annahme der Monophylie der Cladocera wird auch durch neue morphologische und molekulare Analysen gestützt (Olesen, 1998;Negrea et al., 1999;Olesen, 2000;Spears & Abele, 2000).

Die Schwestergruppenbeziehungen innerhalb der Cladocera werden seit einigen Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Mordukhai-Boltovskoi (1968) ging sogar soweit, anzunehmen, die Subtaxa Onychopoda und Haplopoda seien möglicherweise keine Branchiopoda. Die Annahme begründet sich auf das Fehlen der typischen blattartigen Thoracopoden mit Epipoditen, die als Atmungsorgane fungieren. Diese Hypothese ist jedoch eine Ausnahme. Im allgemeinen ist akzeptiert, dass die Subtaxa Anomopoda, Ctenopoda, Haplopoda und Onychopoda dem Taxon Branchiopoda angehören. So wird einerseits durch morphologische und molekulare Daten die Hypothese gestützt, dass Onychopoda und Haplopoda Schwestergruppen sind (Abbildung 1 E), die zusammen als Gymnomera bezeichnet werden (Olesen, 1998;Schwenk et al., 1998;Taylor et al., 1999;Richter et al., 2001;Braband et al., 2002), andererseits werden die Haplopoda den verbleibenden drei Subtaxa als Schwestergruppe gegenüber gestellt und als Eucladocera zusammengefaßt (Eriksson, 1934;Wingstrand, 1978;Bowman & Abele, 1982;Spears & Abele, 2000) bzw. als Leptodorida bezeichnet (Negrea et al., 1999) (Abbildung 1D und F). Letztere Hypothese stützt sich auf den

Entwicklungsmodus der Haplopoda (*Leptodora kindtii* ist die einzig bekannte, rezente Art des Taxons) mit frei schwimmenden Larven *versus* der direkten Entwicklung der anderen Cladoceren.

Die Anomopoda und Ctenopoda werden als zweite Entwicklungslinie diskutiert und bilden nach den Ergebnissen von Negrea et al. (1999) ein Schwestergruppenverhältnis (Calyptomera). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden von Martin und Cash-Clark (1995), die eine basale Stellung der Ctenopoda innerhalb der Cladocera favorisieren. DNA-Daten der mitochondrial codierten großen ribosomalen Untereinheit (16S) unterstützen letztere Hypothese (Schwenk et al., 1998).

Die hier nur im Ansatz beschriebene Historie von Hypothesenbildungen zur Phylogenie der Branchiopoda und der dazugehörenden Gruppen ist in Abbildung 1 zusammenfassend dargestellt. Die Klärung der Stellung der Laevicaudata und Spinicaudata im System der Phyllopoda und deren Beziehung zu den Cladocera betrifft im erheblichen Maß die Existenz eines Monophylums Diplostraca (Spinicaudata + Laevicaudata + Cladocera), schließt aber zunächst nicht die Monophyla der einzelnen Teiltaxa mit ein.

Desweiteren sind die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Cladocera nach wie vor ungeklärt. Dies betrifft die beiden kontroversen Hypothesen der Eucladocera (Leptodorida) und das Gymnomera Konzept.

Folgende Fragestellungen bezüglich der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Phyllopoda werden anhand des mitochondrialen Gens 12S rRNA, des kerncodierten Gens EF-1 $\alpha$  nebst seiner Intronpositionen und einer Analyse der Sekundärstruktur der 3. Domäne der kleinen ribosomalen Untereinheit betrachtet:

1. Die Wahl der Aussengruppe zur Klärung der verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Phyllopoda.
2. Sind die vier Haupttaxa innerhalb der Phyllopoda, die Notostraca, Laevicaudata, Spinicaudata, Cladocera, monophyletisch?
3. Welche Hypothese bezüglich der verwandtschaftlichen Beziehungen der Haupttaxa zueinander kann durch die Datensätze favorisiert werden? Das heißt im Einzelnen:
  - Kann ein Taxon Diplostraca (Spinicaudata, Laevicaudata, Cladocera) durch die Daten gestützt werden?
  - Sind die Conchostraca (Laevicaudata + Spinicaudata) monophyletisch?
  - Welche phylogenetische Stellung nimmt *Cyclestheria hislopi* innerhalb der Phyllopoda ein?
  - Sind die Cladoceromorpha (*C. hislopi* + Cladocera) monophyletisch und damit die Spinicaudata im traditionellen Sinn (incl. *C. hislopi*) paraphyletisch?
  - Sind die drei Taxa der Cladocera (Anomopoda, Ctenopoda und Onychopoda) monophyletisch?

- Welche Beziehungen innerhalb der Cladocera, insbesondere bezüglich der Stellung der Haplopoda (Eucladocera/Leptodorida- respektive Gymnomera- Konzept), werden durch die Daten gestützt?

### 3.1.2 Ergebnisse

#### 3.1.2.1 Die Frage der Außengruppe für die Phyllopoda (Branchiopoda)

Um einen Beitrag zur Klärung der Probleme innerhalb der Phyllopoda zu leisten, ist zunächst die Frage nach der Außengruppenwahl zu stellen. Dies betrifft ganz entscheidend die Frage, ob die Branchiopoda (Anostraca und Phyllopoda) monophyletisch sind bzw. in welcher Beziehung die Anostraca zum gut begründeten Monophylum der Phyllopoda stehen. Da das hier verwendete Gen 12S rRNA sehr variable Regionen aufweist, sollte die Außengruppe in recht naher Verwandtschaft zu den Phyllopoda stehen. Zur Klärung wird hier ein Cladogramm auf der Basis von 12 Aminosäuresequenzen des mitochondrialen Genoms gezeigt. Als Basis wird ein Alignment (Hwang et al., 2001) aus der EBI Datenbank (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/embl/align>) genutzt und mit den Aminosäuresequenzen der Proteine ND6, ND5, ND4, ND4L, ND3, ND2, ND1, cytb, cox I, cox II, cox III und ATP 6 für folgende Arten mit dem Alignmentprogramm Clustal X ergänzt:

- *Narceus annularus* (Myriapoda; Diplopoda), (Lavrov et al., 2002), (NC003343)
- *Thyropygus* sp. (Myriapoda; Diplopoda), (Lavrov et al., 2002), (NC003344)
- *Tetodontophora bielanensis* (Collembola), (Nardi et al., 2001), (NC002735)
- *Platynereis dumerilii* (Annelida; Polychaeta), (Boore & Brown, 2000), (NC000931)
- *Panulirus japonicus* (Crustacea; Malacostraca), (Yamauchi et al., 2002), (NC004251)
- *Tigriopus japonicus* (Crustacea; Maxillopoda), (Machida et al., 2002), (NC003979)
- *Triops cancriformis* (Branchiopoda; Phyllopoda), (Umetsu et al., 2002), (NC004465)

Abbildung 2 zeigt eine Gegenüberstellung der Maximum Likelihood Analyse (‘‘strict’’ consensus‘‘, siehe auch Kapitel: 2.2.7.3) und der Parsimonie Analyse der mitochondrialen Proteinsequenzen. Für die Maximum Likelihood Berechnung wurde das Modell mtRev24+ $\Gamma$ 4 (Adachi & Hasegawa, 1996) verwendet. Diese Berechnungsgrundlage, sowie die Wahl der Außengruppen folgt den Angaben der Autoren (Hwang et al., 2001). Die Parsimonie Analyse (‘‘heuristic search, TBR branch swapping‘‘) ohne Gewichtung einzelner Merkmale resultierte in einem kürzesten Baum mit einer Schrittlänge von 12077. Die ‘‘bootstrap’’ Analyse wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt.

Bezüglich der Branchiopoda sind beide Analysen inkongruent. Die ML Analyse (Abbildung 2A) zeigt mit hoher Unterstützung eine Paraphylie der Branchiopoda mit dem Maxillopoden *Tigriopus japonicus* als Schwesterguppe zu den Anostraca (vertreten durch *Artemia franciscana*), die Parsimonie Analyse (Abbildung 2B) favorisiert dagegen ein Monophylum Branchiopoda, allerdings nur mäßig unterstützt.

Dennoch geht aus den Analysen eine nähere Verwandtschaft der Anostraca und Phyllopoda zueinander hervor, als zu den Malacostraca, die von Ax (1999) als Schwestergruppe der Phyllopoda hypothetisiert werden. Darüber hinaus zeigen beide Analysen die Paraphylie der Crustacea. Dies soll allerdings in dem hier gezeigten Rahmen nicht näher diskutiert werden.

In Abbildung 3 wird die phylogenetische Analyse des Gens EF-1 $\alpha$  dargestellt. Die Wahl der Außengruppe richtete sich für diese Berechnung nach der Verfügbarkeit von Daten in der Genbank. Es wurde jeweils an *Limulus polyphemus* (Chelicerata, U90051, Regier & Shultz, 1997) und *Scutigera coleoptrata* (Myriapoda, AF251763-67, Carapelli et al., 2000) gewurzelt. Der Maxillopode *Eurytemora affinis* (Copepoda, AF063408, Regier & Shultz, 1998) wurde bezüglich seiner möglichen näheren verwandtschaftlichen Beziehungen zu den Branchiopoda, bzw. *Artemia* spec. (Anostraca) mit in die Berechnungen aufgenommen. Die ML Analyse (Abbildung 3A) wurde mit dem Modell TN+I $\Gamma$ 8 durchgeführt. Die Grundlage für die Parsimonie Berechnung (Abbildung 3B) sind: ``heuristic search``, ``TBR branch swapping`` mit einer ``bootstrap`` Analyse von 1000 Replikaten.

Sowohl die Parsimonie- als auch die Maximum Likelihood Analyse weisen die Branchiopoda als Monophylum aus. Die Unterstützung ist allerdings mit knapp über 50 % in beiden Analysen als relativ gering anzusehen. Die Phyllopoda werden dagegen in beiden Analysen gut unterstützt (QP 76 % und BA 96 %), sodass von einer Monophylie der Phyllopoda ausgegangen werden kann.

Die Analyse der mitochondrialen Proteinsequenzen und die des Gens EF 1- $\alpha$  zeigen übereinstimmend eine nähere Verwandtschaft der Anostraca zu den Phyllopoda. Die Monophylie der Branchiopoda findet nur geringe Unterstützung, wird allerdings ebenfalls von mehreren morphologischen (Wingstrand, 1978;Walossek, 1993;1995) und auch molekularen Studien (Regier & Shultz, 1997;Giribet & Ribera, 2000;Spears & Abele, 2000;Giribet et al., 2001) einheitlich unterstützt. Für alle weiteren phylogenetischen Analysen bieten sich als Außengruppe daher die Anostraca an.

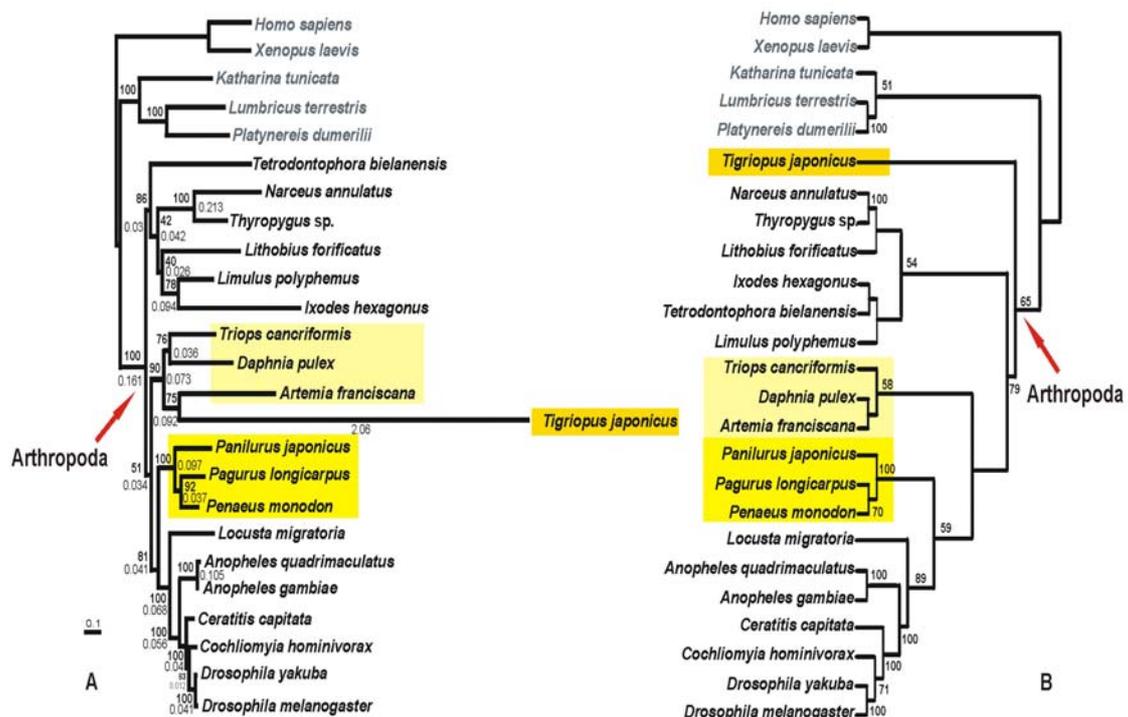


Abbildung 2: Phylogenetische Analyse der Arthropoda eines kombinierten Datensatzes, bestehend aus 12 Aminosäuresequenzen mitochondrialer Proteine zur Wahl einer geeigneten Aussengruppe für die Phyllopoda (Branchiopoda). Die Alignmentlänge beträgt 2560 Merkmale. (A) "Strict consensus" Dendrogramm aus 212 Quartet-Puzzle-Topologien (Maximum Likelihood) mit einer Wahrscheinlichkeit von  $\log L. -61583.46$ . Zugrundegelegtes Modell: mtREV24+ $\Gamma$ 4. Es wurden insgesamt 632 Topologien getestet, davon waren 211 Topologien nicht signifikant schlechter als der "best ML" ( $\log L. -61527.90$ ). Astlängen und "likelihood" vom "strict consensus" Dendrogramm wurden als "user tree" berechnet. Der Consensus wurde mit dem Programm Phylip Vers. 3.5c generiert. Die Unterstützung der Dichotomien beziehen sich auf die Anzahl der in den 212 Topologien gefundenen Splits (in %). (B) "Most parsimonious" Cladogramm mit 12077 Schritten (Paup Vers. 4). Es wurde keine Gewichtung der Positionen vorgenommen. Die "bootstrap" Analyse (1000 Replikate) wurde separat durchgeführt und ist an den entsprechenden Dichotomien vermerkt (>50%). Farbliche Markierungen der Crustacea- Taxa: Branchiopoda (hellgelb), Malacostraca (mittelgelb) und Maxillopoda (dunkelgelb). Die Außengruppen (grau) sind *H. sapiens*, *X. laevis* (beide Deuterostomia), *K. tunicata* (Mollusca), *L. terrestris* und *P. dumerilii* (Annelida).

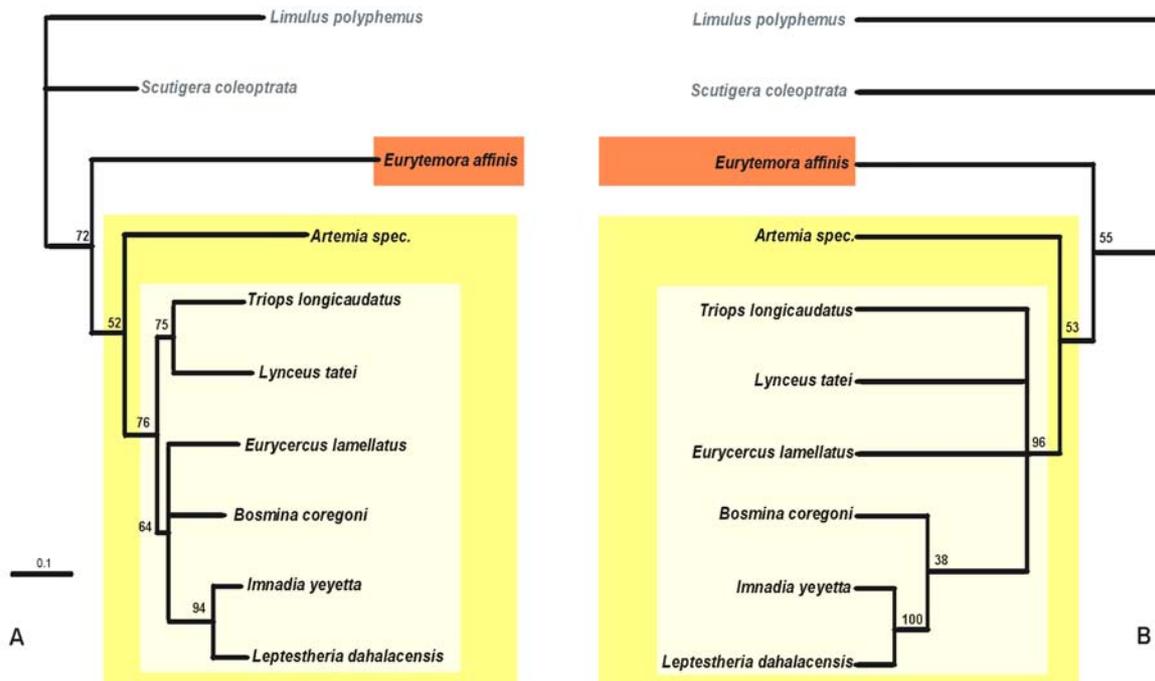


Abbildung 3: Phylogenetische Analyse des Gens EF-1 $\alpha$  einiger Branchiopoda- Spezies und aus der Datenbank verfügbarer Außengruppen zur weiteren Eingrenzung einer geeigneten Außengruppe bezüglich der Anostraca und oder Maxillopoda. Das Alignment umfasst 942 Nukleotidpositionen. (A) Quartet- Puzzle- Dendrogramm (``50% majority rule``) mit einer Wahrscheinlichkeit von  $\log L. -5450.00$  unter dem Modell  $TN+\Gamma 8$ . Der ``QP-support`` (>50%) ist an den Dichotomien angegeben. (B) ``Strict consensus`` Cladogramm von 2 gleich sparsamen Topologien mit je 1047 Schritten. Es wurde keine Gewichtung der 304 Parsimonie- informativen Positionen vorgenommen. Die ``bootstrap`` Berechnung (1000 Replikate) wurde separat durchgeführt und sind ebenfalls vermerkt. Verwendete Programme für die Parsimonie Analyse: Nona, Winclada. Farbliche Markierungen: Maxillopoda *E. affinis* (rot), Branchiopoda (gelb), Phyllopoda (hellgelb). Außengruppen: *L. polyphemus* (Chelicerata) und *S. coleoptrata* (Myriapoda).

### 3.1.2.2 Die phylogenetische Analyse der Phyllopoda mit der Außen- gruppe Anostraca

Trotz der universell einsetzbaren PCR-Primer kam es in einigen Fällen vor, dass die gewünschten Genbereiche in nur so geringer Menge amplifiziert werden konnten, dass auch eine Aufkonzentration der PCR nicht ausreichend gewesen wäre, um das Produkt direkt zu sequenzieren. In diesen seltenen Fällen erwies sich eine Klonierung als sinnvoll. Es wurden folgende Produkte kloniert: 12S von *Leptodora*, *Ceriodaphnia*, *Evadne* und *Polyphemus*.

Insgesamt sind für die Branchiopoda 35 Taxa (12S rDNA) sequenziert. Der Datensatz umfasst 41 Taxa (inclusive weiterer sechs Taxa aus der Literatur, (Hanner & Fugate, 1997)).

### 3.1.2.3 Die Wahl eines zuverlässigen Alignments für die 12S Analyse (ohne Berücksichtigung der Sekundärstruktur)

Der erste Schritt zur Durchführung einer phylogenetischen Analyse mit DNA- Daten ist die Erstellung eines Alignments, d.h. einer Datenmatrix basierend auf den erhobenen Sequenzdaten. Diese Matrix ist Ausgangspunkt für eine Vielzahl von unterschiedlichen computercladistischen Methoden bzw. Rechenalgorithmen wie z.B. Maximum Parsimonie oder Maximum Likelihood. Die Ergebnisse dieser Berechnungen ermöglichen, am Ende eine Aussage über das phylogenetische Signal eines gewählten Genabschnittes zur Bearbeitung eines Taxons zu treffen und die phylogenetischen Beziehungen innerhalb dieses Taxons zu evaluieren.

Um einen besseren Einblick über beide Alignmentverfahren (Clustal X und POY) zu erhalten, wurde die Auswirkung beider Alignments auf die ``likelihood`` Werte unter dem Modell TN+  $\Gamma$ 8 und auch der Schrittzahl unter Parsimonie Kriterien (NONA) zuvor getestet und miteinander verglichen. Das Ergebnis dieses Vergleichs rechtfertigte die Verwendung des unter Parsimonie Kriterien maximierten Alignments (1:1:2) für die Maximum Likelihood Analysen. Dieser etwas ungewöhnliche Weg wurde gewählt, um die Vergleichbarkeit der einzelnen Topologien zu gewährleisten.

Tabelle 4 zeigt eine Gegenüberstellung eines in POY generierten Alignments mit einem entsprechenden Alignment des Programms Clustal X (unter ``default`` Optionen). Beide Alignments wurden als Basis für eine Parsimonie- und eine Maximum Likelihood Analyse berechnet.

Für eine effizientere Nutzung von POY wurde der 12S Datensatz in drei Teile geteilt (Giribet, 2001). Die Teilung des Datensatzes wurde auf der Basis der ribosomalen Sekundärstruktur vorgenommen, d.h. jeder Datensatz beginnt und endet mit verhältnismäßig konservierten ``stem``-Bereichen. Um diese ``stem``-Regionen zu definieren wurden Informationen des Sekundärstrukturmodells für *Artemia franciscana* (Van de Peer et al., 2000) aus der Antwerpener RNA Datenbank (<http://oberon.fvms.ugent.be>) hinzugezogen. Obwohl die 12S der Branchiopoda fast vollständig sequenziert wurde, wurden nur ~380 bp phylogenetisch analysiert. Diese Sequenzen repräsentieren hauptsächlich die dritte Domäne (s. auch Abbildung 5). Eine Zuordnung der Sequenzen der ersten und zweiten Domäne zu charakteristischen ``stems`` und ``loops`` des Modells war nicht möglich.

Tabelle 4: Gegenüberstellung eines Clustal X (``default``-Optionen)- und eines POY Alignments (1:1:1) des 12S Datensatzes der Branchiopoda. Die phylogenetischen Berechnungen wurden mit den Programmen Nona (Parsimonie) und TREE-PUZZLE (ML) durchgeführt.

Methode	Anzahl der Merkmale	Parsimonie-informative Merkmale	Anzahl der Schritte kürzeste Topologie	Log likelihood Modell: TN+Γ8
Clustal X	410	280	2025	- 8011.51
POY	466	281	1863	- 7778.04

Die Gesamtlänge der Alignments unterscheidet sich in beiden Fällen um 56 Positionen. Das ergibt sich durch Insertionen 56 zusätzlicher ``gaps`` in POY. Demgegenüber ist aber zu bemerken, dass die Anzahl der Parsimonie-informativen Merkmale nahezu gleich bleiben (280 zu 281). Erwartungsgemäß resultierte die Parsimonie Analyse des POY Alignments in einem kürzesten Baum mit deutlich weniger Schritten, als das unter Zugrundelegung des Clustal X Alignments der Fall war. Interessanterweise ergibt das POY Alignment auch unter Maximum Likelihood Kriterien ein signifikant wahrscheinlicheres Dendrogramm als das Clustal X Alignment. Wegen dieser wesentlich höheren Wahrscheinlichkeit liegt auch dem dargestellten Dendrogramm, welches unter Maximum Likelihood Kriterien errechnet wurde, das 12S Alignment des Programmes POY zugrunde.

### 3.1.2.4 Die 12S rDNA Analyse

In Abbildung 4 ist die beste Maximum Likelihood Analyse (A) und das strikte Consensus-Cladogramm der Parsimonie Analyse (B) von 35 Phyllopoda Taxa und 6 Anostraca Spezies als Aussengruppe dargestellt. Zur Berechnung der ML Topologie wurde das Modell TN+Γ8 zugrundegelegt. Die beste ML Analyse wurde mittels des Kishino-Hasegawa-Tests aus 10.000 intermediären ``Quartet-Puzzling-steps`` (QP) ermittelt (siehe Kapitel: 2.2.7.5.3) und hat eine Wahrscheinlichkeit von  $\log L -7778.04$ . Die Unterstützung der einzelnen Äste wird als ``QP-support`` gezeigt und ermittelte sich aus den zuvor errechneten QP-Schritten. Es wurden nur die Werte  $\geq 50\%$  angegeben.

Für die Parsimonie Analyse wurde das favorisierte Gewichtungsschema (1:1:2) genutzt und resultierte in drei gleich sparsamen ``most parsimonious trees`` mit jeweils 2126 Schritten. Abbildung 4B zeigt den strikten Consensusbaum. Die Unterstützungen der Dichotomien wird einerseits mit ``decay`` Indices belegt, andererseits befinden sich für die jeweiligen Gewichtungsschemen der Sensitivitätsanalyse Symbole an den Verzweigungen (siehe Kapitel: 2.2.7.5.4).

Die Ergebnisse beider Analysen sind im wesentlichen kongruent bezüglich der Monophyla der Phyllopodenhaupttaxa. Die Monophyla der Notostraca, Laevicaudata und Spinicaudata (exclusive *Cyclestheria hislopi*) werden in der Maximum Likelihood Analyse (``QP-support`` für Spinicaudata ohne *C. hislopi* 67 %, Notostraca 80 % und Laevicaudata 96 %), sowie mit den meisten Gewichtungen der Sensitivitätsanalyse in der Parsimonie Analyse unterstützt (``decay`` Index für Matrix 1:1:2 = 11 für Spinicaudata, exclusive *C. hislopi*, 22 für Notostraca und 20 für Laevicaudata). Eine sichere

Monophylie der Cladocera wird durch keine der beiden Analysen unterstützt, wohl aber der Cladoceromorpha (Cladocera + *Cyclestheria hislopi*). Auch dieses Monophylum wird mit einem hohen ``decay`` Index (11) belegt. Eine nähere Verwandtschaft von *C. hislopi* und den Spinicaudata, wie es das traditionelle Spinicaudata Konzept fordert, findet weder in der ML Analyse noch in irgendeiner Sensitivitätsanalyse unter Parsimonie Kriterien Unterstützung. Ein Schwestergruppenverhältnis der Spinicaudata (ohne *C. hislopi*) und den Cladoceromorpha wird dagegen in beiden Analysen unterstützt, wobei der ``decay`` Index mit 11 recht hoch ist, der ``QP-support`` allerdings unter 50 % liegt. Die Astlängen der Phyllopora (0,392), Laevicaudata (0,294), Notostraca (0,199) und auch Cladoceromorpha (0,223) in der ML Analyse zeigen im Gegensatz zu den Längen innerhalb der Cladoceromorpha (0,137-0,004) und der Spinicaudata (0,050) eine relativ hohe Anzahl an Substitutionen pro Zeiteinheit.

Die Abstammung der Laevicaudata ist in beiden Analysen inkongruent. Die ML Analyse zeigt ein nicht signifikantes Schwestergruppenverhältnis (< 50%) von Laevicaudata und Notostraca. Dieses Ergebnis wurde, ebenfalls nur gering unterstützt, auch in einigen Analysen der 18S rDNA erzielt (Spears & Abele, 2000). Die direkte Optimierung der Parsimonie Analyse (POY) favorisiert dagegen unter drei verschiedenen Gewichtungsschemen eine basale Stellung der Laevicaudata als Schwestergruppe zu allen übrigen Phyllopora. Die Parsimonie Analyse unter der Gewichtung 1:2:2 unterstützt, ebenso wie die ML Analyse, das Schwestergruppenverhältnis zwischen Notostraca und Laevicaudata (Parsimonie Cladogramm hier nicht gezeigt). In keiner der Analysen konnte jedoch ein Schwestergruppenverhältnis der Laevicaudata zu den Spinicaudata (Walossek, 1995), und Cladocera bzw. Cladoceromorpha gezeigt werden. Somit kann anhand der mitochondrialen 12S rDNA Analyse ein Monophylum der Diplostraca (Laevicaudata + Spinicaudata + Cladocera, respektive Cladoceromorpha) nicht unterstützt werden.

Für die wesentlichen hier zu erörternden Fragen der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Cladoceren-Taxa zeigen beide Analyseverfahren kongruente Ergebnisse. Die Ctenopoda und auch die Onychopoda werden sowohl in der ML Analyse, als auch in allen fünf Gewichtungsschemata übereinstimmend als Monophylum gezeigt. Eine Monophylie der Anomopoda wird dagegen nicht unterstützt. In dieser Studie erscheinen sie paraphyletisch. Dies betrifft auch das verwandtschaftliche Verhältnis von *Cyclestheria hislopi* zu den Cladocera. Beide Berechnungen unterstützen das Cladoceromorpha-Konzept, wonach *Cyclestheria hislopi* in näherer Verwandtschaft zu den Cladocera steht als zu den verbleibenden Spinicaudata. Die Cyclestheriidae haben allerdings ein Schwestergruppenverhältnis zu den Chydoridae (*Eurycercus lamellatus* und *Pseudochydorus globosus*). Dieses Resultat zeigt sich in der ML Analyse und in der Parsimonie Analyse mit der favorisierten Gewichtung 1:1:2. Es sei jedoch erwähnt, dass durch die Gewichtungen 1:2:2 und 1:2:4 eine Schwestergruppenbeziehung von *Cyclestheria hislopi* zu den in diesen Fällen monophyletischen Cladoceren unterstützt wird. Die inkongruenten Ergebnisse der Sensitivitätsanalyse zeigen zumindest, dass eine Monophylie der Cladocera anhand dieses Datensatzes nicht gezeigt werden kann. Die Resultate bezüglich der Stellung von *Leptodora kindtii* innerhalb der Cladocera (Gymnomera- versus Eucladocera-Konzept) zeigen übereinstimmend die Monophylie der Gymnomera mit einem Schwestergruppenverhältnis von *L. kindtii* zu den Onychopoda. Das Verhältnis wird durch zwei

Gewichtungen, und mit einem DI von 2 in der Parsimonie Analyse und <50% (QP) in der ML Analyse allerdings nur schwach bzw. nicht signifikant unterstützt. In diesem Zusammenhang erscheint es interessant zu erwähnen, dass die Ctenopoda als Schwestertaxon zu den Gymnomera in beiden Analysen favorisiert werden, in der Parsimonie Analyse sogar mit relativ hoher Unterstützung (drei Gewichtungen, DI 7). Morphologische Analysen unterstützen eher eine basale Stellung der Ctenopoda als Schwestergruppe zu den Anomopoda + Gymnomera (Martin & Cash-Clark, 1995). Innerhalb der Anomopoda, die hier nicht als monophyletisch gezeigt werden, ist das Monophylum Daphniidae in der Parsimonie Analyse gut unterstützt (vier Gewichtungen, DI 7).

Innerhalb der Spinicaudata werden die drei Familien (Leptestheriidae, Cyzicidae, Limnadiidae) in der Parsimonie Analyse als Monophyla ausgewiesen. Keine Unterstützung finden die Cyzicidae in der ML Analyse. Hier erscheint *Eocyclus* spec. als Schwestertaxon zu den Limnadiidae. Auch die Stellung der Leptestheriidae als Schwestertaxon zu den Cyzicidae und Limnadiidae (vier Gewichtungen, DI 5) findet keine Unterstützung in der ML Analyse. Dieses Ergebnis ist unter dem Gesichtspunkt der unterschiedlichen Analyseformen (Parsimonie und Maximum Likelihood) bemerkenswert, da ein offensichtlich gut unterstütztes Schwestergruppenverhältnis (Leptestheriidae (Cyzicidae, Limnadiidae)) in der Parsimonie Analyse keine Kongruenz in der ML Analyse findet.

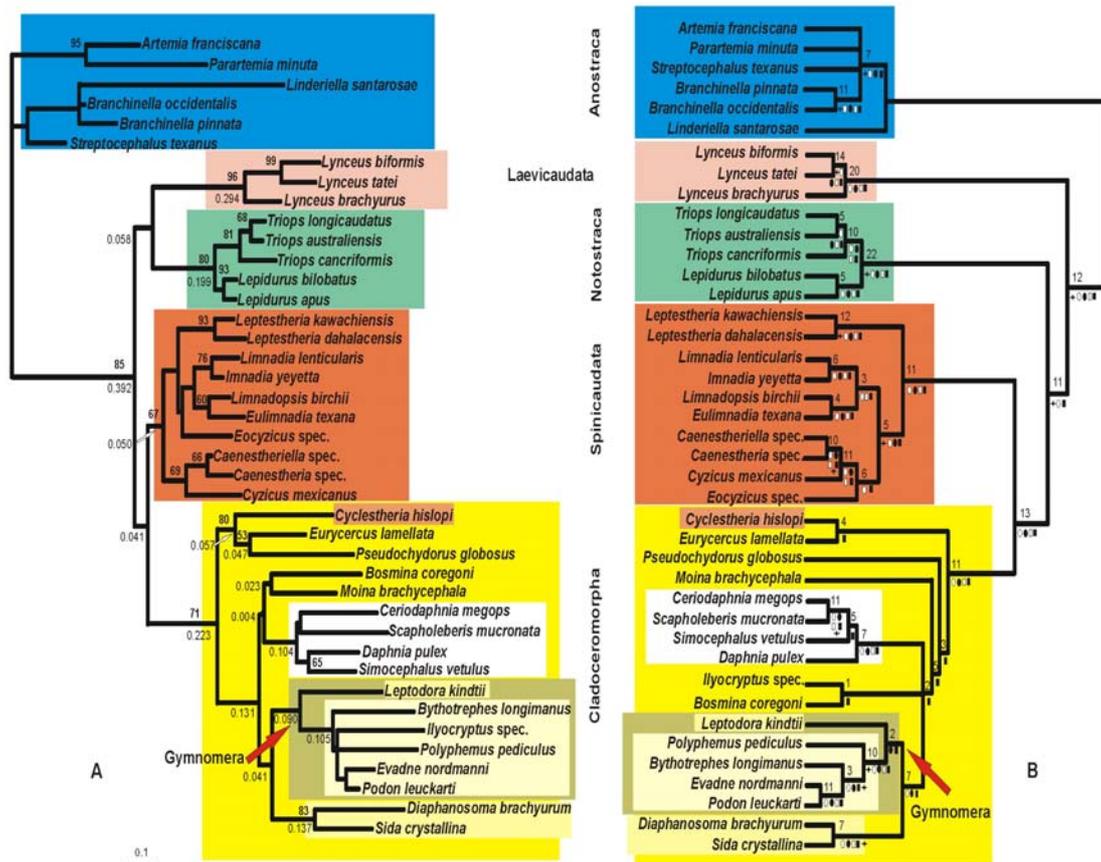


Abbildung 4: Phylogenetische Analyse der dritten Domäne (und partiell der 2. Domäne) der mitochondrialen 12S rDNA der Phyllozoa (Außengruppe: Anostraca). Das zugrundeliegende Alignment wurde mit dem Programm POY erzeugt und weist eine Länge von 465 Positionen auf. (A) "Best" Maximum Likelihood Dendrogramm ( $\log L. = -7778.04$ ), ermittelt aus 10.000 Quartet- Puzzle- Topologien (s.o. Text) unter dem Modell TN $\Gamma$ 8. Die Astlängen beziehen sich auf den gezeigten Stammbaum, der "QP-support" (>50%) bezieht sich auf die Consensustopologie mit einem  $\log L. = -7931.91$  (hier nicht gezeigt). (B) Parsimonie Analyse. Gezeigt ist das strikte Consensuscladogramm aus drei gleich sparsamen Topologien á 2126 Schritten unter dem Gewichtungsschema Transition:Transversion:"gap" (1:1:2). "Gaps" wurden als fünftes Merkmal gewichtet. Oberhalb der Dichotomien wird der "decay" Index gezeigt, unterhalb das Ergebnis der Unterstüzung unter fünf verschiedenen Gewichtungsschemata der Sensitivitätsanalyse: ■1:1:2, □1:1:1, ●1:2:2, ○1:2:4, ★1:1:10. Programme: POY (Parsimonie), jack2hen.exe (Consensus), PHAST ("decay" Indices). Farbliche Markierung innerhalb der Cladoceromorpha (gelb) : Daphniidae (weiß), Gymnomera (grün), Onychopoda (hellgelb).

### 3.1.2.5 Die Analyse der Sekundärstruktur der 3. Domäne der mitochondrialen 12S rRNA

Die meisten rRNA Alignments, die die strukturellen Komponenten einer ribosomalen RNA berücksichtigen, basieren auf einem comparativen Ansatz jeder einzelnen Sequenz mit einem (oder mehreren) Modell(en).

Das in Abbildung 5 dargestellte Modell der 12S rRNA von *Artemia franciscana* (X69067) wird als Grundlage für die weiteren Betrachtungen der dritten Domäne und partiell der zweiten Domäne (beide grau) der 12S rRNA der Branchiopoda verwendet. Auf diese Weise konnten die konservierten Helixregionen für die ``stems`` 31, 32, 33, 34, 35, 36 und 38 relativ leicht identifiziert werden. Schwieriger stellte es sich allerdings für die in Abbildung 5 in den gelb markierten Bereichen zu findenden ``stems`` 39-42 und ``stems`` 45-48 dar. Die Bereiche um die ``stems`` 39 bis 40 und 45 bis 48 weisen in ihrer primären RNA-Struktur wenig Ähnlichkeiten zu dem vorgegebenen Modell auf (siehe unten).

Für ``stem`` 27 liegen die Sequenzdaten nicht vollständig vor, dennoch konnte aufgrund einer recht hohen Konservierung das Ende der ``stem``-Hälfte 27, sowie der Beginn der korrespondierenden ``stem``-Hälfte 27 festgelegt werden.

Um die potentiellen Nukleotidhomologien der Bereiche 39-42 und 45-48 für ein entsprechendes Alignment zu erkennen, wurde für die Regionen das vorgeschlagene Modell von Hickson et al. (1996) verwendet. Ausschnitte des Modells sind ebenfalls in Abbildung 5 in generalisierter Form dargestellt. Das Modell weicht in den fraglichen Bereichen leicht vom Vorschlag der Antwerpener Datenbank (De Rijk et al., 2000) ab und wurde aufgrund größerer Übereinstimmung mit dem Datensatz der Branchiopoda übernommen. Für einige Vertreter aller Haupttaxa der Branchiopoda sind die Bereiche von ``stem`` 38 bis 42 und 45 bis 48 (Abbildung 6) schematisch dargestellt.

Alle folgend beschriebenen Sequenzmotive sind in den Abbildung 5 und Abbildung 6 rot bzw. grün dargestellt. Im Text beschriebene Ambiguitäten (z.B. „R“) richten sich nach dem IUPAC- IUB ``ambiguity set`` Code und verweisen darauf, dass diese Positionen innerhalb der Metazoa zwischen – im genannten Beispiel - zwei Basen (A/G) variabel sind. Kleine Buchstaben bezeichnen einen Konservierungsgrad von 78% innerhalb aller von Hickson et al. (1996) untersuchten Metazoa.

Die dritte Domäne beginnt unmittelbar nach dem unpaaren Bereich stromabwärts der ``stem``-Hälfte 31' mit ``stem`` 32, der bei allen Branchiopoda in der angenommenen Form gefunden werden kann. Das Motiv „GRCGG“ (R=G/A) der ``stem``-Hälfte 32 wird auch hier, wie in allen zuvor untersuchten Metazoa (Hickson et al., 1996) realisiert. ``Stem`` 33 ist ebenfalls mit einer Länge von fünf Basenpaaren konserviert und verfügt über eine signifikante GU-Basenpaarung, die 100%-ig in allen weiteren untersuchten Branchiopoda vorkommen. Zwei der sogenannten ``non Watson-Crick`` (GU) Basenpaarungen werden auch im folgenden ``stem`` 34 als nicht variabel innerhalb der Branchiopoda beobachtet. Ein nicht paarendes Adenin in der ``stem``-Hälfte 34', wie bei *Artemia* beobachtet wird, kann für die Branchiopoda für nur fünf Taxa bestätigt werden. In den meisten Fällen wird hier ein Guanosinrest beobachtet. ``Stem`` 35 ist zwei Basenpaare lang, wobei das zweite Basenpaar (GC)

sowohl bei den Branchiopoda als auch bei allen übrigen untersuchten Metazoa nicht variabel ist (Hickson et al., 1996). Das dem ``stem`` 35 unmittelbar vorangehende konservierte Nukleotid Adenin wurde in den Branchiopoda in nur zwei Taxa (*Artemia* und *Leptodora*) gefunden und ist in allen anderen Fällen durch Uracil ersetzt. Für gewöhnlich wird ``stem`` 36 als sieben Basenpaare lange Helix dargestellt, unmittelbar nach einem konservierten Adeninrest des vorangehenden unpaaren ``loop``-Bereiches. Dies kann i.a. für die Branchiopoda bezüglich der Länge der Helix bestätigt werden. Das konservierte Adenin wird allerdings nur in 78% aller untersuchten Branchiopoda beobachtet. ``Stem`` 38 beginnt nach einem konservierten Adeninrest, welcher auch innerhalb der Branchiopoda in 93% der Fälle gefunden wird. Nukleotide, die an der Bildung des ``stem`` 38 beteiligt sind, gehören zu den am stärksten konservierten Nukleotiden der dritten Domäne, können aber wie in Abbildung 5 (Vergleich des Ausschnittmodells mit der Struktur von *Artemia*) auf unterschiedliche Weise miteinander paaren. Die Nukleotidfolge „URURUA“ wird in allen untersuchten Metazoa als sehr konserviert beobachtet und wird in beiden hier gezeigten Modellen von van de Peer et al. (1994), Gutell et al. (1994) und Hickson et al. (1996) in gleicher Weise bezüglich der Paarung mit der ``stem``-Hälfte 38' hypothetisiert. Dieser ``stem``-Bereich beinhaltet einen asymmetrischen ``bulge loop`` „UA“ und kann für die hier untersuchten Branchiopoda bestätigt werden (Ausnahme: *Pseudochydorus* und *Eurycercus*). Ein großer Unterschied in ``stem`` 38 zwischen dem Modell von van de Peer et al. (1994), Gutell et al. (1994) und dem hier angewendeten Modell (Hickson et al., 1996) besteht in dem Postulat eines wahrscheinlicheren symmetrischen, sechs Basen umfassenden ``bulge loops`` „rcc|yA“ (y=C/T) gegenüber einem asymmetrischen (CAA). Ein symmetrischer ``bulge loop`` in diesem Bereich wirkt sich thermodynamisch wesentlich günstiger auf die Stabilität des ``stems`` aus (Hickson et al., 1996). Ausschlaggebend ist hierfür das proximal gelegene Motiv „rcc“. Insbesondere bei einigen Insekten (z.B. *Cicada*, *Odonata*) findet sich hier häufig statt eines Purins („r“) ein Uracil (Pyrimidin). Dieses Uracil würde bei einer Paarung nach Gutell und van de Peer in einem höchst ungewöhnlichen vier Basen umfassenden ``bulge`` im distalen Bereich resultieren (Hickson et al., 1996). Im Datensatz der Branchiopoda wurde ebenfalls ein Uracil statt eines Purins in 27% aller untersuchten Spezies gefunden. Es wird daher für die Branchiopoda hier ebenfalls ein symmetrischer ``bulge loop`` angenommen. Das Motiv „yA“, meist in Form eines „CAA“, ist in jedem Fall innerhalb aller untersuchten Metazoa konserviert und verhält sich immer unpaar zur ``stem``-Hälfte 38.

Während van de Peer ``stem`` 39 als zwei basenpaarigen ``stem`` beschreibt, besteht dieser ``stem`` nach Hickson et al. (1996) und Gutell (1994) für gewöhnlich aus sechs Nukleotidpaarungen und folgt unmittelbar auf ein konserviertes Adenin. Sowohl der Adeninrest (100% bei Branchiopoda), als auch die postulierten Nukleotidpaarungen „ry“ und „yr“ können bei den Branchiopoda gefunden werden, allerdings weicht die Nukleotidkomposition in der ``stem``-Hälfte 39' an diesen Positionen häufig ab. ``Stem``-Hälfte 40 („yyy“) folgt ohne unpaaren Bereich im Modell nach Hickson et al. (Hickson et al., 1996) sofort auf ``stem``-Hälfte 39 und ist zu 88% bei den Branchiopoda zu finden (Ausnahme: Anostraca mit „urr“). ``Stem``-Hälfte 40' mit dem Motiv „rrr“ kommt in den Branchiopoda zu 76% vor. Die ``stem``-Hälften 40' und 39' sind i.d.R. durch ein Nukleotid voneinander getrennt, wobei hier eine Insertion von einem oder mehreren Nukleotiden innerhalb der Metazoa beobachtet wird und für die Spezies *Simocephalus* innerhalb der Branchiopoda bestätigt werden kann. Die ``hairpin``-Struktur des ``stems`` 42 wird als drei bis vier basenpaarige hochvariable Helix mit dem in der dritten Domäne

am stärksten variierenden ``loop``- Bereich beschrieben. Die hohe Variabilität des ``hairpins`` wird auch in den Branchiopoda sichtbar, wobei ``stem`` 42 i.d.R. aus vier Paarungen besteht und der ``loop`` dagegen durch einige Insertionen charakterisiert ist. Der unpaare Bereich zwischen ``stem`` 42 und ``stem`` 38 verfügt innerhalb der Branchiopoda ebenfalls über das durch Hickson et al. (1996) postulierte Motiv „AryYA“. Helices 45 und 47 sind ebenfalls hochvariabel, können allerdings durch das Vorkommen stark konservierter Motive innerhalb der unpaaren ``loop``-Bereiche bei den Branchiopoda postuliert werden. So folgt ``stem`` 45 (vermutlich drei Nukleotidpaarungen innerhalb der Branchiopoda) unmittelbar dem Motiv „UACAnU“, wobei das letzte Uracil in der ersten Basenpaarung der Helix involviert ist.

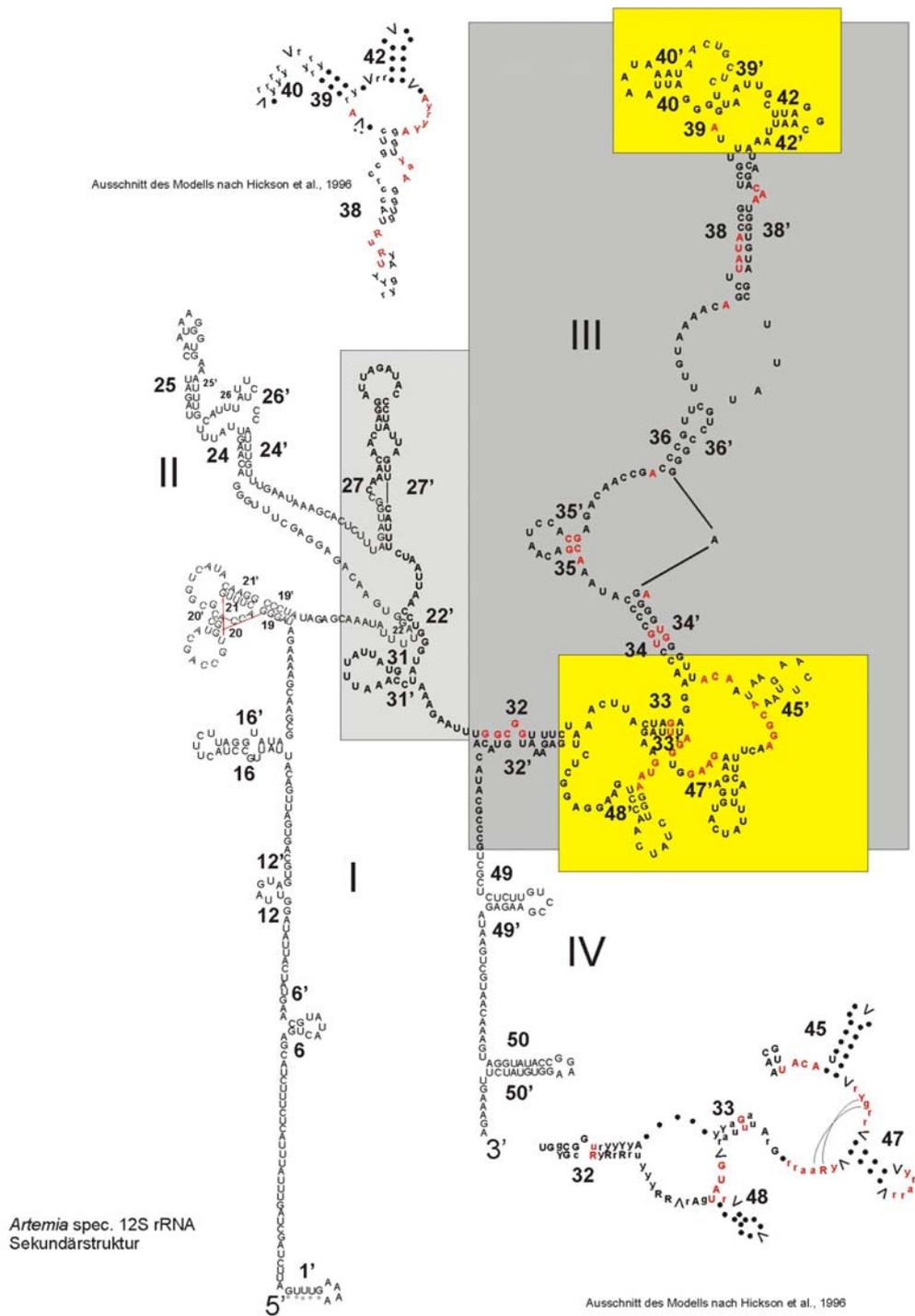


Abbildung 5: 12S rRNA Sekundärstruktur von *Artemia spec.* (X69067). Numerierung der "stems" erfolgte gemäß dem Vorschlag der "European Ribosomal RNA Database" (<http://www.oberon.fvms.ugent.be:8080/rRNA/index.html>). Die dritte Domäne wurde dunkelgrau markiert, der hellgraue Bereich markiert partiell die zweite Domäne. Die gelb markierten Bereiche wurden gesondert nach dem Modell von Hickson et al. (1996) betrachtet (siehe Text), welches in generalisierter Form für die entsprechenden Ausschnitte dargestellt ist. Symbole: ● variable Position, △ Insertionen möglich. Für weitere Erläuterungen der Symbole siehe ebenfalls Text.

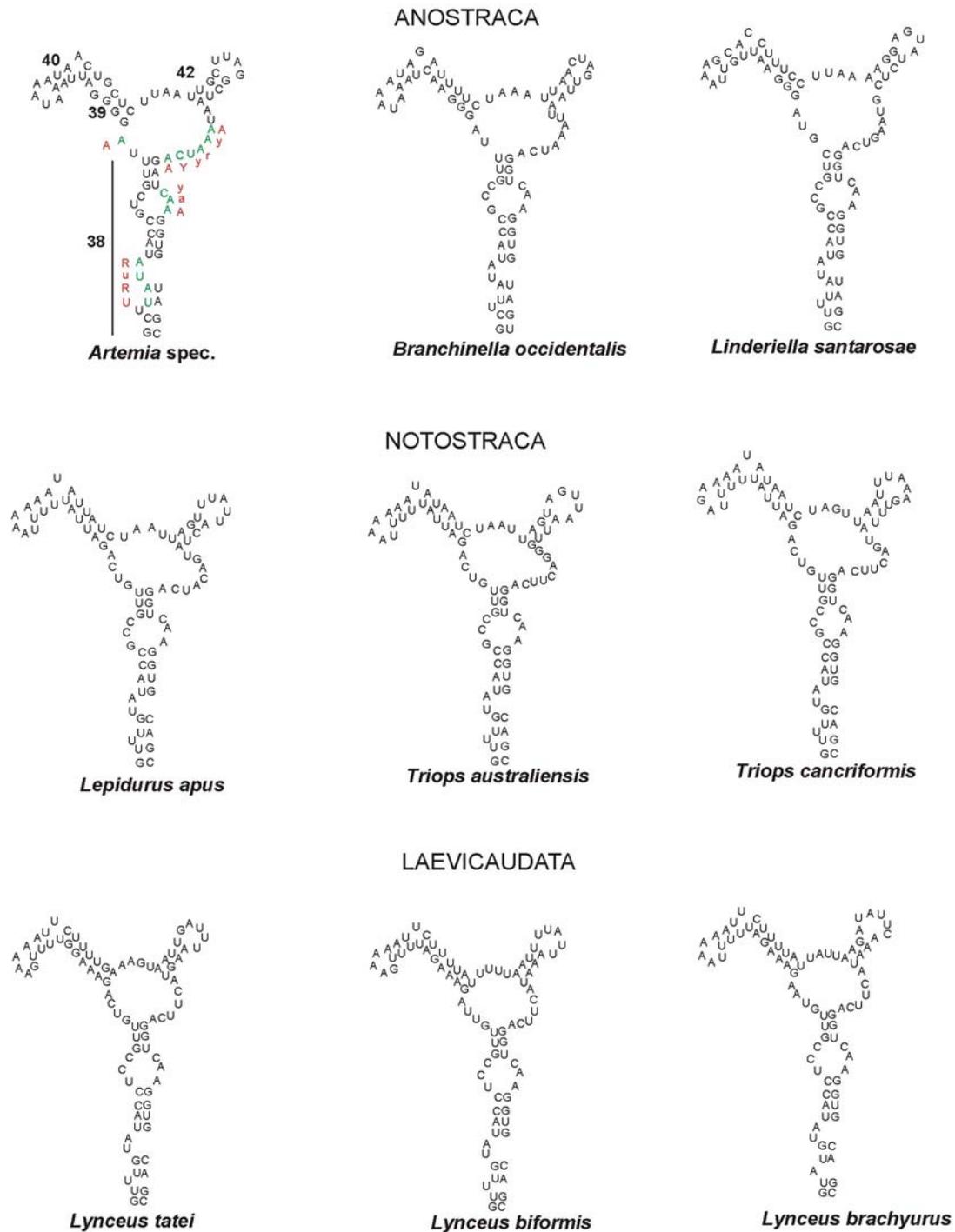
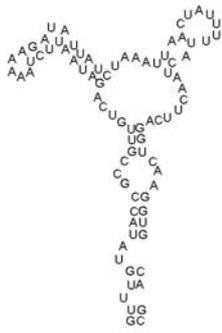
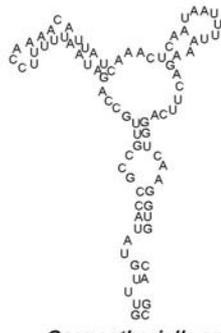


Abbildung 6: Ausschnitt (``stem'' 38, 39, 40, 42) der 12S rRNA Sekundärstruktur der 3. Domäne einiger Vertreter der Anostraca, Notostraca und Laevicaudata, basierend auf dem Modell von Hickson et al. (1996). Am Beispiel von *Artemia spec.* sind Sequenzmotive gemäß Abbildung 5 rot und die entsprechenden Nukleotide von *Artemia* in grün bezeichnet.

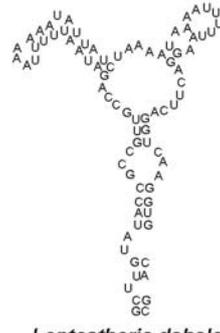
SPINICAUDATA



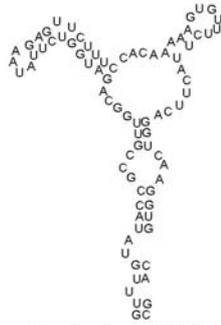
*Imnadia yeyetta*



*Caenestheriella spec.*

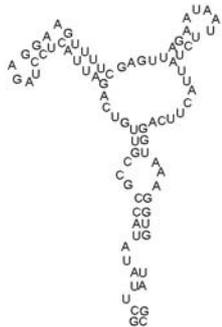


*Leptestheria dahalacensis*

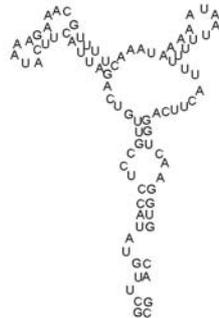


*Cyclestheria hislopi*

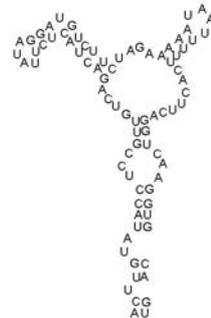
CLADOCERA



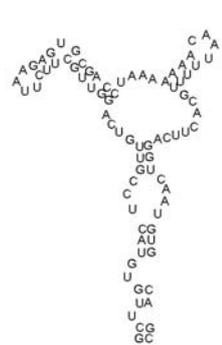
*Polyphemus pediculus*



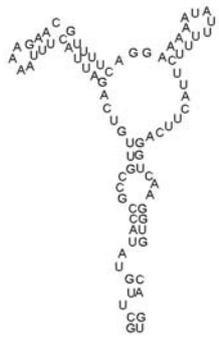
*Simocephalus vetulus*



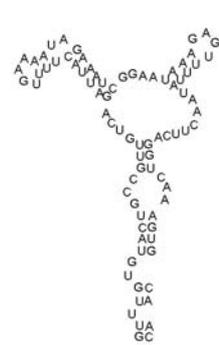
*Leptodora kindtii*



*Eurycerus lamellatus*



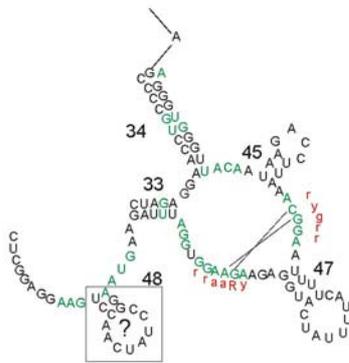
*Daphnia pulex*



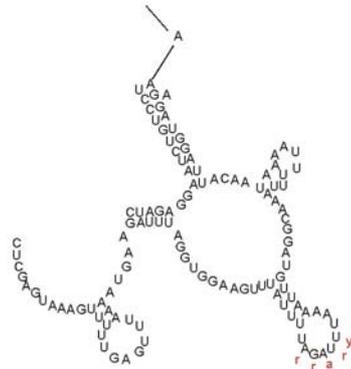
*Pseudochydorus globosus*

Weitere Vertreter der Spinicaudata, *Cyclestheria hislopi* und der Cladocera (``stem'' 38, 39, 40, 42).

ANOSTRACA



*Artemia spec.*

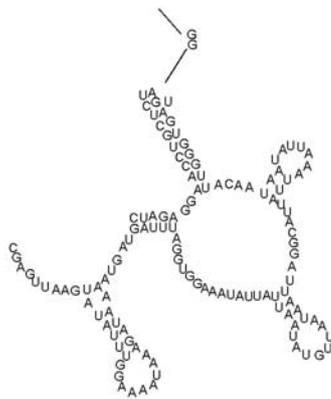


*Branchinella occidentalis*

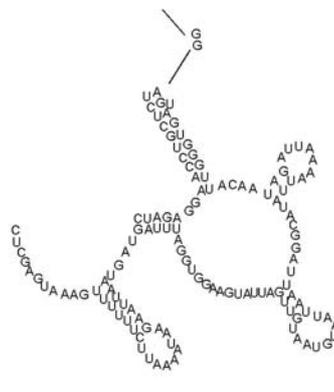


*Linderiella santarosae*

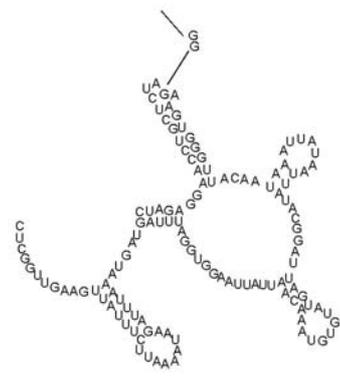
NOTOSTRACA



*Lepidurus apus*

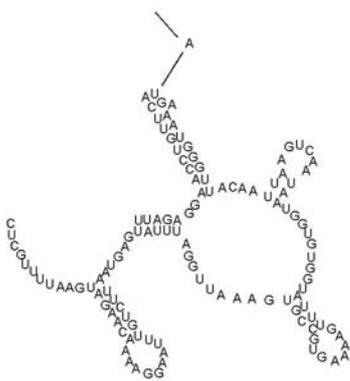


*Triops australiensis*



*Triops cancriformis*

LAEVICAUDATA



*Lynceus tatei*



*Lynceus biformis*



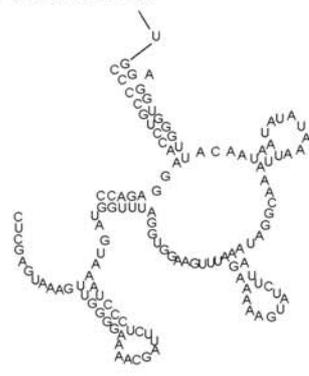
*Lynceus brachyurus*

Ausschnitt (‘‘stem’’ 33, 34, 45, 47, 48) der 12S rRNA Sekundärstruktur einiger Anostraca, Notostraca und Laevicaudata.

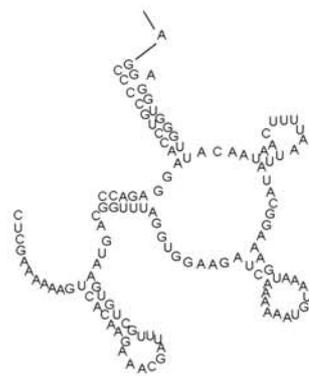
SPINICAUDATA



*Imnadia yeyetta*



*Caenestheriella spec.*

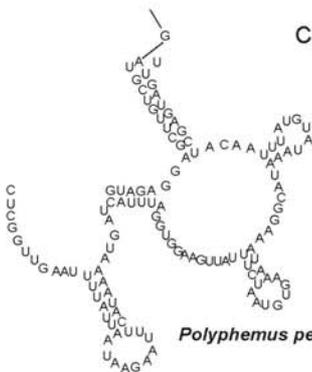


*Leptestheria dahalacensis*

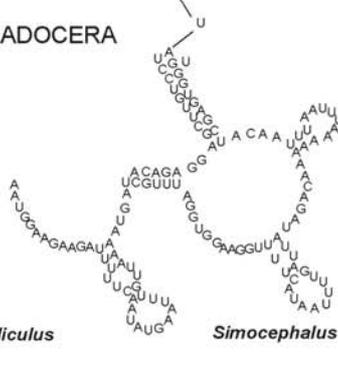


*Cyclestheria hislopi*

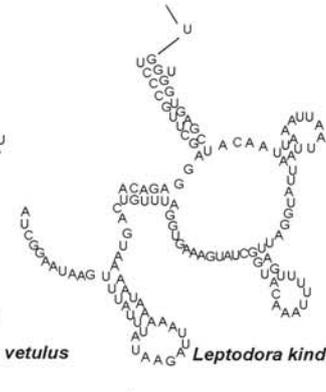
CLADOCERA



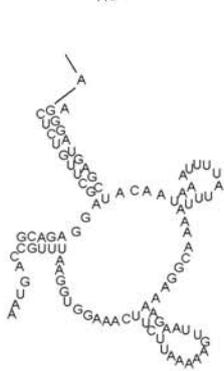
*Polyphemus pediculus*



*Simocephalus vetulus*



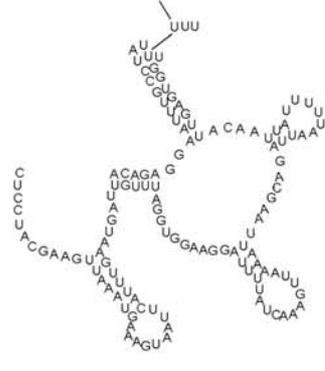
*Leptodora kindtii*



*Eurycerus lamellatus*



*Daphnia pulex*



*Pseudochydorus globosus*

Ausschnitt (‘‘stem’’ 33, 34, 45, 47, 48) der 12S rRNA Sekundärstruktur einiger Spinicaudata, Cladocera und Cyclestheria.

Länge und Position des ``stems`` 47 variieren stark, insbesondere innerhalb der Invertebrata (Hickson et al., 1996), allerdings ist nahe seinem Beginn das Motiv „rYgr“ zu beobachten. Die Nukleotide „Y“ und „g“ dieses Motivs binden innerhalb der Tertiärstruktur vermutlich mit den Nukleotiden „R“ und „a“ aus dem Motiv „yRaarr“ des ``loop``-Bereiches zwischen ``stem`` 47 und 33. Diese Tertiärstruktur ist meistens als G-C bzw A-G Paarung manifestiert (Gutell et al., 1994). Die entsprechenden Motive können in den meisten Fällen durch die Branchiopoda bestätigt werden. Der ``hairpinloop`` der Helix 47 ist durch das Motiv „yrarr“ charakterisiert, scheint aber bei den Branchiopoda nur in einigen Fällen erhalten zu sein (z.B. Spinicaudata).

``Stem`` 48 ist ebenfalls in Länge und Position variabel und beginnt mit dem letzten Nukleotid des konservierten ``loop``-Motivs „GUAA“, welches auch in der Consensussequenz der Branchiopoda invariabel vorkommt. Die genaue Länge des ``stems`` kann allerdings innerhalb der Branchiopoda nicht festgestellt werden aufgrund einer offensichtlich erheblich längeren Deletion innerhalb der Anostraca und *Pseudochydorus* (Cladocera). Als einzige konservierte Nukleotidpaarung kann hier lediglich die Bindung A-U beobachtet werden. Diese Bindung definiert Beginn und Ende der jeweiligen ``stem``-Hälften.

Auf der Basis der für die Branchiopoda definierten Sekundärstruktur wurde ein manuelles Alignment erstellt. Bereiche, deren homologe Positionen nicht klar manifestiert werden konnten (z.B. ``stem/loop`` 48, ``hairpinloop`` 42), wurden gesondert aligned (Clustal X) und nachträglich eingesetzt. Das auf diese Weise generierte Alignment weist mit einer Gesamtlänge von 408 Nukleotiden im Vergleich zum POY Alignment (465 Merkmale) wesentlich weniger Positionen auf, was sich in der Anzahl der ``gaps`` widerspiegelt. Diese ``indels`` befinden sich im POY Alignment im wesentlichen in den ``loop`` Bereichen aber auch in einigen ``stem``-Hälften (z.B. ``stem``-Hälfte 38 und ``stem``-Hälfte 34). Übereinstimmungen zwischen den beiden Alignments finden sich bei den ``stems`` 31, 32, 35 und 36. Die anderen ``stems`` wurden durch das POY Alignmentverfahren entweder nicht gefunden (``stems`` 42, 45, 47) oder weichen in Einzelpositionen (``stems`` 34, 38) innerhalb der ``stems`` vom Strukturalignment ab. Beide Alignments sind als Anhang der Arbeit beigelegt.

Zur Verdeutlichung der Unterschiede der Alignments ist in Abbildung 7 ein Ausschnitt des POY Alignments und der korrespondierende Ausschnitt des Sekundärstrukturalignments im Vergleich dargestellt. Betrachtet wird hier beispielsweise die ``stem``-Hälfte 38 und die flankierenden ``loop``-Bereiche (s.a. Abbildung 5). Das POY Alignment favorisiert einen erheblich größeren Anteil an Insertionen / Deletionen im proximalen ``loop``-Bereich, wobei der endständige Adenosinrest (rot dargestellt; zu 93% vorhanden in den Branchiopoda) nicht einheitlich homologisiert wird. Die Homologisierung des endständigen Adenosinrestes im Sekundärstrukturalignment führte hier zunächst zu einer erheblichen Stauchung des ``loops`` (Eliminierung von ``gaps``). Desweiteren wurden derartige Nukleotide homologisiert, wie z.B. der Uracilrest von *Cyclestheria* und *Eulimnadia* im POY Alignment, verdeutlicht durch den vertikal verlaufenden Pfeil oder auch der Adenosinrest im stromaufwärts gelegenen ``loop``-Bereich zwischen *Lepidurus bilobatus* und *Triops longicaudatus* (grün dargestellt). Die ``stem``-Hälfte 38 wurde durch das POY Alignment ebenfalls mit einigen zusätzlichen ``gaps`` versehen, die durch die Homologisierung des ``loop``-endständigen Nukleotidrestes einiger Taxa (dargestellt durch gebogene Pfeile) mit dem ersten Nukleotid der

``stem``-Hälfte der verbleibenden Arten zustande kommen. Auch dieser Bereich wurde im Strukturalignment entsprechend berichtigt, was ebenfalls zu einer Eliminierung von ``gaps`` führt.

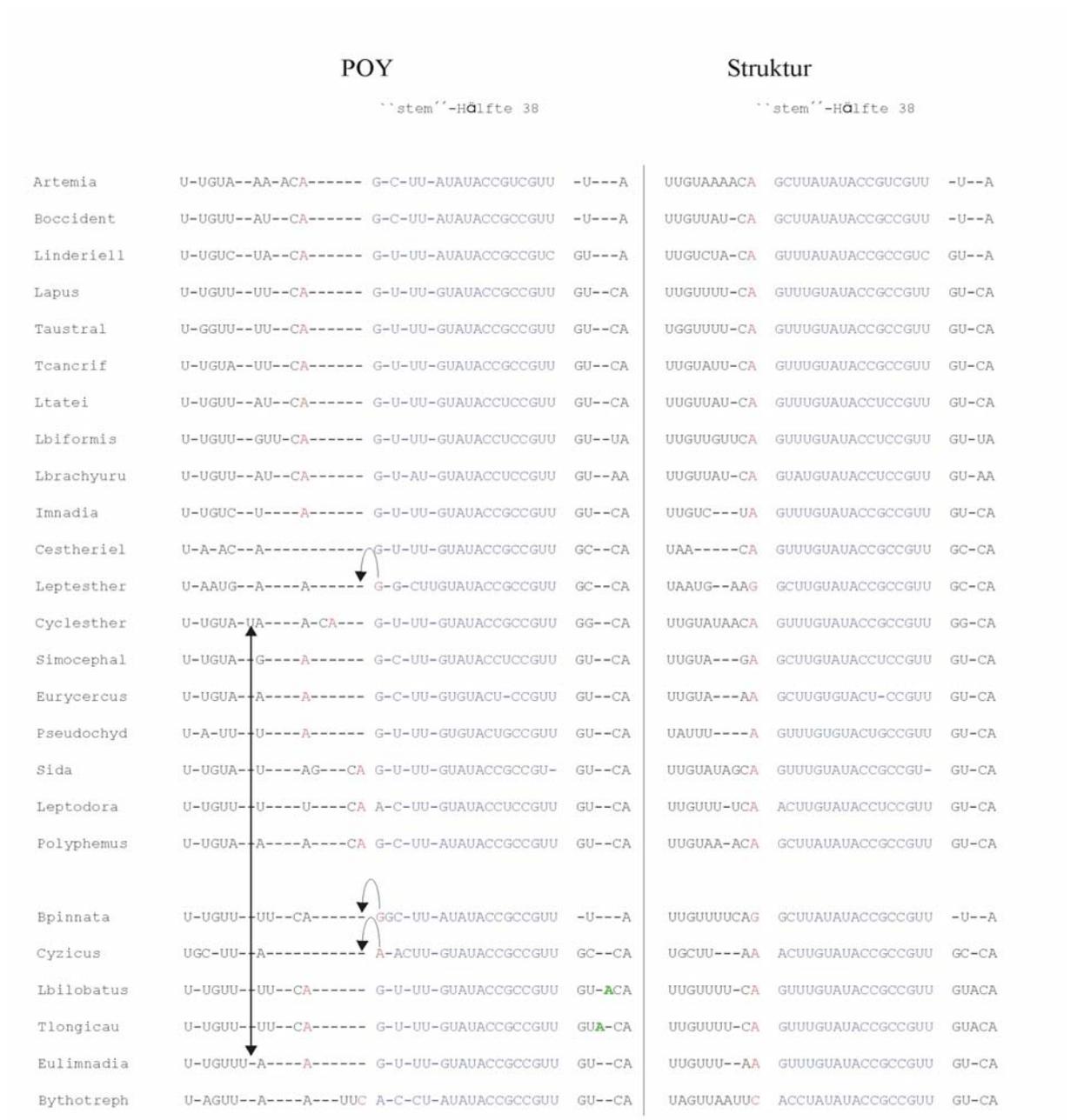


Abbildung 7: Darstellung der Vorgehensweise zur Erstellung eines visuellen Alignments am Beispiel der ``stem``-Hälfte 38 und der flankierenden ``loop``-Regionen. Links: Ausschnitt aus dem POY Alignment. Rechts: Ausschnitt aus dem Strukturalignment. Pfeile überhalb des POY Alignments deuten an, dass die ``loop``-Region insgesamt für das Strukturalignment gestaucht wurde. Gebogene Pfeile weisen beispielartig auf einige Nukleotide, die durch POY als erstes Nukleotid der ``stem``-Hälfte 38 homologisiert werden, im Strukturalignment aber als letztes Nukleotid der vorangehenden ``loop``-Region. Die durch das Sekundärstrukturmodell putativen endständigen, konservierten Nukleotidreste sind rot dargestellt, die ``stem``-Hälfte ist blau dargestellt.

### 3.1.2.6 Phylogenetische Analyse des 12S rRNA Sekundärstruktur Alignments

Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der Maximum Likelihood Analyse (A) und der Parsimonie Analyse (B) mit der Gewichtung Transition: Transversion: ``gaps`` (1:1:2). Beide Analysen zeigen in den wesentlichen Punkten übereinstimmend die Monophylie der Haupttaxa Notostraca, Laevicaudata und Cladocera. *Cyclestheria hislopi* erscheint hier als Schwestergruppe zu den Cladocera. Somit zerfällt auch in dieser Analyse das traditionelle Taxon Spinicaudata. Die verbleibenden Spinicaudata bilden die Schwestergruppe zu den Cladoceromorpha (*C.hislopi* + Cladocera). Wie auch in der Einzelanalyse ohne Betrachtung der Sekundärstruktur bilden in der ML Analyse die Laevicaudata die Schwestergruppe zu den Notostraca und beide zusammen die Schwestergruppe zu allen übrigen Phyllopora. Das Taxon Diplostraca findet hier in der ML Analyse abermals keine Unterstützung, wohl aber wird eine Schwestergruppenbeziehung der Laevicaudata zu den Spinicaudata und Cladoceromorpha in der Parsimonie Analyse gezeigt, jedoch ohne nennenswerte Unterstützung. Innerhalb der Cladocera bilden die Onychopoda in beiden Analysen ein Monophylum. Eine phylogenetisch nahe Verwandtschaft des Haplopoden *Leptodora kindtii* zu den Onychopoda kann auch hier gezeigt werden. Die Ctenopoda bilden in der ML Analyse ein Schwestergruppenverhältnis zu den Daphniidae.

Insbesondere bezüglich der Stellung von *C.hislopi* und seiner Beziehung zu den Cladocera bringt die phylogenetische Analyse auf der Basis eines anhand der Sekundärstruktur visuell korrigierten Alignments eine Verbesserung. In beiden Analysen wird *C. hislopi* als Schwesertaxon zu den Cladocera gezeigt. Eine vollständige Kongruenz zwischen beiden Methoden kann allerdings auch hier nicht erreicht werden. Dies betrifft besonders die Stellung der Laevicaudata. Insgesamt sind die einzelnen Unterstützungen im Durchschnitt allerdings als eher mäßig zu bewerten, was vermutlich mit der Kürze des Genabschnittes zusammenhängt.

Auffällig sind in der Parsimonie Analyse einige Splits innerhalb der Notostraca und Spinicaudata. Die durch die zuvor mittels POY favorisierten Schwestergruppenverhältnisse der Triopsidae ((*L.apus*, *L. bilobatus*) (*T.cancriformis*, *T. australiensis*, *T. longicaudatus*)) werden durch das Sekundärstrukturalignment nicht mehr gestützt. Gleiches gilt auch für die Limnadiidae innerhalb der Spinicaudata. In Abbildung 8 werden sie als Monophylum dargestellt, dieses Verhältnis wird durch die Analyse des Sekundärstrukturalignments nicht bestätigt. Das Ergebnis der ML Analyse weicht im Vergleich zur ML Analyse des POY Alignments in diesen Gruppen nicht voneinander ab.

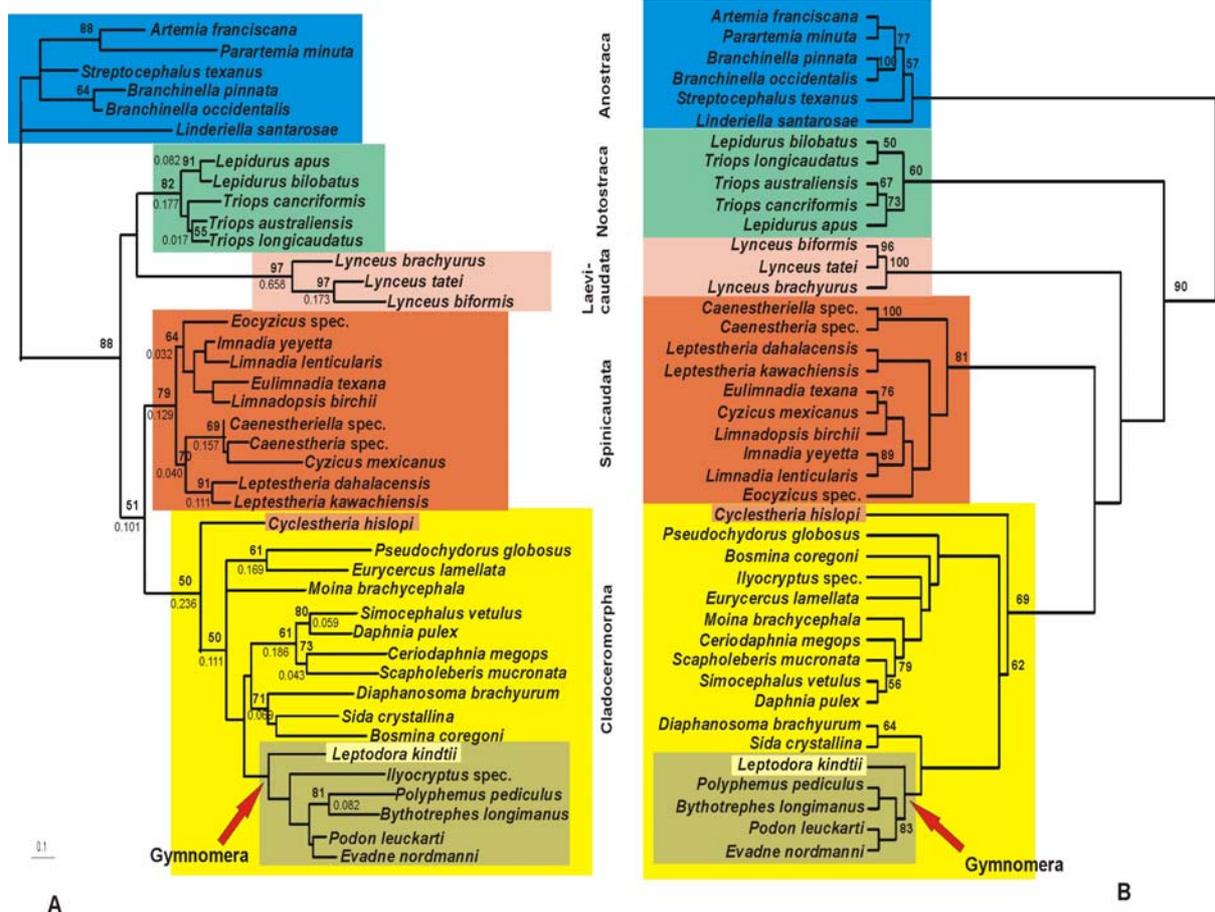


Abbildung 8: Phylogenetische Analyse der Phyllopora basierend auf der 3. Domäne (und partiell der 2.) der mitochondrialen 12S rRNA. Das zugrunde liegende Alignment weist eine Länge von 408 Positionen auf und wurde auf der Basis der Sekundärstruktur visuell erstellt. (A) "Best" Maximum Likelihood Dendrogramm (logL. – 8160.02), ermittelt aus 10.000 Quartet- Puzzle-Topologien. Verwendetes Modell TN+Γ8. Unterstützungen der Dichotomien sind als "QP-support" angegeben (wie für Abb. 4 erklärt). Die Astlängen beziehen sich auf den gezeigten Stammbaum. (B) "Strict" Consensuscladogram aus zwei gleich sparsamen Topologien á 2560 Schritten. Es wurde die Gewichtung Transition:Transversion:"gap" (1:1:2) angenommen ("gaps"= 5. Merkmal). Die Unterstützungen resultieren aus einer "bootstrap" Analyse (1000 Replikate) und sind für >50% angegeben. Programm (Parsimonie): Paup Vers.4 (beta).

### 3.1.2.7 Das hoch konservierte Gen EF-1 $\alpha$

Das zugrundeliegende Nukleotidalignment der 19 Arten mit 942 Merkmale weist keine Ambiguitäten auf (0 "gaps"). Es schien daher zweckmäßig die Sequenzen mit dem Programm Clustal X unter den vorgegebenen ("default") Optionen zu alignen. Abbildung 9A und B zeigen die Ergebnisse der Maximum Likelihood- und Parsimonie Analysen. Es wurden zunächst alle Nukleotidpositionen in die Analyse mit einbezogen (Abbildung 9) und in einer weiteren Berechnung die dritte Codonposition eliminiert (Abbildung 10). Für die ML Analysen (jeweils A) erwies sich ebenfalls das Modell TN+I $\Gamma$ 8 als das geeignetste Modell (mit dem signifikant höchsten "log likelihood"). In der Parsimonie Analyse wurde keine Gewichtung zugrunde gelegt. Basierend auf allen Codonpositionen resultierte die Berechnung in einem sparsamsten Cladogramm (Parsimonie) mit einer Länge von 1411 Schritten. Die "bootstrap" Analyse umfasste 1000 Replikate. Als Maximum Likelihood Analyse ist der strikte Consensus aus 391 Quartet-Puzzle-Topologien dargestellt.

In beiden Analysen erhalten auch hier, wie schon in den 12S Analysen, die gezeigten Monophyla der Notostraca (BA 70%, CML 96%) und Spinicaudata ohne *C. hislopi* (BA 94%, CML 94) sehr gute Unterstützung. Die Cladocera sind hier weder in der Parsimonie-, noch in der Maximum Likelihood Analyse monophyletisch. Innerhalb der Cladocera erfahren die Onychopoda ebenfalls eine gute bis sehr gute Unterstützung. (BA 88%, CML 100%). Obwohl eine Monophylie der Cladocera hier nicht gezeigt werden kann, da der Haplopode *Leptodora kindtii* (Parsimonie) bzw. *L.kindtii* und die Ctenopoda (ML) nicht innerhalb der Cladocera zu finden ist, sondern jeweils als Schwestergruppe der Spinicaudata (ohne *C. hislopi*) gezeigt wird, ist die relative Position von (Laevicaudata (Notostraca (Spinicaudata + Cladocera))) ähnlich den Beziehungen, die in der vorherigen 12S Analyse (Abbildung 4B) gezeigt wird. Einen wesentlichen Unterschied stellt die Beziehung von *Cyclestheria hislopi* zu den übrigen Phyllopoda dar. Diese Aufspaltung wird zwar verhältnismäßig gut in der Parsimonie Analyse gestützt (BA 76%), jedoch nicht in der ML Analyse. In der ML Analyse erscheint *C. hislopi* nicht in der Innengruppe. Die hier aufgezeigte basale Stellung von *C. hislopi* innerhalb der Phyllopoda oder sogar als Aussengruppe scheint artifiziell zu sein. Wie folgend gezeigt wird, gibt es Hinweise dafür, dass diese Stellung durch eine hohe Saturation der dritten Codonposition ausgelöst wird. Zu diesem Zweck wurde eine weitere Analyse unter Ausschluss der dritten Codonposition durchgeführt (Abbildung 10). In dieser Analyse erscheint das Taxon *C.hislopi* in näherer Verwandtschaft zu den Spinicaudata und Cladocera und ist in dieser Beziehung kongruent zu den zuvor gezeigten 12S Analysen.

Eine entsprechende Analyse der alignierten Aminosäuresequenzen resultierte mit beiden Methoden in einer nicht aussagekräftigen Polytomie (hier nicht gezeigt), was auf den starken Konservierungsgrad des Gens zurückzuführen ist.

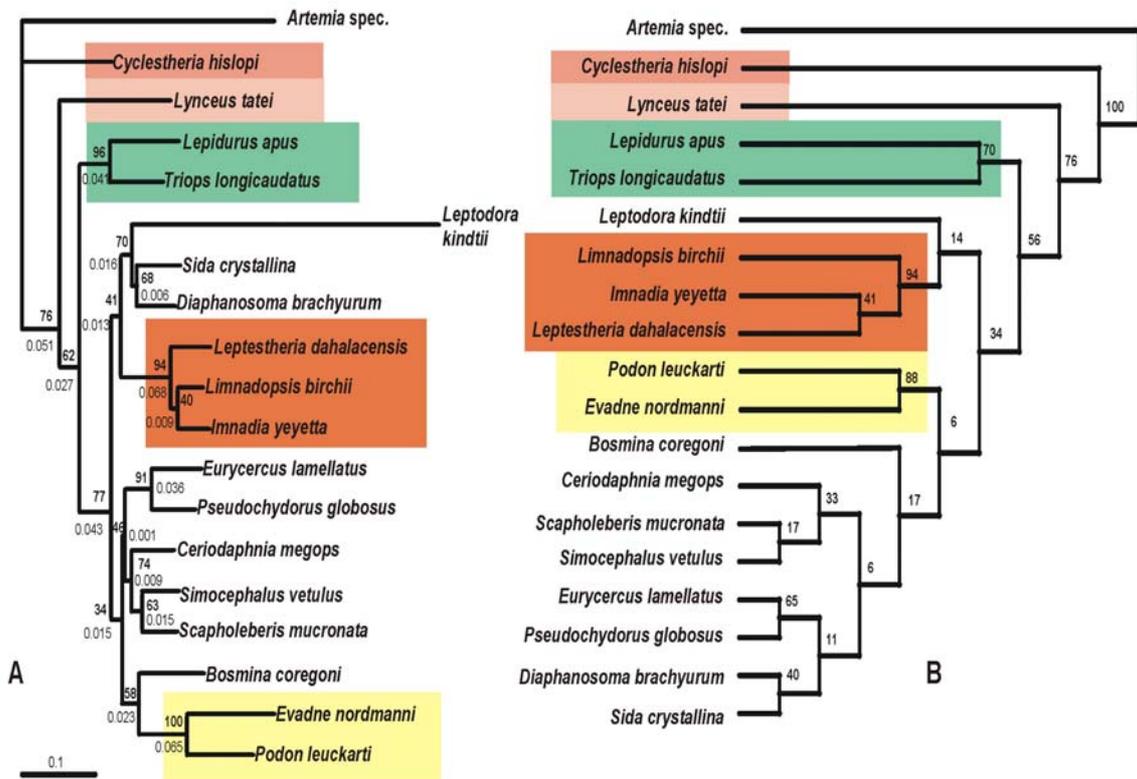


Abbildung 9: Phylogenetische Analyse des Gens EF-1 $\alpha$  der Phyllopoda (Außengruppe: Anostraca). Das Alignment weist eine Länge von 942 Nukleotidpositionen auf. Es wurden alle Positionen berechnet. (A) "Strict" Consensus Dendrogramm aus 391 Quartet- Puzzle- Topologien (Maximum Likelihood) mit einer Wahrscheinlichkeit von  $\log L. -7073.37$ . Es wurden 983 Topologien getestet, davon waren 390 Topologien nicht signifikant schlechter als der "best ML". ( $\log L. -7068.50$ ). Astlängen und  $\log L.$  wurden für das gezeigte Dendrogramm als "user tree" berechnet. Modell: TN+ $\Gamma$ 8. Der Consensus wurde mit dem Programm Phylip Vers. 3.5c generiert. Die Unterstützung der Dichotomien bezieht sich auf die Anzahl der Splits in 391 Topologien (in %). (B) "Most parsimonious" Cladogram (307 informative Merkmale) mit einer Länge von 1411 Schritten. Es wurde keine Gewichtung der Positionen vorgenommen. Die "bootstrap" Analyse (1000 Replikate) ist vermerkt. Programme (Parsimonie): Nona, Winclada. Farbliche Markierungen kennzeichnen: Notostraca (grün), Spinicaudata (orange), Onychopoda (Cladocera) (gelb), Laevicaudata (hellrosa) und *Cyclestheria hislopi* (dunkelrosa).

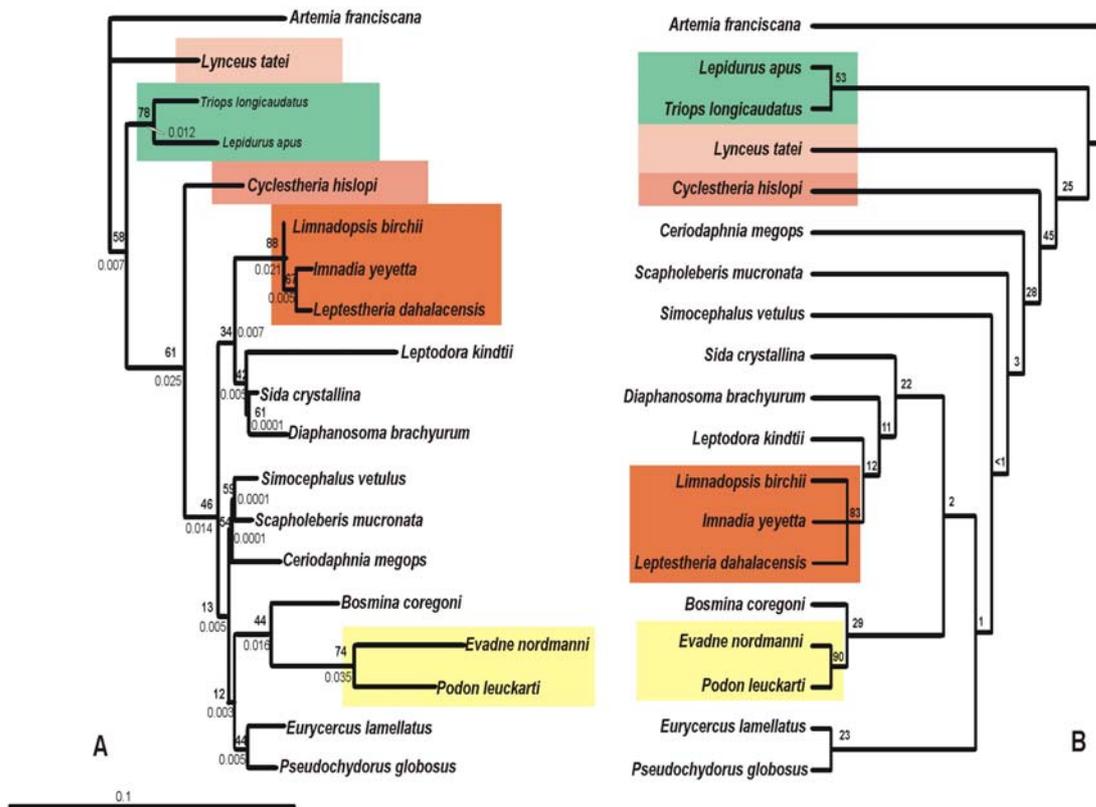


Abbildung 10: Phylogenetische Analyse des Gens EF-1 $\alpha$  der Phyllozoa (Außengruppe: Anostraca). Es wurden nur die ersten und zweiten Codonpositionen berücksichtigt (=628 Positionen). (A) "Strict" Consensus Dendrogramm aus 489 Quartet- Puzzle- Topologien (Maximum Likelihood) mit einer Wahrscheinlichkeit von logL. -2336.52. Modell: TN+ $\Gamma$ 8. Es wurden insgesamt 1000 Topologien getestet, davon waren 488 Topologien nicht signifikant schlechter als der "best ML" (logL. -2325.67). Astlängen und Wahrscheinlichkeit für das Consensus Dendrogramm wurde als "user tree" berechnet. Der Consensus wurde mit dem Programm Phylip Vers. 3.5c generiert. Die Unterstützungen der Dichotomien beziehen sich auf die Anzahl der in den 489 Topologien gefundenen Splits (in %). (B) "Strict" Consensus Cladogramm aus zwei gleich sparsamen Topologien á 285 Schritten der Parsimonie Analyse. Es wurde keine Gewichtung der Positionen vorgenommen. Die "bootstrap" Analyse (1000 Replikate) ist an den Dichotomien vermerkt. Verwendete Programme: Nona, Winclada. Farbliche Markierungen wie in Abbildung 9.

### 3.1.2.8 Der kombinierte Datensatz 12S rRNA basierend auf der Sekundärstruktur und dem proteincodierenden Gen EF-1 $\alpha$

Dieser Analyse liegt das manuell erstellte 12S rRNA-Alignment kombiniert mit dem EF-1 $\alpha$  Datensatz (exclusive der 3. Codonposition) zugrunde und hat eine Gesamtlänge von 1036 Positionen. Es wurden die 19 Spezies, für die beide Sequenzen vorliegen, berücksichtigt. Abbildung 11A zeigt ein ML Consensusdendrogramm (logL -7341.78) aus 260 verschiedenen QP-Topologien. Insgesamt wurden 974 Topologien zuvor getestet. Auch hier bezeichnen die angegebenen prozentualen Werte die Erscheinungshäufigkeiten der Dichotomien in den 260 Einzeltopologien. Das Ergebnis des besten ML Stammbaums mit einem logL von -7336.12 (hier nicht gezeigt) ist in vollständiger Übereinstimmung mit dem Consensusbaum.

Abbildung 11B zeigt das strikte Consensuscladogramm der Parsimonie Analyse, wobei keine Positionsgewichtung vorgenommen wurde. Dieser Weg wurde gewählt, um den Einfluss des EF-1 $\alpha$  Datensatzes nicht zu unterdrücken. Die Analyse resultierte in drei gleich sparsamen Topologien mit 1406 Schritten. Die "bootstrap" Analyse umfasste 1000 Replikate.

Beide Analysen ergaben kongruente Ergebnisse. Abermals werden die Hauptgruppen (Notostraca, Cladocera, Laevicaudata) mit hoher Unterstützung als jeweils monophyletisch ausgewiesen. Ein einheitliches Bild ergibt sich auch bei dem Schwestergruppenverhältnis *C. hislopi* zu den Cladocera. Dieser Split wird im Consensus der ML Topologien sehr hoch unterstützt (CML 94%), in der Parsimonie Analyse jedoch nur moderat (BA 62%). Die Gymnomera innerhalb der Cladocera erhalten in beiden Analysen hohe Unterstützung (CML 87% und BA 86%).

Bemerkenswert ist die Stellung der Laevicaudata. Beide Analysemethoden ergeben übereinstimmend eine Schwestergruppenbeziehung der Laevicaudata zu den Spinicaudata + Cladoceromorpha. Somit wird erstmalig in den hier gezeigten Stammbäumen das Konzept der Diplostraca kongruent mit beiden Analysemethodenunterstützt.

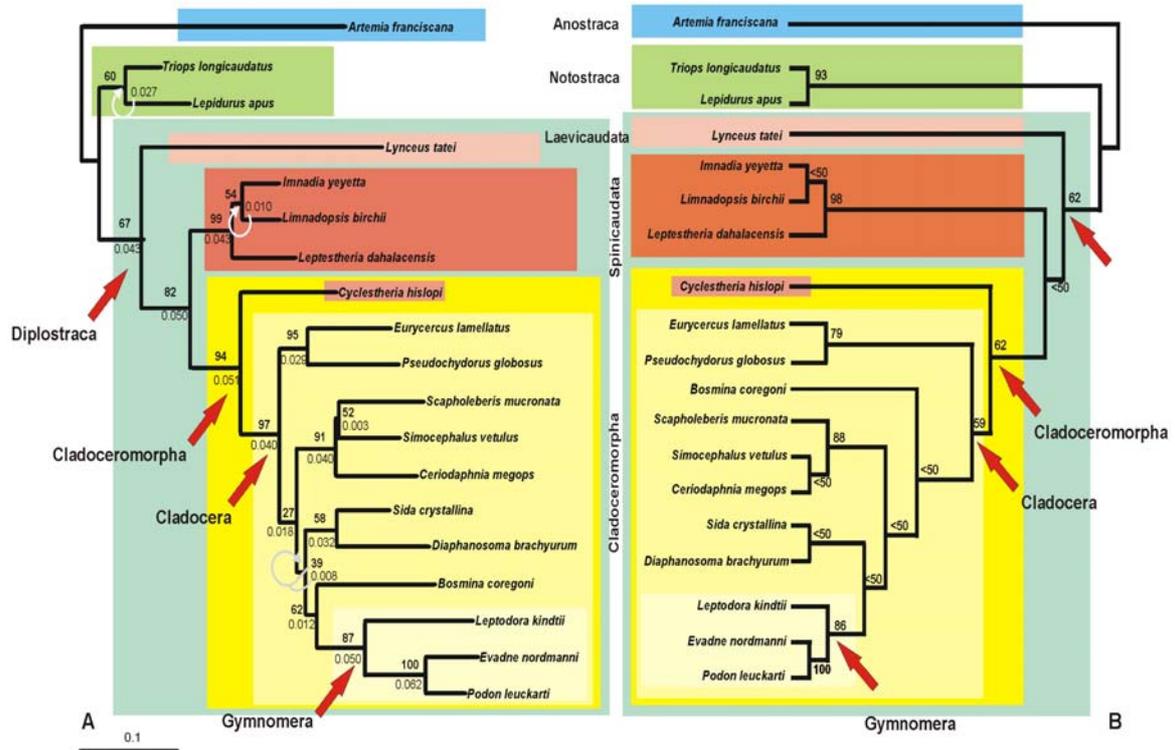


Abbildung 11: Phylogenetische Analyse des kombinierten Datensatzes bestehend aus der 12S rRNA (visuell erstelltes Alignment) und EF-1 $\alpha$  der Phyllozoa (Außengruppe: Anostraca). Das Alignment weist eine Länge von 1036 Nukleotiden auf. (A) "Strict" Consensusdendrogramm aus 260 Quartet-Puzzle-Topologien (Maximum Likelihood) mit einer Wahrscheinlichkeit von  $\log L. -7341.87$ . Modell: TN+ $\Gamma$ 8. Es wurden insgesamt 974 Topologien getestet, davon waren 259 Topologien nicht signifikant schlechter als der "best ML" ( $\log L. -7336.12$ ). Astlängen und Wahrscheinlichkeit des Consensusdendrogramms wurden als "user tree" berechnet. Programm zur Erstellung des Consensus: Phylip Vers. 3.5c. Die Unterstützungen beziehen sich auf den prozentualen Anteil der in den 260 Topologien gefundenen Splits. (B) "Strict" Consensuscladogramm der Parsimonie Analyse aus drei gleich sparsamen Topologien á 1406 Schritten. Es wurde keine Gewichtung vorgenommen. Die "bootstrap" Werte (1000 Replikate) sind an den entsprechenden Dichotomien vermerkt. Verwendete Programme: Nona, Winclada.

### 3.1.2.9 Die Vergleichbarkeit der verschiedenen Cladogramme

Um zu testen, inwieweit die verschiedenen Topologien, die auf der Grundlage verschiedener Methoden berechnet wurden, vergleichbar sind, wurde der Kishino-Hasegawa-Test (Kishino & Hasegawa, 1989) mit einem statistischen Signifikanzlevel von 5% angewendet. Die Maximum Likelihood Analyse wurde jeweils als Hypothese A gesetzt, die Parsimonie Analyse (Gewichtungsschema 1:1:2 bei den 12S Analysen) als Hypothese B (Tabelle 5).

Tabelle 5: Resultate der Tests für die Einzelanalysen (12S und EF-1 $\alpha$ ) und den kombinierten Datensatz (ohne dritte Codonposition) auf der Basis von 19 Taxa.

Abbildungen	Datensatz	Log likelihood	Differenz		Signifikant schlechter(>5%)
Abbildung 4 (41 Taxa)	<b>12S rDNA (ohne Struktur)</b>				
	Hypothese A (ML)	-7778.04	0.00	→	best
	Hypothese B (MP)	-7810.80	32.77		nein
Abbildung 8 (41 Taxa)	<b>12S rRNA (mit Struktur)</b>				
	Hypothese A (ML)	-8160.02	0.00	→	best
	Hypothese B (MP)	-8231.07	70.25		ja
Abbildung 10 (19 Taxa)	<b>EF-1<math>\alpha</math> (ohne 3. P.)</b>				
	Hypothese A (ML)	-2336.52	0.00	→	best
	Hypothese B (MP)	-2337.27	0.75		nein
Abbildung 11 (19 Taxa)	<b>12S rRNA/EF-1<math>\alpha</math></b>				
	Hypothese A (ML)	-7341.87	2.17		nein
	Hypothese B (MP)	-7339.70	0.00	→	best

Die Testkriterien wurden, wie bei den ML Analysen, gemäß dem Substitutionsmodell TN+ $\Gamma$ 8 festgelegt. Das Ergebnis, dass die Maximum Likelihood Hypothesen als die jeweils besseren gewertet werden (Ausnahme: kombinierte Analyse), erscheint nicht verwunderlich. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Differenz der "log likelihoods" beider Methoden bei der Berechnung des kombinierten Datensatzes erheblich kleiner ist als in den 12S-Einzelanalysen, was sicherlich mit der Kongruenz der Ergebnisse erklärbar ist. Der Vergleich macht es daher möglich, die verschiedenen Hypothesen gleichwertig zu diskutieren.

### 3.1.2.10 Introns in der codierenden Region des Gens EF-1 $\alpha$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gen EF-1 $\alpha$  von 17 Taxa sequenziert (s. Tabelle 1). Die für die Amplifikation notwendigen Primer wurden so gewählt, dass ein 1063 Basenpaare langes Fragment zu erwarten war. Die erhaltenen PCR-Fragmente wiesen allerdings, abhängig vom Taxon, Längen von 1063 bp bis ~1200 bp auf. In der anschließenden Sequenzanalyse zeigte sich, dass die codierende Region bei vielen Taxa von kleinen ca 60-65 bp. langen spliceosomalen Introns durchbrochen ist.

Die codierende Region des Gens EF-1 $\alpha$  erwies sich als sehr G/C-reich. Im Gegensatz dazu sind die Introns stark A/T-haltig (ca. 85% pro Intron). Die Adenosin-, bzw. Thymin-Reste sind zudem häufig in langen sogenannten "stretches" angeordnet. Insgesamt sind die Intronsequenzen hochvariabel. Versuche diese Sequenzen zu alignen waren aus diesen Gründen unmöglich. Darüber hinaus wäre eine Homologie der Intronsequenzen schwerlich postulierbar, da von einem gleichen Sequenzursprung nicht notwendigerweise ausgegangen werden kann (siehe Kapitel: 1.2.3). Im Gegensatz dazu sind die Positionen der Introns stark konserviert innerhalb der fünf Haupttaxa. Sie wurden immer bezüglich der einzelnen Haupttaxa in identischer Position homologer Triplets gefunden. Aus diesem Grund werden die Positionen der Introns homologisiert und dienen als Argumentationsgrundlage für eine phylogenetische Betrachtung.

Abbildung 12 zeigt (A) den sequenzierten codierenden Bereich im Vergleich zur Referenzsequenz von *Artemia spec.* (X03704-08) mit der relativen Lage der Introns, der putativen Splicingstellen und den korrespondierenden Aminosäureresten. Insgesamt wurden fünf verschiedene Intronpositionen gefunden, die die Bezeichnungen A-E erhalten. Tabelle B der Abbildung 12 enthält Informationen zum Vorkommen der verschiedenen Introns in allen sequenzierten Spezies. Zusätzlich wird die Lage der Introns in den genomischen Referenzsequenzen von *Artemia spec.* (Anostraca), einigen Insecta, einem Nematoda und einigen Deuterostomia (Hemichordata, Urochordata, Cephalochordata, Echinodermata) als Aussengruppe mit berücksichtigt.

Die meisten hier sequenzierten Arten enthalten mindestens ein Intron in der betrachteten Region. Ausnahmen stellen die Spinicaudata und *L. kindtii* dar, die intronfrei sind. Die meisten Introns (drei) wurden bei den Cladocera beobachtet, wobei alle Cladoceren (ausser *L. kindtii*) ein Intron in Position A haben. Zusätzlich zur Position A werden in den Anomopoda Introns in den Positionen C und D gefunden (Ausnahme: *Ceriodaphnia megops*; Fehlen eines Introns in Position C). Die Ctenopodenspezies *Sida crystallina* zeigt ebenfalls das Verteilungsmuster der Anomopoda (A, C, D), im Gegensatz dazu fehlen *Diaphanosoma brachyurum* (Ctenopoda) die Introns in den Positionen C und D. Innerhalb der Cladocera scheint das Intronverteilungsmuster der Onychopoda ebenfalls abgeleitet zu sein, da *Podon leuckarti* nur die Introns A und D, *Evadne nordmanni* nur noch ein Intron in Position A hat.

Introns in Position D konnten nur in den Cladoceren nachgewiesen werden und können daher bezüglich des vorliegenden Datensatzes als Apomorphie der Cladocera gewertet werden. Der

Notostrace *Lepidurus apus* besitzt ein Intron in Position B, welches ebenfalls in keinem anderen Branchiopoden beobachtet wurde und daher vermutlich einzigartig innerhalb der Phyllopoda ist.

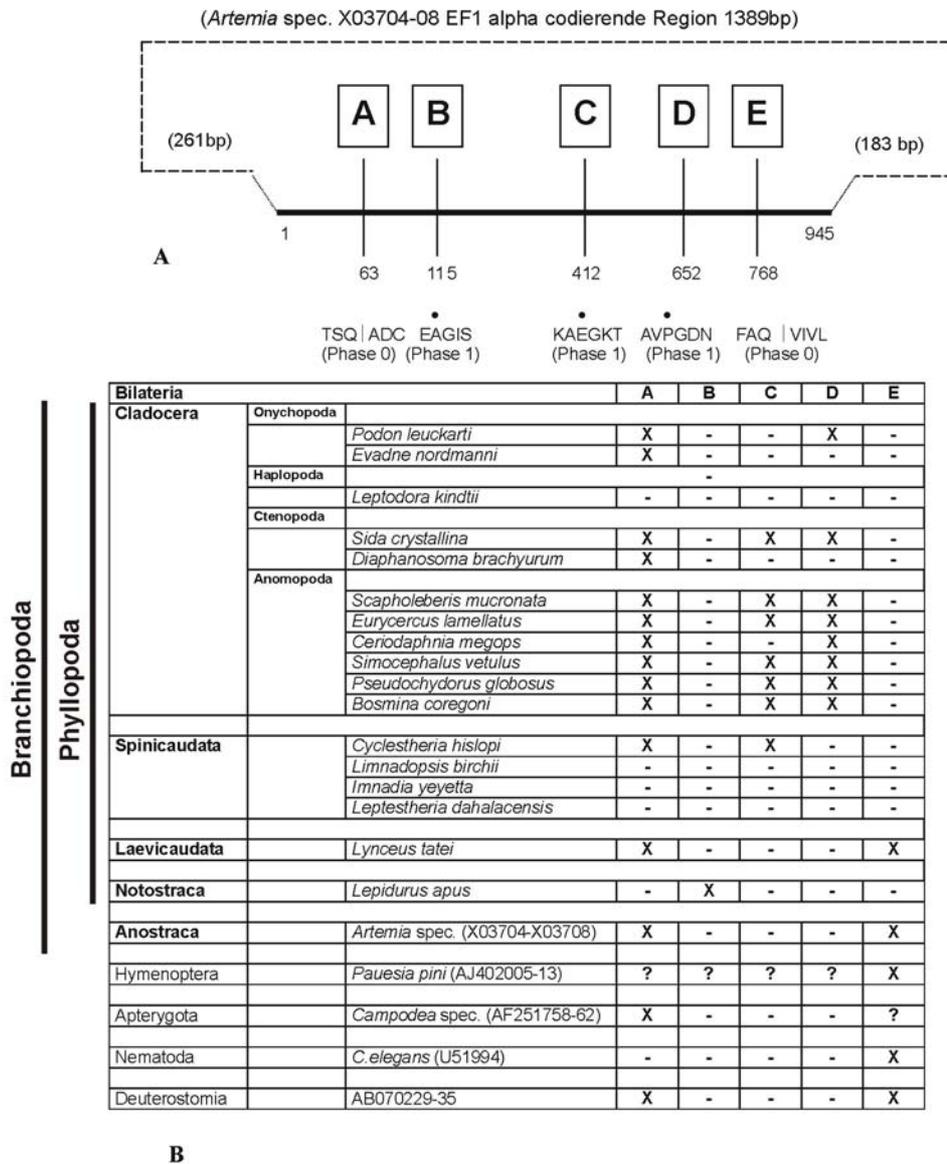


Abbildung 12: Verteilung der Introns im Gen EF-1 $\alpha$  innerhalb der Branchiopoda und einigen in der Genbank verfügbaren Außengruppen der Hexapoda, Nematoda und Deuterostomia. (A) Beschreibung der Lage der aller Introns, die innerhalb der Branchiopoda identifiziert wurden, bezogen auf die codierende Region von *Artemia* spec. Die Nummerierung der Intronposition bezieht sich auf das erste sequenzierte Nukleotid (1). Unterhalb der Nummerierung ist die korrespondierende Position der Aminosäuresequenz benannt und die jeweilige Phase des Introns: „|“ Phase 0 (zwischen 3. Codonposition des vorangehenden und 1. Codonposition des folgenden Triplets), „•“ Phase 1 (zwischen 1. und 2. Triplettposition der korrespondierenden Aminosäure). (B) Tabelle der Verteilung der Positionen innerhalb der Branchiopoda und Außengruppen. Nicht vorhandene Information wurde mit einem Fragezeichen vermerkt, nicht nachweisbare Introns mit einem „-“.

Bemerkenswert ist die Lage der Introns in *Cyclestheria hislopi* (traditionell Spinicaudata). Neben dem Intron A besitzt diese Spezies ein weiteres Intron in Position C. Introns in dieser Position wurden nur in den Cladocera beobachtet. Damit gibt die Intronposition C ein zusätzliches Argument für das Monophylum Cladoceromorpha (*C. hislopi* + Cladocera).

Es kann gezeigt werden, dass die Intronposition A innerhalb der Phyllopoda sehr stabil ist und ebenfalls in den Aussengruppen Anostraca, Apterygota und Deuterostomia zu finden ist. Gleiches gilt für Intron E, welches innerhalb der Phyllopoda nur die Laevicaudata (*Lynceus tatei*) haben, diesen Zustand aber mit den Anostraca und darüber hinaus den Hymenoptera, Nematoda und Deuterostomia teilen. Beide Introns befinden sich bezüglich ihrer relativen Lage zu den Triplets in Phase 0, d.h. zwischen der dritten Cosdonposition des vorangehenden Triplets und der ersten Position des nachstehenden Triplets. Das Vorkommen der Introns A und E innerhalb der hier betrachteten Bilateria-Taxa deutet auf den plesiomorphen Ursprung der Introns A und E hin. Eine eingehende Diskussion der Intronverteilung folgt in Kapitel: 3.1.3.2. der Diskussion.

### 3.1.3 Diskussion der vorliegenden Ergebnisse der Branchiopoda

#### 3.1.3.1 Die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Phyllopoda

Für das Teilprojekt „Phyllopoda“ wurden ein Bereich der mitochondrialen 12S rDNA von 33 Taxa und des nuklearen Gens EF-1 $\alpha$  von 17 Taxa sequenziert und in Verbindung mit einigen bereits in der Datenbank bzw. der Literatur (Hanner & Fugate, 1997) existierenden Sequenzen phylogenetisch ausgewertet. In der Übersicht der Abbildung 13 werden die Ergebnisse zusammenfassend bezüglich der zu diskutierenden Fragestellungen dargestellt.

Die hier vorliegenden Analysen der 12S rDNA (Abbildung 13A), des Sekundärstrukturalignments (Abbildung 13B) sowie des kombinierten Datensatzes (Abbildung 13D) beider Gene zeigen eindeutig die Monophylie der Notostraca, Laevicaudata und Spinicaudata (exclusive *C. hislopi*).

Ebenso begründet erscheint das Cladoceromorpha Konzept (Crease & Taylor, 1998; Ax, 1999; Taylor et al., 1999; Spears & Abele, 2000; Braband et al., 2002), wobei *Cyclestheria hislopi* die Schwestergruppe zu den Cladocera ist. Letzteres kann jedoch in den Analysen der einzelnen Gene nicht eindeutig gezeigt werden (Ausnahme: Analyse des 12S Sekundärstrukturalignments). Dennoch wird in allen Einzelanalysen deutlich, dass das Taxon *Cyclestheria hislopi* eine enge Beziehung zu den Cladocera hat. Wie die Analyse des 12S Sekundärstrukturalignments zeigt (Abbildung 8), wird die undeutliche Stellung der Cladocera zu *C. hislopi* im wesentlichen auf fehlerhafte Positionshomologien innerhalb des Alignments (generiert durch POY) zurückgeführt. Möglicherweise wurden diese Fehler durch die sehr restriktive Taxonauswahl der Anomopoda innerhalb der Cladocera ausgelöst. Einige bedeutsame Taxa der Anomopoda (z. B. weitere Chydoridae und Macrothricidae) wurden in den Analysen nicht in ausreichendem Maß berücksichtigt, da hier weitere Proben nicht zur Verfügung standen. Das Vorhandensein des Introns C im Gen EF-1 $\alpha$  in *C. hislopi* und den meisten Cladocera

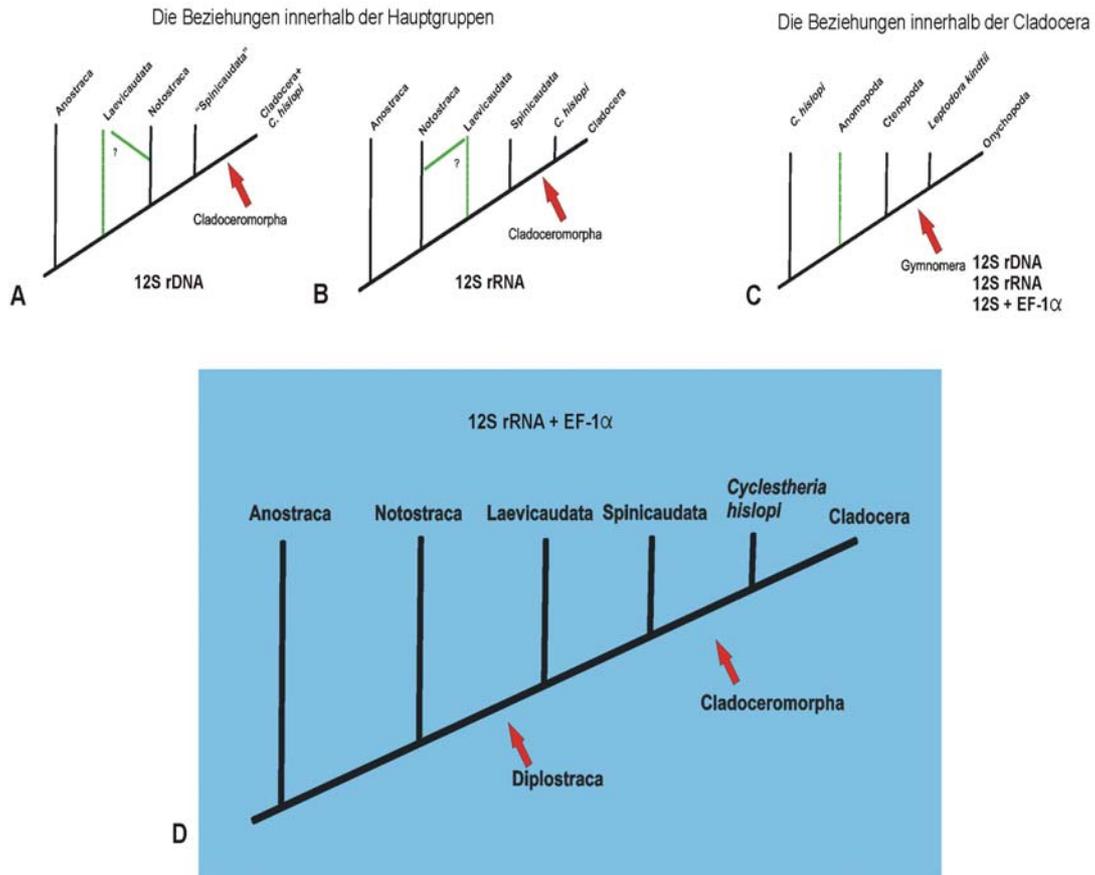


Abbildung 13: Zusammenfassung der in dieser Arbeit gezeigten Verwandtschaftshypothesen innerhalb der Branchiopoda. Die oberen drei Abbildungen stellen die Ergebnisse der (A) 12S rDNA Analyse (ohne Berücksichtigung der Sekundärstruktur) dar, (B) die Stellung der Haupttaxa der 12S rRNA Analyse (unter Berücksichtigung der Sekundärstruktur) und (C) die Beziehungen innerhalb der Cladocera, wie sie in den angegebenen Analysen Unterstützung finden. Unsichere Stellungen (Laevicaudata) bzw. Monophyla (Anomopoda) sind grün markiert. Die blaue Box (D) stellt die Hypothese dar, die aufgrund der Kongruenz verschiedener Berechnungsmethoden favorisiert wird (kombinierter Datensatz 12S rRNA + EF-1 $\alpha$ ).

spricht ebenfalls für die Monophylie der Cladoceromorpha (Abbildung 12) und wäre damit als Synapomorphie zu werten. In keiner der Analysen findet *C. hislopi* innerhalb der verbleibenden Spinicaudata, wie es das traditionelle Konzept vorschlägt, Unterstützung. Obwohl schon in der Vergangenheit morphologische Ähnlichkeiten zwischen *C. hislopi* und den Cladocera häufig Erwähnung fanden (Tasch, 1969; Martin & Cash-Clark, 1995), wurden erst in jüngster Zeit, zunnächst durch Olesen et al. (Olesen et al., 1996) aber auch durch die sich mehrenden Erkenntnisse aus molekularen Daten, die Konsequenzen für die Spinicaudata und im weiteren Sinne für die Conchostraca neu überdacht. Morphologische Übereinstimmungen von *C. hislopi* und den Cladocera wie 1) die direkte Entwicklung, 2) verschmolzene Komplexaugen und 3) das Vorhandensein eines Ehippiums könnten somit tatsächlich einige „sichtbare“ Apomorphien für die Cladoceromorpha sein.

Innerhalb der Hauptgruppen der Branchiopoda gestaltet sich die Diskussion der korrekten Position der Laevicaudata am schwierigsten. Die Einzelanalysen ergeben ein sehr unterschiedliches Bild. Auffällig ist hier, dass die Ergebnisse aus einem Genbereich von der angewandten Berechnungsmethode abhängig sind. Während die Maximum Likelihood Analysen der 12S rDNA (DNA=ohne Berücksichtigung der Sekundärstruktur) und auch 12S rRNA (RNA=unter Einbeziehung von Sekundärstrukturelementen im Alignment) ein Schwestergruppenverhältnis der Notostraca und Laevicaudata favorisieren, zeigen die Parsimonie Analysen zum einen eine zu allen Phyllopoda basale Stellung der Laevicaudata (12S rDNA), zum anderen ein Schwestergruppenverhältnis der Laevicaudata zu Spinicaudata und Cladoceromorpha (12S rRNA). In jedem Fall erhalten die erwähnten Splits keine nennenswerten Unterstützungen. Ähnlich verschieden fallen die Ergebnisse mit dem Gen EF-1 $\alpha$  aus. Die Kombination der Datensätze dagegen ergibt ein sehr einheitliches und damit bezüglich der Datensätze meines Erachtens nach überzeugendes Bild mit beiden Methoden, obwohl die Unterstützung der Monophylie der Diplostraca (mit einer basalen Stellung der Laevicaudata innerhalb der Diplostraca) nur moderat ist. Morphologische Merkmale wie: 1. Embryonen verbunden mit der dorsalen Verlängerung des Exopoditen (Olesen et al., 1996), 2. zweiklappiger Carapax (Walossek, 1993) und 3. Umbildung des ersten Thoracopodenpaars zum Klammerorgan (Martin & Belk, 1988); Olesen et al. (1996) erhärten die Monophylie der Diplostraca, obwohl diese Merkmale bezüglich ihrer phylogenetischen Aussagekraft nach wie vor heftig umstritten sind (Fryer, 1999; Olesen, 2000; Fryer, 2001; 2002; Olesen, 2002). Ein mögliches Schwestergruppenverhältnis der Laevicaudata zu den Spinicaudata (ohne *C. hislopi*) wie durch Negrea et al. (1999) diskutiert, kann in keinem Fall bestätigt werden. Weitere molekulare Analysen (Spears & Abele, 2000) und der EF-1 $\alpha$  Intronpositionen konnten bezüglich der Diplostraca keine überzeugende Unterstützung finden.

Die durchgeführten phylogenetischen Analysen zeigen für die vier Hauptgruppen der Cladocera (Anomopoda, Ctenopoda, Onychopoda und Haplopoda) übereinstimmend die Monophylie der Ctenopoda und (Haplopoda + Onychopoda) (Abbildung 13C). Die Anomopoda sind in fast allen Analysen paraphyletisch (Ausnahme: **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**B, wobei die gezeigte Monophylie nur schlecht unterstützt wird). Die Paraphylie wird jedoch aufgrund des unausgewogenen ``taxon samplings`` als möglicherweise artifiziell bewertet (siehe Kapitel: 4.2). Innerhalb der Anomopoda werden die Daphniidae gut unterstützt. Bezüglich der Stellung von

*Leptodora kindtii* als einzig bekannten rezenten Vertreter der Haplopoda wird das Gymnomera Konzept (Haplopoda + Onychopoda) favorisiert. Das Schwestergruppenverhältnis (oder zumindest eine sehr nahe Verwandtschaft) von *L.kindtii* zu den Onychopoda wird in fast allen Analysen deutlich, insbesondere aber in der Analyse des kombinierten Datensatzes (mit guter Unterstützung). Hinweise auf das vormals hypothetisierte Taxon Leptodorida/Eucladocera (Negrea et al., 1999; Spears & Abele, 2000) lassen sich in keiner Analyse finden. Die mögliche Schwestergruppenbeziehung von *L. kindtii* zu allen anderen Cladocera kann daher auf der Basis der vorliegenden Daten abgelehnt werden. Darüber hinaus wird eine nahe Beziehung der Ctenopoda zu den Gymnomera deutlich. Wenn gleich auch nur mit geringer Unterstützung, wird dieses Verhältnis in den Parsimonie Analysen direkt und in den Maximum Likelihood Analysen indirekt gezeigt. Unter Verwendung struktureller Komponenten der 18S und 28S rRNAs konnten Swain und Taylor (2003) jüngst das hier gewonnene Ergebnis bestätigen. Morphologisch bedeutet dies, dass die Spezialisierung der Beinsegmente der Anomopoda, Haplopoda und Onychopoda gegenüber den einfach aufgebauten, seriell angeordneten Beinen der Ctenopoda unabhängig voneinander entstanden ist oder bei den Ctenopoda sekundär verloren ging (Martin & Cash-Clark, 1995; Swain & Taylor, 2003) werten die einfach gebauten Beine der Ctenopoda als plesiomorph, was die Autoren dazu veranlasste, eine zu allen anderen Cladocera-Taxa basale Stellung der Ctenopoda zu favorisieren. Ältere molekulare Resultate der 16S rDNA Daten (Schwenk et al., 1998) bestätigen letztgenannte Hypothese. Schwenk et al. (1998) kommen zu dem Ergebnis, dass die Ctenopoda das zu allen anderen Cladocera basale Taxon sind (jedoch nur gering unterstützt).

Hingewiesen sei in diesem Zusammenhang auch auf das morphologische Merkmal „Vorhandensein eines Ehippiums“ als mögliche Synapomorphie der Cladoceromorpha. Innerhalb der Cladocera verfügen nur die Anomopoda über ein Ehippium. *Cyclestheria hislopi* verfügt über eine dem Ehippium ähnliche Struktur mit einer ähnlichen Funktion (Aufbewahrung der Eier), die Homologie zum Ehippium der Anomopoda ist jedoch höchst fraglich (Roessler, 1995). Inwiefern dieses Merkmal einem Grundmuster der Cladoceromorpha zuzuordnen wäre, hängt damit von einer gesicherten Homologie des Ehippiums von *C. hislopi* und den Anomopoda ab. Die Ctenopoda und Gymnomera besitzen kein Ehippium. Auf der Basis des hier gewonnenen Ergebnisses, nebst der Bestätigung durch Swain und Taylor (2003), einer basalen Stellung der Anomopoda innerhalb der Cladocera, muss das Vorhandensein eines Ehippiums innerhalb der Cladocera als plesiomorph bewertet werden. Damit kann das Fehlen eines Ehippiums als abgeleitetes Merkmal die Ctenopoda + Gymnomera vereinen.

Hier bedarf es sicherlich weiterer eingehender morphologischer und entwicklungsbiologischer Untersuchungen, um die Frage des Merkmalkomplexes „Ehippium“ zu klären.

Zusammenfassend wird auf der Basis der Analysen des kombinierten Datensatzes die Paraphylie der Conchostraca favorisiert durch 1. das Ausscheiden von *C. hislopi* aus dem Monophylum der Spinicaudata und 2. die Paraphylie von (Laevicaudata + Spinicaudata). Diese Paraphylie betrifft allerdings nicht die hier favorisierte Hypothese zur Monophylie der Diplostraca. Das Konzept der Diplostraca bedarf jedoch weiterer Reevaluierung, insbesondere mit neuen molekularen Datensätzen und auch unter Einbeziehung nicht analysierter Taxa der Laevicaudata wie *Lynceiopsis* und

*Paralimnetis*. Desweiteren findet das Cladoceromorpha Konzept gute Unterstützung, wobei *C. hislopi* die Schwestergruppe zu den monophyletischen Cladocera ist. Innerhalb der Cladocera finden sich gute Argumente für die Monophylie der Gymnomera (Haplopoda + Onychopoda) und auch einige Hinweise für eine mögliche Schwestergruppenbeziehung der Ctenopoda (hier nur Sidiidae) zu den Gymnomera. An dieser Stelle sei noch einmal auf die Bestätigung dieser Hypothese von Swain und Taylor (2003) hingewiesen.

### 3.1.3.2 Betrachtungen zur Evolution von Introns im Gen EF-1 $\alpha$

Eine phylogenetische Bewertung der Verteilung spliceosomaler Introns im Gen EF-1 $\alpha$  kann nur über die Abschätzung plesiomorpher oder apomorpher Intronpositionen erfolgen. Um hier ein mögliches Evolutionsszenarium aufstellen zu können, ist es notwendig, vorhandene Literaturdaten über EF-1 $\alpha$  Intronpositionen einzubeziehen. Wada et al. (2002) stellte eine detaillierte Analyse der Intronpositionen und deren mögliche Evolution innerhalb der Deuterostomia vor. Carapelli et al. (2000) untersuchten die phylogenetische Verteilung der Intronpositionen in den Diplura (Hexapoda). Desweiteren existieren Daten über die Lage zweier Introns in Hymenoptera (Sanchis et al., 2001), *Drosophila melanogaster* (Diptera) (Hovemann et al., 1988) und *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (Wilson, 1998). Abbildung 14 zeigt eine mögliche Evolution der Introns unter Berücksichtigung der vorhandenen Literaturdaten. Zu diesem Zweck wird die Verteilung der Introns anhand des in dieser Arbeit favorisierten Branchiopoda Stammbaums (Abbildung 11 und Abbildung 13D) diskutiert.

Demnach ergeben sich für Intron A zwei Möglichkeiten.

1. Unter der Annahme, Intron A ist spätestens an der Basis der Bilateria insertiert (Abbildung 14, links oben), würde dies bedeuten, dass das Intron innerhalb der Phyllopoda zweimal unabhängig voneinander verloren ging.
2. Intron A ging vor Abspaltung der Phyllopoda verloren, mit der Konsequenz der zweimaligen, unabhängigen Neuinserierung bei den Laevicaudata und Cladoceromorpha (Abbildung 14, oben rechts).

Daraus resultiert unter Zugrundelegung des Parsimonie Prinzips, dass die erste Hypothese aufgrund der geringeren Schrittzahl (2 gegenüber 3) Unterstützung findet.

Für Intronposition E ergeben sich ebenfalls zwei Möglichkeiten.

1. Intron E war bereits an der Basis der Metazoa oder Bilateria vorhanden. Die Konsequenz wäre der zweimalige Verlust innerhalb der Notostraca und innerhalb des Monophylums Spinicaudata (exclusive *C. hislopi*) + Cladoceromorpha (Abbildung 14, zweite Reihe links).
2. Intron E ist vor der Abspaltung der Phyllopoda verloren gegangen und müsste demnach zweimal unabhängig neu entstanden sein, bei den Anostraca und Laevicaudata (Abbildung 14, zweite Reihe rechts).

Beide Hypothesen sind mit je zwei Schritten gleich sparsam. Dennoch wird hier die erste These favorisiert, da die unabhängige Neuerwerbung eines Introns an exakt der gleichen Position für recht unwahrscheinlich gehalten wird (Wada et al., 2002). Darüberhinaus wird eine direkte Korrelation von Introns der Phase 0 und einer sehr frühen Insertion an der Basis der Eukaryonten für möglich gehalten (De Souza et al., 1998). An dieser Stelle sollte jedoch der Umstand Erwähnung finden, dass es für die Evolution von Intron E eine sparsamere Erklärung gibt (mit nur einem Schritt), nämlich der einmalige Verlust von Intron E an der Basis eines putativen Monophylums bestehend aus Notostraca, Spinicaudata und Cladoceromorpha, wie es die Parsimonie Analyse der 12S rDNA (Abbildung 4B) favorisiert. Die Konsequenz wäre, dass der einmalige Verlust von Intron E als Synapomorphie dieses Monophylums zu werten wäre. Die Beobachtung, dass Introns häufig konvergent verloren gehen und damit Verluste eine eher zufällige Verteilung (phylogenetisch nicht informativ) aufweisen, spricht allerdings gegen die Annahme, dass ein Verlust als phylogenetisches Signal gewertet werden kann (Wada et al., 2002) (siehe hierzu auch weiter unten: Intronverteilung innerhalb der Cladocera).

Die Existenz der Intronpositionen B, C und D wurde bislang nur innerhalb der Phyllopoda beobachtet, d. h. anhand des vorhandenen Datensatzes ist zu vermuten, dass es sich hier um Neuerwerbungen innerhalb der Phyllopoda handelt (Abbildung 14, dritte Reihe). Innerhalb der Cladocera zeigt die Verteilung der Introns C und D kein einheitliches Muster. Arten, wie z.B. *Diaphanosoma* und *Ceriodaphnia* müssen demnach unabhängig voneinander die für Cladocera typischen Introns (C und / oder D) verloren haben.

Da die Intronpositionen A und E offensichtlich plesiomorphen Ursprungs sind, scheiden sie für eine phylogenetische Betrachtung innerhalb der Branchiopoda aus. Intron B kann ebenfalls nicht in Betracht gezogen werden, da dies ein autapomorphes Merkmal der Notostraca zu sein scheint. Einzig Intronpositionen C und D lassen eine phylogenetische Aussage zu:

1. Das Schwestergruppenverhältnis von *C. hislopi* zu den Cladocera wird repräsentiert durch die Hypothese des Neuerwerbs eines Introns in Position C.
2. Die Monophylie der Cladocera wird gestützt durch den Neuerwerb des Introns D. Beide Hypothesen hätten demnach den mehrfach unabhängigen Verlust der Introns innerhalb der Monophyla zur Konsequenz.

In Abbildung 14B wird Gewinn und Verlust von Introns im Gen EF-1 $\alpha$  zusammenfassend dargestellt. Introns A und E müssen während der Evolution der Phyllopoda zweimal unabhängig voneinander verloren gegangen sein, in der Linie zu den Notostraca und der Kronengruppe der Spinicaudata + Cladoceromorpha. Intron B ist einmalig in der Stammart der Notostraca inseriert. An der Basis der Cladoceromorpha ist eine Neuerwerbung (Intron C) zu beobachten. Intron C ist somit als eine Apomorphie der Cladoceromorpha aufzufassen. Intron D stellt wiederum eine Apomorphie der Cladocera dar. Dieses mögliche Szenarium umfasst sechs Schritte unter der Annahme, die Verluste der Introns A und E sind in den Notostraca als einmaliges Ereignis zu interpretieren. Die Annahme zweier voneinander unabhängigen Deletionen der fraglichen Introns würde die Schrittzahl auf sieben Schritte erhöhen.

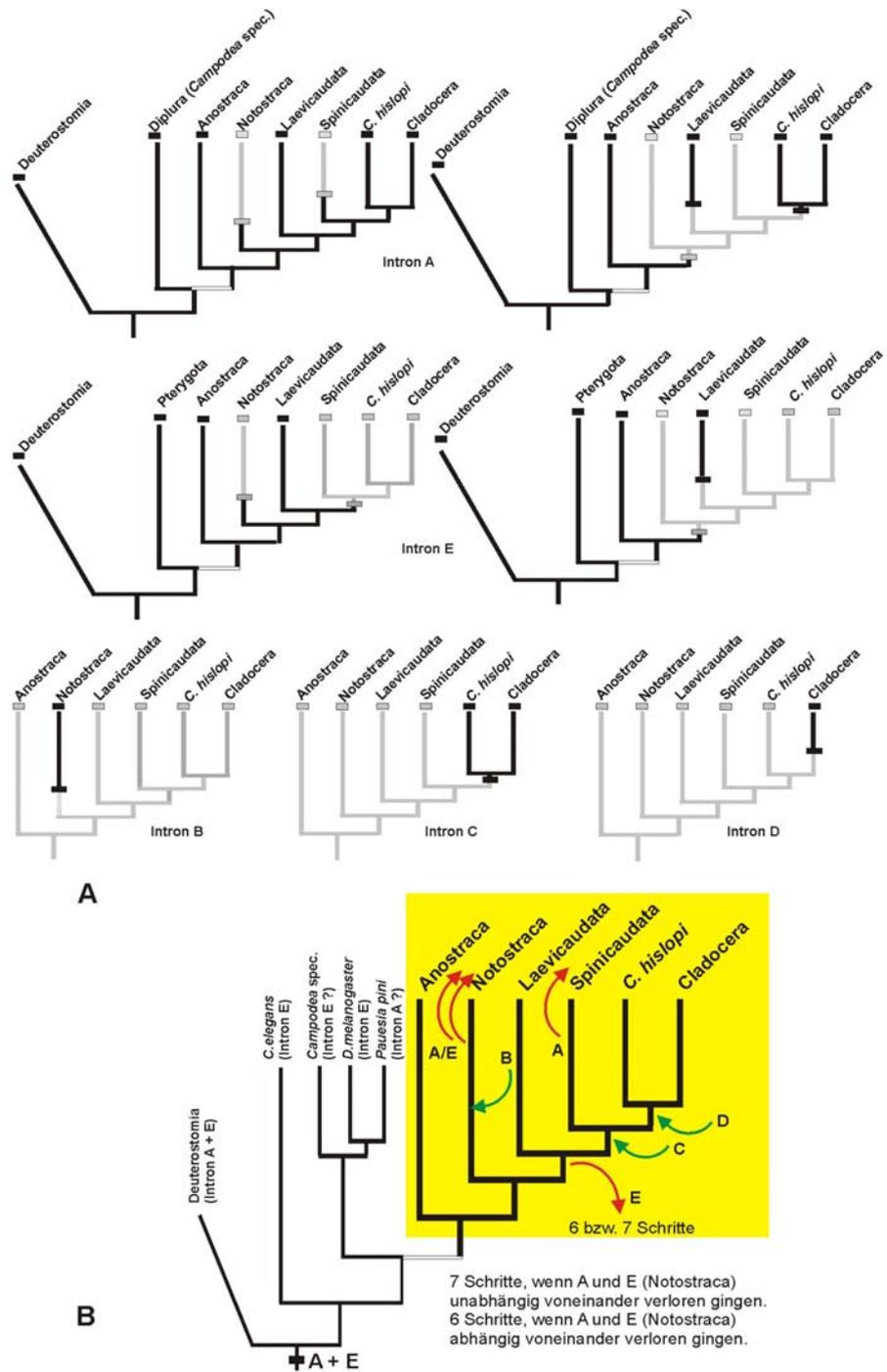


Abbildung 14: Betrachtung von Gewinn und Verlust der Introns A-E des Gens EF-1 $\alpha$ . Es wurde die in Abbildung 13D favorisierte Hypothese zur Phylogenie der Branchiopoda zugrunde gelegt. (A) Hypothese zur Evolution der Introns A-E (Insertion: schwarz, Deletion: grau). (B) Zusammenfassung von Insertion und Deletion der Introns unter Berücksichtigung aller vorhandenen Daten der Bilateria. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Anhand dieser gewonnenen Daten kann darüber hinaus vermutet werden, dass Introns B, C, D als Neuerwerbung innerhalb der Phyllopoda eine Bestätigung der ``intron late'' Hypothese sind (siehe auch Kapitel: 1.2.3).

Die Datenlage für die Eukaryonten stellt sich folgendermaßen dar (SPAN database: <http://www.molevol.org/camel/projects/introns/span.shtml>): Im Bereich der Protozoa wurden bislang keine Introns in diesem Gen nachgewiesen. Pflanzen und Pilze weisen, soweit bekannt, keine Introns in denen für Bilateria nachgewiesenen Positionen (A-E) auf. Die Intronpositionen A und E werden bei mehreren Haupttaxa innerhalb der Bilateria (Hexapoda, Nematoda, Deuterostomia) nachgewiesen. Lage und Vorhandensein von Introns im Gen EF-1 $\alpha$  bei Cnidaria sind unbekannt, d.h. der Erwerb der Introns A und E kann spätestens für die Stammlinie der Bilateria vermutet werden. Ob die Introns A und E eine Neuerwerbung der Bilateria sind oder schon in der Stammlinie der Metazoa vorhanden waren, kann hier nicht gesagt werden, da der genaue Zeitpunkt des Auftretens aufgrund fehlender Daten nicht bestimmt werden kann. Introns in den Positionen B, C und D werden erstmals innerhalb der Branchiopoda beobachtet. Die sparsamste Erklärung hierfür ist der Neuerwerb dieser Introns innerhalb der Phyllopoda (``intron late'').

## 3.2 TEIL B: Die phylogenetischen Beziehungen der Astacoidea (Astacida, Decapoda)

### 3.2.1 Einleitung zum Crustaceataxon Astacida

Die sicherlich mit zu den bekanntesten Vertretern der Krebse gehörenden Flusskrebse spielen als Forschungsobjekte in vielen zoologischen Disziplinen aber auch wirtschaftlich als Nahrungsmittel eine große Rolle (Scholtz, 1995).

Wie schon der englische Trivialname "freshwater crayfish" verrät, sind die Astacida i. d. R. süßwasserbewohnend. Die Astacida sind weltweit sowohl in der Nord- als auch in der Südhemisphäre verbreitet, wobei im tropischen Gürtel nahe des Äquators und interessanterweise auch auf dem afrikanischen Festland, sowie auf dem indischen Subkontinent keine Flusskrebse vorkommen.

Ein großer Teil des mitteleuropäischen Flusskrebsbestandes ist durch das Auftreten der Krebspest (erstmalig ca. 1860 im Bereich des Po, Italien) vernichtet worden. Der Erreger der Krebspest ist der Fadenpilz<sup>2</sup> *Aphanomyces astaci*, dessen Entdeckung als Erreger erst Anfang des 20. Jahrhunderts gelang. Hochempfindlich für die Krebspest sind alle nicht nordamerikanischen Flusskrebsarten, die nordamerikanischen Spezies der Cambaridae und Pacifastacidae gelten als unempfindlich. Das Auftreten der Erkrankung nach 1970 ist mit Ausnahme der Türkei auf den Import der nordamerikanischen Spezies *Pacifastacus leniusculus* (PCR-Nachweis) zurückzuführen. Um den wirtschaftlichen Verlust aufzufangen, bedingt durch das fast völlige Aussterben des europäischen Edelkrebse *Astacus astacus*, wurde der nordamerikanische Flusskrebs *Orconectes limosus* (Cambaridae) ausgesetzt, was für regionale Edelkrebsbestände verheerende ökologische Folgen mit sich führt.

#### *Die Position der Astacida innerhalb der Reptantia (Decapoda)*

Die Decapoda werden im klassischen Sinn geteilt in die Natantia (garnelenartige Crustaceen) und die Reptantia (z.B. Langusten, Hummer, Flusskrebse), wobei die Natantia paraphyletisch sind (Scholtz & Richter, 1995), die Reptantia als Monophylum hingegen akzeptiert sind (Ax, 1999).

Traditionellerweise werden die Astacida innerhalb der Reptantia mit den Homarida in einem Monophylum Astacura vereinigt (Gruner, 1993). Scholtz und Richter (Scholtz, 1995) begründeten allerdings die Nicht-Monophylie der Astacura. Ihrer phylogenetischen Analyse zufolge sind die Homarida nicht näher mit den Astacida verwandt. Sämtliche morphologischen Übereinstimmungen beider Gruppe seien als plesiomorph zu bewerten. Dieser Analyse zufolge gehören die Flusskrebse zusammen mit den Thalassinida, Anomura und Brachyura zu der großen Gruppe der Fractosternalia

---

<sup>2</sup> Informationen über die Krebspest sind der Internetseite der „Arbeitsgemeinschaft wirbellose Tiere der Binnengewässer“ (<http://www.wirbellose.de/krebspest.html>) entnommen.

(Autapomorphie der Fractosternalia: 8. Thorakalsternit beweglich). Die Homarida (8. Sternit unbeweglich) sind vermutlich die Schwestergruppe zu den Fractosternalia. Die Position der Astacida innerhalb der Fractosternalia ist allerdings unklar (Abbildung 15).

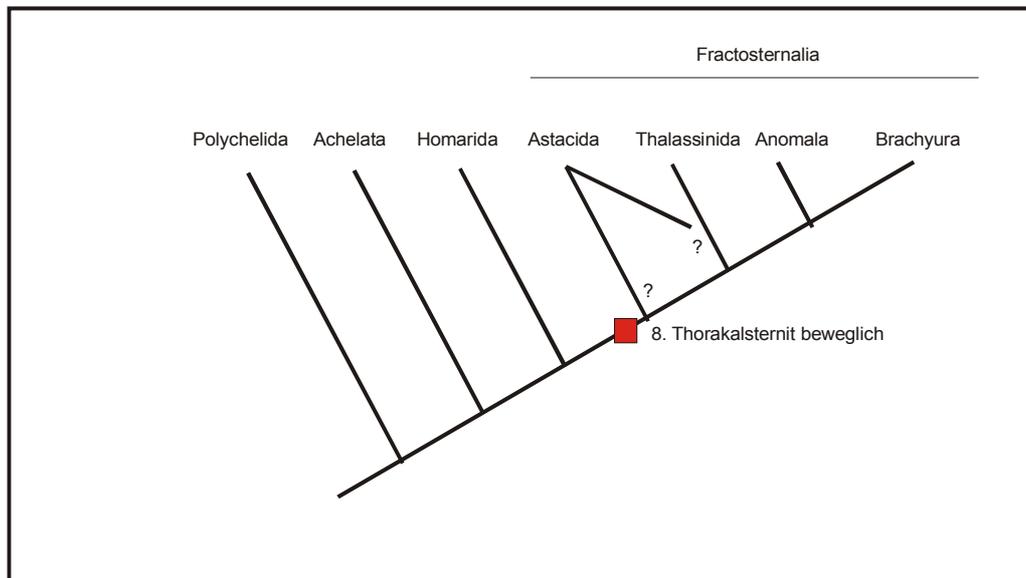


Abbildung 15: Das System der Reptantia (Decapoda) sensu Scholtz & Richter (1995).

Molekulare Daten (18s, 16s und 28s rDNA) widersprechen dieser These und favorisieren die traditionelle Ansicht eines Schwestergruppenverhältnisses zwischen Astacida und Homarida (Crandall et al., 2000).

Die Astacida werden in drei große Gruppen unterteilt: Die Astacidae und Cambaridae, die zu den Astacoidea zusammengefaßt werden und die Parastacoidea, die den Astacoidea gegenübergestellt werden (Hobbs Jr., 1988).

Die Frage, ob die Astacida monophyletisch sind, wurde bislang kontrovers diskutiert. Aufgrund des Vorhandenseins von Gonopoden (Petasmata) bei den Astacoidea und des Fehlens der Petasmata bei den Parastacoidea wurde von einigen Autoren die unabhängige Entstehung der Astacoidea und Parastacoidea vertreten (Huxley, 1880; Smith, 1912). Ortmann (1897) hypothetisierte hingegen die Monophylie der Astacida. Auf der Basis einer phylogenetischen Analyse sensu Hennig von sowohl embryonalen - als auch Adultmerkmalen schlußfolgert Scholtz (1993) ebenfalls die Monophylie der Astacida, wobei die Astacoidea die Schwestergruppe zu den Parastacoidea wären.

Die Astacoidea sind ausschließlich in der nördlichen Hemisphäre verbreitet, die Parastacoidea besiedeln die südliche Hemisphäre. Die auf der Nordhalbkugel lebenden Astacidae (z.Z. 12 anerkannte Arten) besiedeln Europa, Vorderasien und Nordamerika, westlich der Rocky Mountains. Die Cambaridae (ca. 200 Arten) leben im Osten und im Zentrum Nord- und Mittelamerikas und in Ostasien. Die Parastacidae auf der Südhalbkugel besiedeln Südamerika, Madagaskar, Neu-Guinea,

Neuseeland und am artenreichsten kommen sie in Australien vor (ca. 100 Arten). Abbildung 16 zeigt schematisch die weltweite Verteilung.

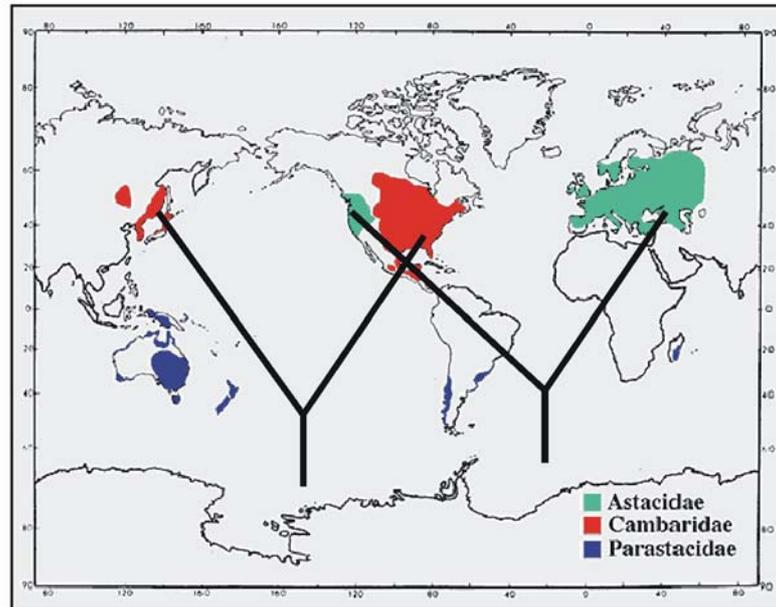


Abbildung 16: Weltweite Verteilung der Astacida ([www.http://phylogeny.arizona.edu/eukaryotes/animals/arthropoda/crustacea/decapoda/astacidea/astacidea.html](http://phylogeny.arizona.edu/eukaryotes/animals/arthropoda/crustacea/decapoda/astacidea/astacidea.html)). Die Dichotomien zeigen die Monophyla der Cambaridae (Nordostamerika und Asien) und Astacidae (Nordwestamerika und Europa).

Die zwei großen Taxa innerhalb der Astacida (Astacoidea und Parastacoidea) bilden jeweils ein gut begründbares Monophylum. So besitzen die Astacoidea z.B rückwärtsgekrümmte Haken an den distalen Gliedern des ersten Pereiopoden in den ersten Juvenilstadien. Die Kiemen in den 6. und 7. Thoraxsegmenten sind bei den Astacoidea zu fädigen Anhängen reduziert. Die Parastacoidea tragen in den ersten beiden postembryonalen Stadien spezielle Haken an den Dactyli der 4. und 5. Pereiopoden um sich am Muttertier festzuhalten. Desweiteren ist der Hinterrand des Schwanzfächers nur schwach kalzifiziert und daher weich.

Innerhalb der Astacoidea werden die Cambaridae ebenfalls als gesichertes Monophylum betrachtet. Insbesondere die Ausbildung einer Spermathek (Annulus ventralis) bei den Weibchen, die bei den Astacidae fehlt, dient hierbei als Argument für die Monophylie der Cambaridae. Die Monophylie der Astacidae ist nicht gesichert zu begründen. Hier wird z.B. das Vorhandensein einer Borstenanlage rundum das Telson im ersten postembryonalen Stadium (Holdich & Reeve, 1988) als mögliche Autapomorphie diskutiert.

In Verbindung mit der Phylogenie der Astacida stellt sich auch die Frage nach der einmaligen oder mehrmaligen unabhängigen Einwanderung in das Süßwasser. Die Tatsache, dass alle rezenten Astacida Süßwasserbewohner sind, legt den Schluss nahe, dass bereits die Stammart der Astacida in Süßgewässern lebte (Scholtz, 1995). Scholtz' Ansicht zufolge deuten gemeinsame Merkmale der Astacida, wie z.B. das Fehlen der Zoealarve und das Anheften der Jungtiere mittels eines Telsonfadens als Schutz vor Verdriftung in Fließgewässern, auf eine Anpassung an Süß- bzw.

Fließgewässer hin. Dieser Merkmalskomplex ist zugleich eine Apomorphie der Astacida, d.h. auch die Stammart der Astacida verfügte über diese Merkmale. Somit wird die einmalige Einwanderung der Astacida in Süßgewässer angenommen. Dieser Annahme zufolge müßten die Vorfahren der rezenten Astacida bereits Pangaea besiedelt haben, bevor der Superkontinent zerfallen ist, spätestens also vor ca 225 bis 190 Millionen Jahre, zur Zeit der Trias. Paläontologische Daten von Überresten decapoder Krebse aus Süßwassersedimenten der Trias, die auf Flußkrebsverwandtschaft hinweisen Hasiotis und Mitchell (1989), stützen diese Hypothese. Morphologische Unterschiede der rezenten Astacoidea (nördliche Hemisphäre) und der Parastacoidea (südliche Hemisphäre), müssen sich demnach nach dem Zerfall von Pangaea in Laurasia und Gondwana (Zeitalter Jura), gebildet haben. Im Gegensatz dazu ist die geographische Verbreitung der Cambaridae und Astacidae auf der nördlichen Halbkugel nicht eindeutig zu erklären. Sofern es sich bei beiden Taxa um Monophyla handelt (dies ist zumindest bei den Astacidae umstritten), muß die „verschränkte“ Verbreitung der Astacidae (Nordwestamerika und Europa) und der Cambaridae (Mitte und Osten Nordamerikas und Ostasien) erklärt werden (Abbildung 16): Scholtz (1995) hypothetisiert eine Verbreitung der Astacidae im nördlichen Bereich Laurasiens und Cambaridae im südlichen Bereich Laurasiens. Nach Zerfall von Laurasia muß es zu einer weiteren Radiation der Astacidae im europäisch-asiatischen Raum und der Cambaridae im nordamerikanischen Raum gekommen sein (Schram, 2001). Folglich wären die rezenten Vertreter der Astacidae im Nordwesten Amerikas und die der Cambaridae in Ostasien Reliktpopulationen, die durch Gebirgszüge isoliert worden sind.

Vor dem Hintergrund der hier beschriebenen Probleme bezüglich der Radiation der Astacoidea gilt es zu klären, ob die Taxa Astacidae und Cambaridae monophyletisch oder möglicherweise paraphyletisch sind und in welcher verwandtschaftlichen Beziehung sie zueinander stehen.

### 3.2.2 Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der Astacoidea

Um einen Beitrag zur Klärung der verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der Astacoidea zu leisten, wurde von 13 Spezies (Astacoidea) und drei Spezies (Parastacoidea) das 12S rRNA Gen (3. Domäne) und das ebenfalls mitochondrial codierte Proteingen *cox1* (hier allerdings nur eine Spezies der Parastacoidea) sequenziert.

Die phylogenetische Berechnung des 12S Gens wurde unter der zusätzlichen Verwendung von Sequenzen einiger weiterer Taxa der Parastacoidea aus der Datenbank durchgeführt.

- *Geocharax falcata* (Munasinghe et al., 2003), (AF492785)
- *Engaeus strictifrons* (Munasinghe et al., 2003), (AF492786)
- *Euastacus bispinosus* (Munasinghe et al., 2003), (AF492787)
- *Cherax quinquecarinatus*, Haplotypus 4 (Munasinghe et al., 2003), (AF492774)

Für das *cox1*-Alignment standen nur 14 Taxa zur Verfügung. Aus diesen Gründen wurde auch der kombinierte Datensatz auf der Basis von 14 Taxa berechnet.

Sowohl morphologische (Scholtz, 1993) als auch molekulare Analysen (Crandall et al., 2000) ergeben zweifelsfrei die Monophylie der Astacida mit den Parastacoidea der südlichen Hemisphäre als Schwestergruppe zu den Astacoidea der nördlichen Hemisphäre. Daher bieten sich für eine phylogenetische Betrachtung der Astacoidea als Außengruppe Vertreter des Taxons der Parastacoidea an. Die Analysen werden bezüglich der folgenden Fragestellungen dargestellt.

- Bilden die beiden Hauptgruppen der Astacidae und Cambaridae jeweils ein Monophylum?
- Sollten die Astacidae paraphyletisch sein, in welcher phylogenetischen Beziehung stehen ihre Teiltaxa zu den Cambaridae und *vice versa*?
- Wie kann ein mögliches Szenarium der Radiation der Astacoidea in der nördlichen Hemisphäre anhand der Ergebnisse beschrieben werden?
- Welche phylogenetische Position nimmt der bislang nicht beschriebene Marmorkrebs innerhalb der Astacoidea ein?

### 3.2.2.1 ``Likelihood mapping`` zur Überprüfung des phylogenetischen Signals der 12S rRNA und des *cox1* Gens

Um das phylogenetische Signal der sequenzierten Bereiche des 12S Gens, *cox1* und des kombinierten Datensatzes vorab zu testen, wurde die Methode des ``likelihood mappings`` aus dem Programm Tree-Puzzle angewendet (siehe auch Kapitel: 2.2.7.5.6). Abbildung 17 zeigt jeweils einen Plot der Verteilung der P-Vektoren und die prozentuale Auswertung für die Bereiche innerhalb des Dreiecks. In Abbildung 17A ist das Ergebnis des 12S rRNA Datensatzes für 20 Taxa dargestellt. Der Anteil an nicht aufgelösten Quartetten im Zentrum ist mit 12,5% mäßig. Die prozentualen Anteile für eine „Baumhaftigkeit“ sind dagegen recht hoch (Eckpunkte des Dreiecks, insgesamt 83,4%). Für das *cox1* Gen (14 Taxa) wurde die Auswertung zunächst für alle Codonpositionen durchgeführt und im weiteren nur für die erste und zweite Triplettspositionen (Abbildung 17B). Die Betrachtung aller Codonpositionen (obere Abbildung 17B) resultiert in einem Ergebnis, dass dem der 12S Berechnung sehr ähnlich ist. Auch hier ist der Anteil der nicht aufgelösten Topologien mäßig, während die prozentualen Anteile der Eckbereiche relativ hoch ist (insgesamt 81,3%). Die Eliminierung der dritten Codonposition (untere Abbildung 17B) resultiert dagegen in einem sprunghaften Ansteigen der unaufgelösten Quartette und legt den Schluß nahe, dass das phylogenetische Signal relativ gering ist. Eine entsprechende phylogenetische Analyse würde einen sehr hohen Anteil an Polytomien aufweisen. Für den kombinierten Datensatz von ebenfalls 14 Taxa liegen daher alle Positionen des *cox1* Gens, sowie der 12S zugrunde (Abbildung 17C). Der Anteil der vollständig aufgelösten Topologien erhöht sich auf 84,5%. Der Anteil der nicht aufgelösten Topologien verringert sich auf 11,6%, was sicherlich auch mit der höheren Anzahl an Alignmentpositionen zusammenhängt (Strimmer & von Haeseler, 1997). Der relativ hohe Anteil an aufgelösten Topologien lässt vermuten, dass viele Dichotomien mit einer recht hohen Unterstützung bewertet werden. Für die folgende phylogenetische Analyse des *cox1* Datensatzes liegen aufgrund des Ergebnisses des ``likelihood mappings`` alle Codonpositionen zugrunde.

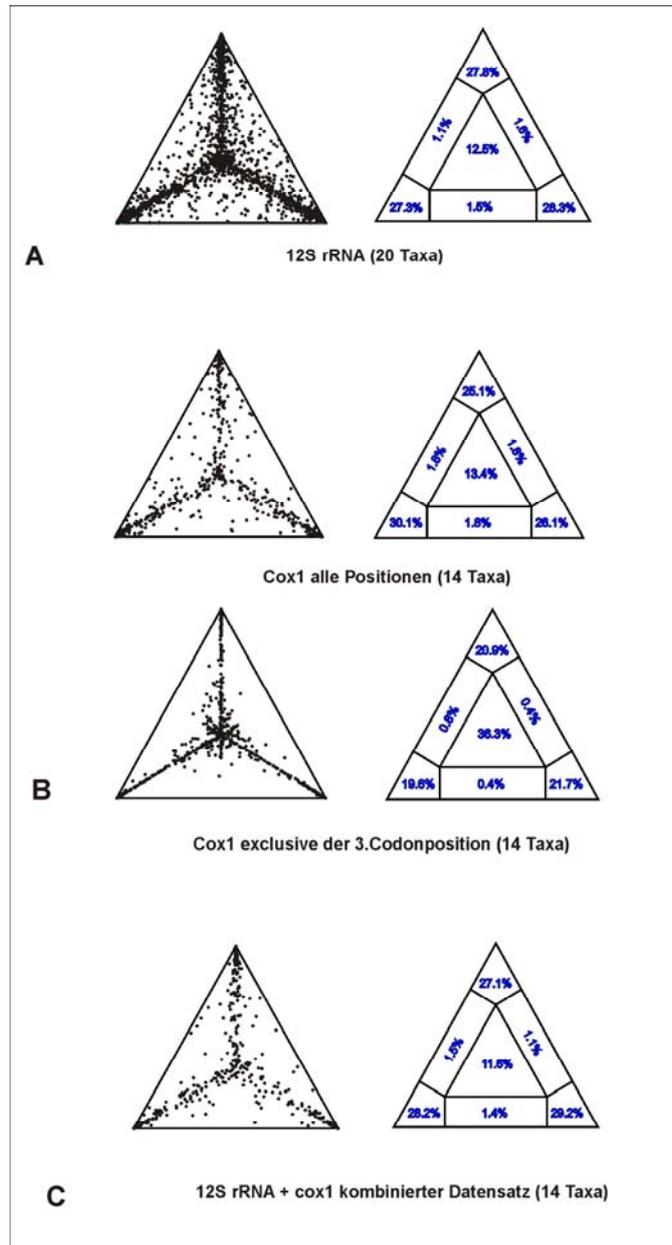


Abbildung 17: "Likelihood mapping" Test zur Abschätzung des phylogenetischen Signals der sequenzierten Genbereiche 12S rRNA und cox1 unter dem Modell HKY+ $\Gamma$ 4. Die rechte Spalte zeigt jeweils die Verteilung der Vektoren als Plots für die verschiedenen Datensätze. Die linke Spalte zeigt jeweils die prozentuale Verteilung der Punkte in den einzelnen Bereichen des Dreiecks.. (A) 12S rRNA Datensatz von 20 Taxa). (B) cox1 Datensatz von 14 Taxa unter Berücksichtigung aller Codonpositionen (oben) und exclusive der 3. Codonposition (unten). (C) "Likelihood mapping" aller Merkmale des kombinierten Datensatzes (12S + cox1).

### 3.2.2.2 Die 12S rRNA Analyse

Das in Clustal X unter „default“ Optionen erstellte Alignment weist verhältnismäßig wenig "gaps" auf (insgesamt elf "gaps" in den kürzesten Sequenzen). Nach einem entsprechenden Vergleich des Alignments mit dem Sekundärstrukturmodell für *Artemia* (Abbildung 5) stellte sich heraus, dass

sämtliche ``gaps`` innerhalb der unpaaren Bereiche liegen (Einzelstrangbereich stromabwärts des ``stems`` 32 und zwischen den ``stem``-Hälften 36 / 38, 40 / 40', 42 / 42', und 42 / 47'). Es spielte für den Vergleich keine Rolle, welches Sekundärstrukturmodell herangezogen wurde. Alle vorhandenen ``stem``-Bereiche wurden durch das Programm Clustal X korrekt aligned. Der phylogenetischen Analyse wurde daher dieses Alignment mit einer Länge von 264 Positionen zugrunde gelegt.

Für die Maximum Likelihood Berechnung erwies sich das Modell HKY+ $\Gamma$ 4 als adäquat. Die Annahmen anderer Modelle resultierten in jeweils geringfügig, nicht signifikant niedrigeren Likelihood Werten. In Abbildung 18 ist das Resultat der 12S rRNA Analyse dargestellt. (A) zeigt den ``50% majority rule consensus`` Baum (logL -1812.87) aus insgesamt 988 errechneten Topologien. Diese Topologien wurden einem K-H-Test unterzogen. Dabei zeigte sich, dass lediglich ca. 25% aller Topologien schlechter als die beste Topologie sind, d.h. der erstellte Consensusbaum ergibt sich aus der besten (logL -1802.99) und einem Großteil der nicht signifikant schlechteren Topologien. Abbildung 18B zeigt das ``most parsimonious`` Cladogramm mit 331 Schritten. Es wurde keine Gewichtung der Positionen angenommen.

Beide Cladogramme sind im wesentlichen kongruent. Weder das Taxon Cambaridae noch das Taxon Astacidae wird als monophyletisch unterstützt. Monophyletisch hingegen erscheinen die Cambaridae aus Nordostamerika, die in Europa lebenden Astacidae und die asiatische Gattung *Cambaroides*. In beiden Analysen wird die asiatische Gattung *Cambaroides* als basales Taxon mit guter Unterstützung angenommen, während die nordamerikanischen Cambaridae das Schwestertaxon der europäischen Astacidae bilden. Überraschend ist die Stellung der westamerikanischen Spezies *Pacifastacus leniusculus* (Astacidae). In beiden Analysen bildet sie ein Schwestergruppenverhältnis zu den amerikanischen Cambaridae. Dieses Monophylum wird aber nur mäßig (QP 62%) bis schlecht (BA <50%) unterstützt.

Um die Möglichkeit des Phänomens der ``long branch attraction`` von *P. leniusculus* zu den Cambaridae zu überprüfen, wurde eine entsprechende phylogenetische Analyse ohne *P. leniusculus* durchgeführt. Das Resultat ergibt, dass eine eventuell artifizielle Aufspaltung dieses Taxons keinen Einfluss auf das Schwestergruppenverhältnis der amerikanischen Cambaridae zu den europäischen Astacidae hat (nicht gezeigt).

Der einzige Unterschied in beiden hier gezeigten Analysen betrifft die Verhältnisse innerhalb der *Cambaroides*. Diese sind in der Parsimonie Analyse vollständig aufgelöst, wenn auch ohne nennenswerte Unterstützung. Im Maximum Likelihood Dendrogramm werden die verwandtschaftlichen Verhältnisse dagegen nicht aufgelöst.

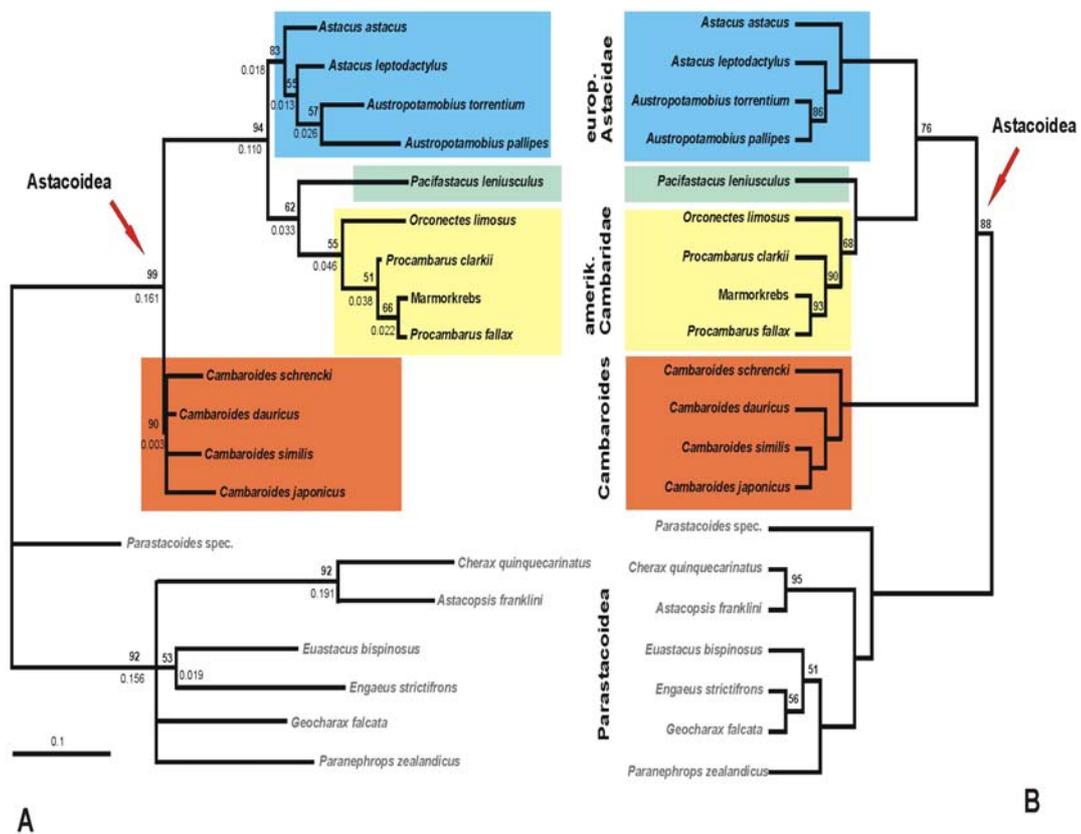


Abbildung 18: Phylogenetische Analyse der 12S rRNA (3. Domäne) der Astacoidea (Außengruppe: Parastacoidea). Das Alignment umfasst 264 Positionen. (A) Maximum Likelihood Analyse; Modell HKY+Γ4. Quartet- Puzzle- Dendrogramm (50% majority rule) mit einer Wahrscheinlichkeit  $\log L. -1812.87$ . Die Unterstützungen oberhalb der Dichotomien sind als "QP- support", die Astlängen unterhalb der Verzweigungen angegeben. (B) "Most parsimonious" Cladogram mit 331 Schritten. Es wurde keine gewichtung der 91 Parsimonie- informativen Positionen vorgenommen. Die "bootstrap" Analyse beruht auf 1000 Replikaten (>50%). Parsimonie Programme: Nona, Winclada.

### 3.2.2.3 Die Analyse des *cox1* Gens

Für diese Berechnung werden die hier generierten Daten für 14 Taxa verwendet. Als Außengruppe wird *Astacopsis franklini* (Parastacoidea) eingesetzt. Das erstellte Nukleotidalignment (Clustal X) weist keine Ambiguitäten auf und hat eine Länge von 423 Positionen. Aufgrund des ``likelihood mapping`` Ergebnisses wurden den Analysen alle Codonpositionen zugrunde gelegt. Abbildung 19 zeigt (A) den Quartett Puzzle-Stammbaum (``50% majority rule consensus``, logL -2172.60) aus 448 getesteten Topologien (13% aller Topologien sind signifikant schlechter als die beste ML Topologie mit logL -2159.46). Der Unterschied zur besten Topologie besteht in der Stellung von *Orconectes limosus*. Diese Spezies stellt in der ``best ML`` Topologie das basale Taxon der amerikanischen Cambaridae dar. Der hier gezeigten ML Berechnung ist das ``most parsimonious`` Cladogramm mit 383 Schritten gegenübergestellt (Abbildung 19B).

Das Ergebnis zeigt Inkongruenz bezüglich der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Haupttaxa *Cambaroides*, amerikanische Cambaridae und Astacidae. Deutlich unterstützt ist jedoch auch in diesem Ergebnis ein Monophylum der amerikanischen Cambaridae mit den Astacidae (QP 98%, BA 82%). Innerhalb dieses Monophylums werden die amerikanischen Cambaridae relativ hoch unterstützt (Abbildung 19B), dieses Ergebnis wird jedoch nicht durch die Maximum Likelihood Analyse bestätigt. Ähnliches gilt für die Astacidae. Während die Parsimonie Analyse ein Monophylum favorisiert (niedrige Unterstützung; BA <50%), ist das Taxon in der Maximum Likelihood Analyse nicht aufgelöst. Beide Analysen zeigen die asiatischen Cambaridae paraphyletisch, basal zum Monophylum der amerikanischen Cambaridae + Astacidae, wobei die Verhältnisse innerhalb von *Cambaroides* unklar bleiben. Lediglich die Spezies der *Cambaroides* des asiatischen Festlandes (*C. dauricus*, *C. schrenckii*) inklusive der Halbinsel Korea (*C. similis*) werden im Puzzle- Stammbaum als Monophylum hoch gestützt (QP 93%). Die japanische Spezies *Cambaroides japonicus* befindet sich hier nicht innerhalb der Innengruppe. In der Parsimonie Analyse ist *C. japonicus* innerhalb der Astacoidea, aber zu allen übrigen paraphyletisch erscheinenden *Cambaroides* das basalste Taxon.

Verglichen mit der Analyse des 12S Datensatzes zeigt aber auch die phylogenetische Auswertung der *cox1* Berechnung die gleiche relative Lage der Haupttaxa zueinander (*Cambaroides* (amerikanische Cambaridae + Astacidae)).

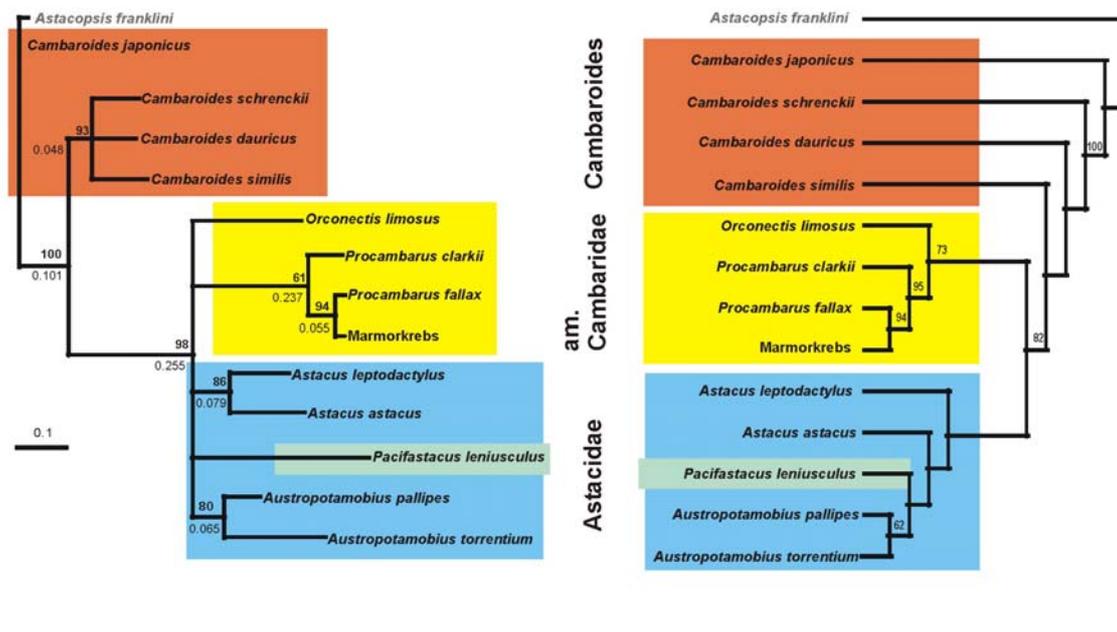


Abbildung 19: Phylogenetische Analyse des mitochondrialen, proteincodierenden Gens *cox1* der Astacoidea mit der Außengruppe der Parastacoidea (*Astacopsis franklinii*). Die Alignmentlänge beträgt 423 Nukleotidpositionen. (A) Maximum Likelihood Analyse. Modell HKY+Γ4. Quartet- Puzzle- Dendrogramm ("50% majority rule") mit einer Wahrscheinlichkeit logL. -2172.60. "QP- support" (>50%) und Astlängen sind an den Verzweigungen angegeben. (B) "Most parsimonious" Cadogram mit 383 Schritten. Es wurde keine Gewichtung vorgenommen. Unterstützungen der Dichotomien (>50%) beruhen auf 1000 "bootstrap" Replikaten. Parsimonie Programm: Nona, Winclada.

### 3.2.2.4 Die Analyse des kombinierten Datensatzes (12S rRNA und *cox1*)

Die Maximum Likelihood- und Parsimonie Analyse des kombinierten Datensatzes, bestehend aus 681 Positionen, ist in Abbildung 20 dargestellt. Als Außengruppe wurde *Astacopsis franklinii* (Parastacoidea) berücksichtigt, da nur für diese Spezies beide Gene sequenziert wurden. (A) zeigt wiederum den Quartet- Puzzle- Stammbaum ("50% majority rule") aus 223 getesteten Topologien, wobei sich lediglich 18% als signifikant schlechter erwiesen.

Mit einer Ausnahme (*C. japonicus*) sind beide Analysen kongruent und bestätigen die zuvor gezeigte Paraphylie der Cambaridae (amerikanische Cambaridae und *Cambaroides*) und die Paraphylie der Astacidae. Auch hier bilden die amerikanischen Cambaridae und die europäischen Astacidae ein Schwestergruppenverhältnis, wobei die nordwestamerikanische Spezies *Pacifastacus leniusculus* Schwestertaxon der amerikanischen Cambaridae ist und insofern eine Nicht-Monophylie der Astacidae begründet. Ein Monophylum der asiatischen Cambaridae (*Cambaroides*) wird ebenfalls im Parsimonie Cladogram nicht unterstützt mit (*Cambaroides*-Festland) *C. japonicus*.

Innerhalb des Monophylums der europäischen Astacidae bildet der Edelkrebs (*A. astacus*) und der Galizierkrebs (*A. leptodactylus*) ein Monophylum und beide sind dem Monophylum Steinkrebs (*A. torrentium*) + Dohlenkrebs (*A. pallipes*) gegenübergestellt. Die Unterstützung der Dichotomien ist in beiden Analysen sehr unterschiedlich. Das Monophylum der europäischen Astacidae wird im Puzzle-Stammbaum mit 69% moderat unterstützt, erhält aber in der Parsimonie Analyse einen nur geringen "bootstrap" Wert (BA 33%). Ähnlich verhalten sich die Werte beim Monophylum *A. astacus* + *A. leptodactylus*. Der "bootstrap" Wert der Parsimonie Analyse ist mit 25% als äußerst schwach zu bewerten, die Unterstützung im Puzzle-Stammbaum (QP 81%) ist dagegen gut.

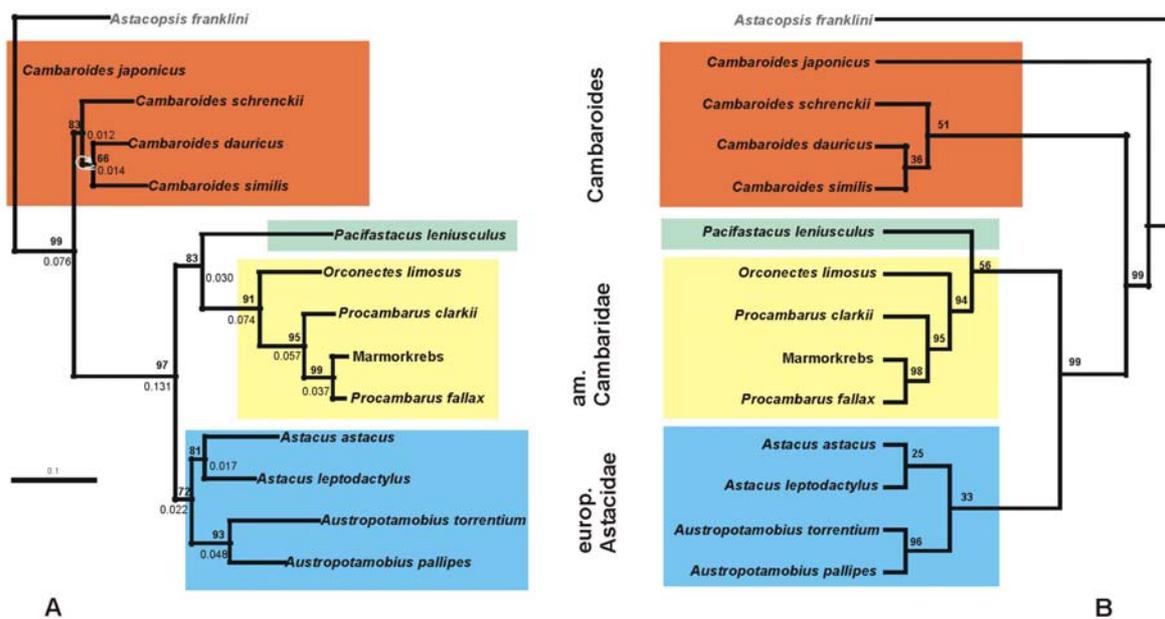


Abbildung 20: Phylogenetische Analyse des kombinierten Datensatzes (12S rRNA + cox1) der Astacoidea mit der Außengruppe Parastacoidea (*Astacopsis franklini*). Länge des Alignments: 687 Nukleotidpositionen. (A) Maximum Likelihood Analyse unter dem Modell HKY+ $\Gamma$ 4. Quartet- Puzzle Dendrogramm ("50% majority rule") mit einer Wahrscheinlichkeit von logL.-3441.96. Unterstützungen sind als "QP- support" angegeben. (B) "Most parsimonious" Cladogramm mit 581 Schritten. Es wurde keine Gewichtung der Positionen vorgenommen. Die Unterstützungen der Dichotomien beruhen auf 1000 "bootstrap" Replikaten. Programme: Nona, Winclada.

### 3.2.2.5 "Likelihood mapping" zur Überprüfung der Hypothesen

Die phylogenetische Berechnungen der Gene 12S rRNA, cox1 und des kombinierten Datensatzes zeigen übereinstimmend die Paraphylie der Cambaridae (amerikanische Cambaridae + *Cambaroides*). Mit Ausnahme in der cox1 Analyse wird des weiteren *P. leniusculus* als Schwestertaxon zu den amerikanischen Cambaridae favorisiert. Damit wären auch die Astacidae paraphyletisch. Um diese den klassischen Hypothesen widersprechenden Ergebnisse zu überprüfen, wird mittels der "likelihood mapping" Methode (Strimmer & von Haeseler, 1997) anhand des kombinierten Datensatzes getestet, inwieweit die Resultate der Hypothesentests (in ihrer Eindeutigkeit) die Ergebnisse der Stammbäume reflektieren oder aber Ausdruck eines hohen

Homoplasiegehaltes (in ihrer Mehrdeutigkeit) in den Datensätzen sein könnten. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene Hypothesen definiert, die sich aus den gezeigten Ergebnissen ableiten. Abbildung 21 zeigt die Resultate dieses Tests. Die gewurzelten Stammbäume auf der linken Seite bezeichnen die einzelnen definierten Cluster A-D (siehe auch Kapitel: 2.2.7.5.6). Der mittlere Bereich stellt das "likelihood mapping" Ergebnis dar, wobei jede Ecke des Dreiecks eine ungewurzelte Vierer-Topologie darstellt. Auf der rechten Seite befindet sich jeweils das unterstützte Ergebnis als gewurzelter Stammbaum.

Hypothese A: Hier wurden die Parastacoidea, amerikanischen Cambaridae, asiatischen *Cambaroides* und die Astacidae (inclusive *P. leniusculus*) jeweils als Monophylum postuliert. Das Ergebnis zeigt eindeutig 100% ige Unterstützung einer Schwestergruppenbeziehung amerikanischer Cambaridae zu Astacidae.

Hypothese B: Die Cluster wurden, wie in Hypothese A beschrieben, gesetzt, mit dem Unterschied, dass *P. leniusculus* den amerikanischen Cambaridae zugeordnet wurde. Das Ergebnis ist identisch mit dem oben beschriebenen Resultat.

Aus den Ergebnissen von A und B wird ersichtlich, dass die Zuordnung von *P. leniusculus* (einmal zu den Astacidae und im anderen Fall zu den amerikanischen Cambaridae) keinen Einfluß auf das nähere Verwandtschaftsverhältnis der amerikanischen Cambaridae zu den Astacidae hat.

Hypothese C: In dieser Analyse wurden die Astacidae (A), die amerikanischen Cambaridae (C) und die asiatischen *Cambaroides* (D) jeweils als Monophylum definiert und *P. leniusculus* als einzige Spezies dem Cluster B zugeordnet. Das Resultat spiegelt die in der phylogenetischen Analyse gezeigten Verwandtschaftsbeziehungen der amerikanischen Cambaridae zu *P. leniusculus* wieder (72%). Erstaunlich ist hier, dass ein Schwestergruppenverhältnis der Astacidae zu *P. leniusculus* gar keine Unterstützung erfährt, der hohe prozentuale Wert im Zentrum (25%) allerdings deutlich den hohen Grad an Homoplasie von *P. leniusculus* zu den übrigen Astacoidea aufzeigt.

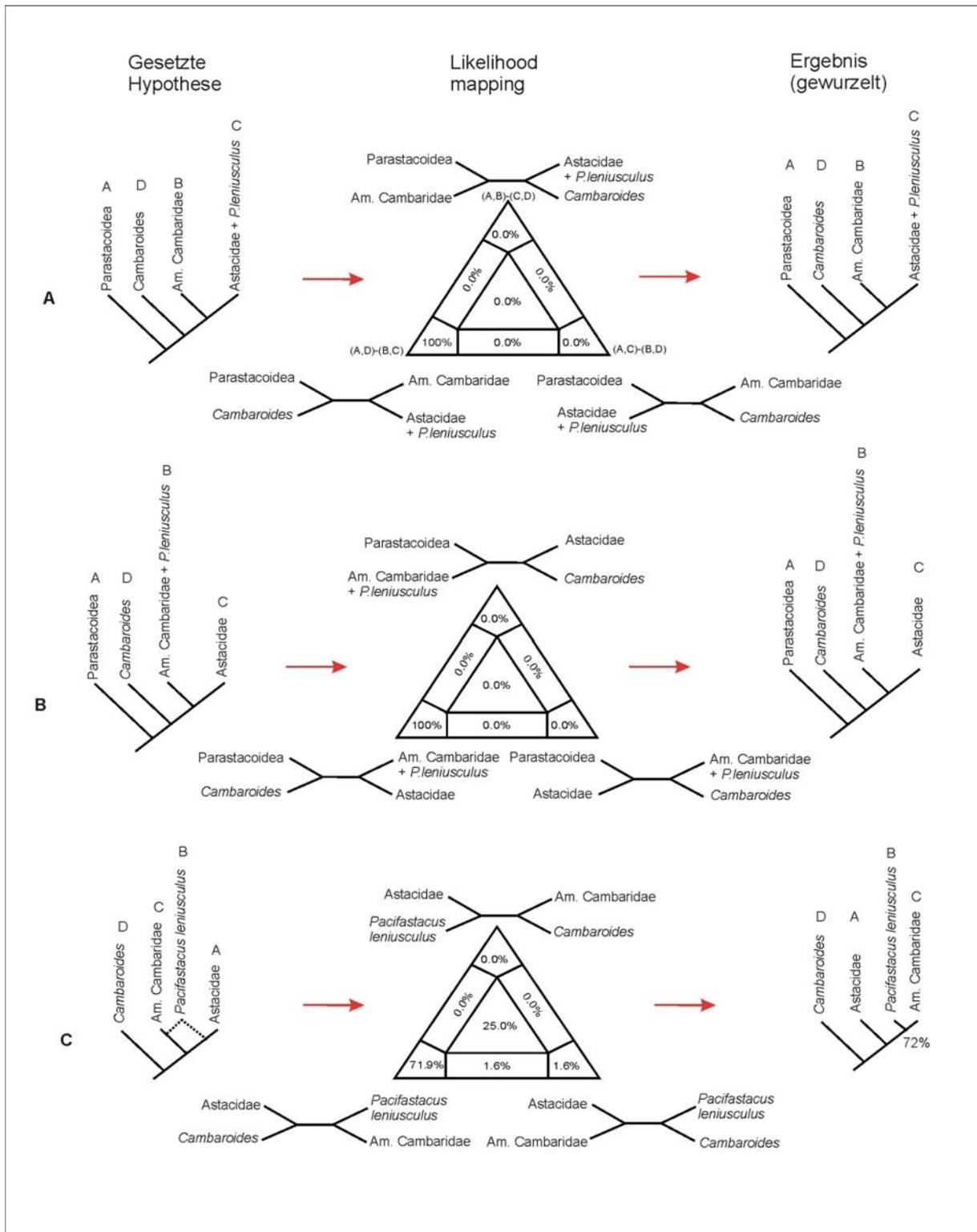


Abbildung 21: "Likelihood mapping" Test von drei verschiedenen Hypothesen (A-C), anhand des kombinierten Datensatzes unter dem Modell HKY+ $\Gamma$ 4. Die linke Spalte beschreibt jeweils die drei Hypothesen mit den *a priori* definierten Clustern (A-D), die zu testen waren. Die mittlere Spalte stellt das Ergebnis jeder getesteten Hypothese dar. Dieses Ergebnis wird in der rechten Spalte gewurzelt an den Parastacoidea (A und B) bzw. *Cambaroides* (C) dargestellt. Beschreibung der Hypothesen siehe Text.

### 3.2.2.6 Der Marmorkrebs

Dieser bezüglich seines phylogenetischen Ursprungs unbekannt Flusskrebse wurde in allen phylogenetischen Analysen der Flusskrebse mit einbezogen. Unabhängig vom Datensatz und der Berechnungsmethode ist der Marmorkrebs in allen gezeigten Cladogrammen das Schwestertaxon zu *Procambarus fallax* und gehört somit dem Taxon der amerikanischen Cambaridae an. Das Ergebnis wird jeweils mit hohen "bootstrap"- bzw. QP-Werten unterstützt. Bezogen auf den kompletten Datensatz (cox1 + 12S rRNA) differieren nur 2,2% der Nukleotide zwischen den beiden Arten (Scholtz et al., 2003). Das Resultat dieser Untersuchung steht somit im Einklang mit morphologischen Ergebnissen.

### 3.2.3 Diskussion: Die phylogenetischen Beziehungen der Astacoidea (Astacida, Decapoda)

Um einen Beitrag zur Phylogenie der Astacoidea zu leisten, wurden Ausschnitte der beiden mitochondrialen Gene der kleinen ribosomalen Untereinheit 12S rRNA und cox1 von 13 Taxa der Innengruppe Astacoidea und drei Taxa (12S) bzw. einem Taxon (cox1) der Aussengruppe der Parastacoidea sequenziert. Die daraus resultierenden Alignments wurden mit Parsimonie- und Maximum Likelihood Verfahren als Einzelanalysen und einer kombinierten Analyse zur Rekonstruktion der Phylogenien herangezogen.

Der Großteil aller hier durchgeführten Analysen zeigen die Nicht-Monophylie der Cambaridae und der Astacidae, wobei die Gattung *Cambaroides* (Asien) die Schwestergruppe zu einem Monophylum bestehend aus Cambaridae (Amerika) und den polyphyletischen Astacidae (Nordwest-Amerika und Europa) bilden. Innerhalb des letztgenannten Monophylums bilden die Pacifastacidae die Schwestergruppe zu den amerikanischen Cambaridae. Dieses Monophylum stellt im weiteren das Schwestertaxon zu den monophyletischen europäischen Astacidae dar. Die nähere Verwandtschaft der amerikanischen Cambaridae zu den Astacidae und die basale Stellung der *Cambaroides* wird in allen Analysen hoch unterstützt und gewinnt dadurch an Glaubwürdigkeit. Andererseits steht das Ergebnis dieser Analysen im eklatanten Widerspruch zu den Ansichten der klassischen Systematik, die zweifelsfrei von der Monophylie der Cambaridae ausgehen (Fitzpatrick Jr., 1995; Scholtz, 1998; 1999; 2002). Wenig widersprüchlich erscheint dieses Ergebnis allerdings zu den bereits publizierten molekularen Daten zu sein: Ein kombinierter Datensatz aus 16S, 28S und 18S Daten suggeriert ebenfalls die Nicht-Monophylie der Cambaridae und Astacidae (Crandall et al., 2000). Andererseits ist die genaue Topologie dieser Analyse schwer zu bewerten, da das "taxon sampling" innerhalb von *Cambaroides* und Pacifastacidae (mit jeweils nur einer Spezies repräsentiert) sehr restriktiv ist. Eine Analyse, ausschließlich basierend auf 18S rDNA Daten der gleichen Autoren, unterstützt wiederum die Monophylie der asiatischen und amerikanischen Cambaridae (allerdings mit einem "bootstrap" Wert von unter 50%).

In der vorliegenden Analyse ist das "taxon sampling" von *Cambaroides* wesentlich umfangreicher, sodass auch aus diesem Grund die daraus resultierende stabile Stellung der Gruppe relativ zu den

anderen Taxa als ernstzunehmende Hypothese diskutiert werden sollte. Weniger überzeugend ist dagegen die gezeigte Nicht-Monophylie der Astacidae. Es konnte nur eine Spezies der Pacifastacidae in der Analyse berücksichtigt werden. Daher ist es durchaus möglich, dass die variable Stellung von *Pacifastacus leniusculus* artifizierlicher Natur ist. Andererseits sollte berücksichtigt werden, dass eine Monophylie der Astacidae durchaus kontrovers diskutiert wird. So kommen Albrecht und von Hagen (1981) zum Ergebnis, dass die Gattung *Pacifastacus* die Schwestergruppe der europäischen Astacidae ist. Da aber die Astacidae in der Morphologie, Entwicklung und Verhalten insgesamt eine eher plesiomorphe Ausprägung zeigen, hält Scholtz (1999) eine Paraphylie der Astacidae für wahrscheinlich.

Im Licht zweier konkurrierender Hypothesen werden im folgenden sowohl morphologische Merkmale als auch zoogeographischen Verbreitungsmuster diskutiert (Abbildung 22).



nach Scholtz (Scholtz & Richter, 1995; Scholtz, 1999; 2002) und Crandall et al. (2000)

Hypothese auf der Basis von 12S rDNA und cox1 Datensätzen

Abbildung 22: Hypothese 1 stellt die Monophylie der Cambaridae dar mit den „Astacidae“ als Schwestergruppe. Hypothese 2 geht von der Paraphylie der Cambaridae aus. Morphologische Merkmale **1, 2, 3** (unten aufgelistet) sind an den jeweiligen Verzweigungen vermerkt.

**1** Ischium der 2. und 3. Pereiopoden der Männchen tragen hakenartige Anhänge zum Festhalten der Weibchen während der Kopulation.

**2** Erster Pleopode des Männchens ist mit verkörnten Spitzen und einer langen hochspezialisierten Spermienfurche ausgestattet zur Einführung der Spermienpakete in den Annulus ventralis der Weibchen.

**3** Annulus ventralis der Weibchen (Hobbs Jr., 1988).

### 3.2.3.1 Morphologische Merkmale und ihre Interpretation im Licht der Moleküle

Das hier vorliegende Resultat hat weitreichende Konsequenzen für ein mögliches Evolutionsszenarium der aufgeführten Merkmale innerhalb der Astacoidea. Die Haken am Ischium der Männchen, die ausgebildete Spermienfurche und das Vorhandensein eines Annulus ventralis werden als abgeleitete Merkmale diskutiert, die die Cambaridae zu einem Monophylum vereinen und den Astacidae, die diese Merkmale nicht aufweisen als Schwestergruppe gegenüberstellt (Hypothese 1).

Durch die gezeigten molekularen Studien (Hypothese 2) muß allerdings die Paraphylie der Cambaridae, mit einer basalen Stellung der *Cambaroides* der ersten Hypothese gegenübergestellt werden. Dies impliziert die möglicherweise plesiomorphe Natur oben genannter Merkmale, die dann einmal (bei einer Monophylie der Astacidae) oder mehrmals unabhängig voneinander (im Fall ihrer Nicht-Monophylie) verlorengegangen sein könnten.

Beide Hypothesen sind innerhalb der Astacoidea für jedes betrachtete Merkmal gleich sparsam, sofern man von einer Monophylie der Astacidae ausgeht. Eine Nicht-Monophylie der Astacidae würde eine weniger sparsame Lösung nach sich ziehen.

Zwei der drei Merkmale beziehen sich direkt auf den Reproduktionsapparat der Cambaridae, der Annulus ventralis der Weibchen und dazu passend die Spermienfurche der Männchen, wobei beide Strukturen offensichtlich als unabhängige Merkmale in die phylogenetischen Betrachtungen eingehen. Beide Merkmale sind in dieser strukturellen Ausprägung bei den Männchen und Weibchen der Astacidae nicht vorhanden. Die Spermienpakete werden in dieser Gruppe ventral verteilt auf dem Sternum abgelegt. Es stellt sich hier also die Frage, in wieweit diese beiden Merkmale tatsächlich voneinander unabhängig sind: Geht der Annulus ventralis der Weibchen verloren, wozu benötigt das Männchen eine hochspezialisierte Samenfurche oder *vice versa*? Ein in der Qualität ähnliches Szenarium wäre für Merkmal 1 denkbar. Die Haken der Männchen zum Fixieren der Weibchen während der Kopulation könnten bei den Astacidae möglicherweise überflüssig sein, da sicherlich anzunehmen ist, dass das zufällig verteilte, ventrale Aufbringen der Spermapakete einfacher und schneller zu vollziehen ist, als dass gezielte Einbringen in den Annulus ventralis. Unter der Annahme einer gegenseitigen Abhängigkeit der genannten Merkmale (mit anderen Worten ein deutlich niedrigerer Selektionsdruck für die Beibehaltung von zwei der drei Merkmale) erscheint der Verlust dieser Merkmale bei den Astacidae weniger dramatisch und damit denkbar.

Die oben angeführten Lösungen gehen von der Homologie der genannten Merkmale innerhalb der Astacoidea aus. Diese Homologie ist allerdings keinesfalls für jedes Merkmal gesichert. Der Annulus ventralis der *Cambaroides* ist beispielsweise wesentlich einfacher („urtümlich erscheinend“) aufgebaut, als der der amerikanischen Cambaridae. Einer phylogenetischen Analyse fossiler und rezenter Arten zufolge (Rode & Babcock, 2003) sind die *Cambaroides* ebenfalls nicht näher verwandt mit den amerikanischen Cambaridae. In dieser Studie bilden die *Cambaroides* (vertreten durch eine Spezies) ein Schwestergruppenverhältnis zu den Astacidae. Dies impliziert, dass der Annulus ventralis auch konvergent entstanden sein könnte und damit keine Argumentationsgrundlage für die phylogenetischen Beziehungen der Astacoidea bietet. Selbiges kann für die Ischiumhacken der

Männchen angenommen werden. Die amerikanischen Cambaridae besitzen ein bis drei Haken verteilt vom ersten bis vierten Pereiopoden, d.h. hier wird eine recht hohe Variabilität der Lage deutlich. Des Weiteren ist bei den amerikanischen Cambaridae das Vorhandensein der Haken von der Fortpflanzungsaktivität abhängig (zyklischer Dimorphismus). Wenn keine Paarungsbereitschaft der Männchen besteht, werden auch keine Ischiumhaken ausgebildet. Diese Formveränderung wird allerdings nicht bei *Cambaroides japonicus* beobachtet (Scholtz & Kawai, 2002). Die hohe Variabilität der Lage der Haken und auch der zyklische Dimorphismus erschweren es meines Erachtens, das Merkmal „Ischiumhaken“ als Synapomorphie der Cambaridae und *Cambaroides* zu deuten. Auch in diesem Fall könnte von einer konvergenten Entwicklung ausgegangen werden, die einmal bei den *Cambaroides* (ohne zyklischen Dimorphismus) und unabhängig davon bei den amerikanischen Cambaridae (mit zyklischem Dimorphismus) entstanden ist. Eine sparsamere Erklärung wäre allerdings die Annahme der einmaligen Entstehung der Ischiumhaken in den Kronen-Astacoidea, die die Annahme eines sekundären Verlustes innerhalb der Astacida nach sich zieht. Dafür spricht die ursprünglichere Form der *Cambaroides* (ohne zyklischem Dimorphismus) gegenüber der abgeleiteteren Form der amerikanischen Cambaridae (mit zyklischem Dimorphismus).

### 3.2.3.2 Zoogeographie

Die Rekonstruktion einer Phylogenie erlaubt es, in Verbindung mit den Erkenntnissen der Geographie zur Kontinentaldrift, vorläufige Hypothesen der zoogeographischen Verteilung der Astacoidea aufzustellen und zu diskutieren.

Die Monophylie aller Flusskrebse begründet sich nach Scholtz (1995) neben einigen Adultmerkmalen auch auf einer ganzen Reihe von embryologischen Merkmalen (z.B. die an Anzahl variablen Ektoteloblasten oder die direkte Entwicklung, d.h. das Fehlen einer für die marinen Reptantia typischen Zoealarve) und der typischen Brutpflege des Muttertieres, wie die Verankerung des ersten postembryonalen Stadiums an den Pleopoden der Mutter mit Hilfe eines Telsonfadens. Dieser Telsonfaden dient dem Verdriftungsschutz der Jungen. Die hier nur im Ansatz aufgeführten apomorphen Merkmalskomplexe der Embryonal- und Juvenilentwicklungen gelten allgemein als Anpassungen an Süß- und Fließgewässer und führen Scholtz (1995) begründet zu der Annahme, dass bereits die Stammart der Kronen-Astacida die marinen Habitate verlassen haben muß. Das wiederum zieht die Konsequenz einer kontinentalen Besiedlung zu Zeiten des „Superkontinentes“ Pangea (Trias vor ca. 200 Mill. Jahren und früher) nach sich. Nach dem Zerfall des Kontinentes in Laurasia und Gondwana während der Jurazeit (vor ca. 190-135 Mill. Jahren) haben sich demnach die heutigen Unterschiede zwischen den auf der Südhalbkugel lebenden Parastacoidea und den auf der Nordhalbkugel verbreiteten Astacoidea herausgebildet (Scholtz, 1995).

Für die phylogenetische Analyse wurden nur einige Parastacoidea (Australien und Neuseeland) als Außengruppe verwendet, daher können die Interpretationsprobleme der Verbreitungsmuster südlich des Äquators (z.B. das vollständige Fehlen von Flusskrebsen auf dem afrikanischen Festland, siehe auch Kapitel: 3.2.1) in diesem Rahmen nicht weiter thematisiert werden. Die vorliegenden Analysen

zur Phylogenie der Astacoidea lassen jedoch eine Hypothese zur Verbreitung auf der Nordhalbkugel zu.

Ausgehend von der klassischen Vorstellung der Monophylie der Cambaridae (Hobbs Jr., 1988) und einer Monophylie der Astacidae erscheint die holarktische Verbreitung der Astacoidea disjunctiv (Abbildung 16): Es gibt ausschließlich in Ostasien und in Nordostamerika Spezies der Cambaridae. Die Vorkommen der Astacidae beschränken sich dagegen auf den europäischen und den nordwestamerikanischen Bereich. Scholtz (1993;1995;1999) kommt demzufolge zu dem Ergebnis, die Astacidae könnten ihren Ursprung in einer nördlichen Region Laurasiens genommen haben und die Cambaridae in einer südlich angesiedelten Population. Die heute eher nördliche Besiedlung der Astacidae und die tropische bis subtropische Ausbreitung der Cambaridae spricht für diese Annahme. Nach dem Zerfall von Laurasia müssen demzufolge Radiationen der Astacidae vorwiegend im europäischen-westasiatischen Bereich erfolgt sein, während die Cambaridae ihre Radiation vorwiegend im nordostamerikanischen Bereich erfuhren. Die rezenten Vertreter der ostasiatischen *Cambaroides* und die nordwestamerikanischen Astacidae wären demnach als Reliktpopulationen, durch Gebirgszüge isoliert, zu interpretieren. Eine ähnliche Auffassung vertritt auch Schram (2001), datiert die Radiation jedoch in die frühe Trias (237 Mill. Jahre) zu Zeiten Pangeas und entwirft, ebenfalls ausgehend von der Monophylie der Cambaridae und Astacidae, eine subtropische-nördlich gemäßigte Radiation der Astacidae ausgehend vom heutigen Nordwest-Amerika Richtung dem heutigen Europa. Eine weiter südlich gelegene tropische-subtropische Radiation ausgehend vom heutigen Süden Nord-Amerikas entlang der nördlichen Küste der Paleo-Tethys See bis zum heutigen ostasiatischen Raum würde die Verteilung der Cambaridae erklären.

Die hier vorgestellte Hypothese der verwandtschaftlichen Beziehungen der Haupttaxa der Astacoidea geht im folgenden von einer Paraphylie der Cambaridae und einem Schwestergruppenverhältnis der Astacidae zu den amerikanischen Cambaridae aus. Bezüglich der zoogeographischen Verteilung müsste die Radiation ihren Ursprung im asiatischen Raum genommen haben und sich entlang der Nordküste der Thethys See Richtung europäischen Raum ausgeweitet haben. Von Europa aus könnte die weitere Verbreitung über die transatlantische Landbrücke vor ca. 70-45 Millionen Jahren stattgefunden haben. Diese Landbrücke verband den westpaleoarktischen Raum mit dem ostnearktischen Raum (Grönland) über die protobritischen Inseln. Letzteres würde die nähere Beziehung der Astacidae zu den amerikanischen Cambaridae erklären.

Die Hypothese eines Radiationsursprunges der *Cambaroides* in Ostasien mit einer weiteren Verbreitung westwärts wird ebenfalls von mehreren Autoren vertreten (Scholtz, 2002).

Aufgrund der unklaren Stellung der Gattung *Pacifastacus* wäre eine Aussage über den weiteren Radiationsverlauf der amerikanischen Cambaridae und *Pacifastacus leniusculus* höchst spekulativ. Sanmartin et al. (2001) vermuten derartige Radiationsereignisse in einem Zeitraum vor weniger als 20 Millionen Jahren, d.h. lange nach Schließung des Midcontinentalen Seeweges. Würde sich ein derartiges Schwestergruppenverhältnis bestätigen, wäre dieses Ereignis im Radiationsverlauf der Astacoidea vermutlich das jüngste.

An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass derartige Betrachtungen bezüglich der biogeographischen Verbreitungsmuster einen hoch hypothetischen Charakter aufweisen. Ein ausführlicherer fossiler Bericht würde hier sicherlich Abhilfe schaffen. Funde fossiler Flusskrebse sind jedoch nur rar und deuten darauf hin, dass mehr als die Hälfte an Informationen über ancestrale Formen, die Einblick in die Geschichte der Flusskrebse geben könnten, nicht mehr existieren oder bislang nicht entdeckt wurden (Schram, 2001).

### 3.2.3.3 Der Marmorkrebs – ein Flusskrebs unbekannter Herkunft

Die einfache Hälterung und die Gewährleistung ausreichend großer Populationen bedingt durch die parthenogenetische Reproduktion machen den Marmorkrebs zu einem geeigneten Modellorganismus für unterschiedliche biologische Disziplinen. Andererseits könnte der Marmorkrebs aufgrund seiner hohen Reproduktionsrate eine erhebliche Gefahr für natürliche Biotope sein, im Fall eines bewussten oder unbewussten Einbringens von nur einem Individuum (Scholtz et al., 2003). Die Eingangs bereits erwähnte Krebspest (siehe Kapitel: 3.2.1), die auch heute noch immer wieder einzelne Populationen europäischer Astacidae extrem gefährden kann, macht das ökologische Gefahrenpotential deutlich. Vor diesem Hintergrund erscheint es besonders wichtig, die Herkunft dieses nur aus dem deutschen Aquarienhandel bekannten Flusskrebses zu untersuchen. Um ein Verwandtschaftsverhältnis des Marmorkrebses einzugrenzen, wurden die generierten Daten der 12S rDNA und des *cox1* Gens mit in die phylogenetischen Analysen aufgenommen. Das Ergebnis verdeutlicht zweifelsfrei eine nahe Verwandtschaft des Marmorkrebses zur nordostamerikanischen Spezies *Procambarus fallax* (Cambaridae), beheimatet in Florida. Der auffallend ähnliche Habitus zu *P. fallax* und das Vorhandensein eines *Annulus ventralis* bestätigt das Ergebnis. Dennoch bleibt die wahre Identität des Marmorkrebses ungelöst. Insgesamt wurden nur 2,2% unterschiedliche Nukleotidpositionen zu *P. fallax* im kombinierten Alignment gefunden. Aufgrund der geringen Substitutionsrate ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei tatsächlich um die Art *P. fallax* handelt und die wenigen Austauschere auf eine innerartliche Variabilität zurückzuführen ist. Diese Möglichkeit kann aber nur in ausgeweiteten populationsgenetischen Untersuchungen getestet werden (Fetzner & Crandall, 2002).

Die eindeutige Identifizierung des Marmorkrebses als ein Vertreter der Cambaridae, seine parthenogenetische Reproduktionsweise und die sorglose kommerzielle Verbreitung in Deutschland macht die Gefahr für hiesige Süßwasserökosysteme deutlich. Als eine amerikanische Spezies der Cambaridae ist der Marmorkrebs in jedem Fall als potentieller Überträger des Pilzes *Aphanomyces astaci* ernstzunehmen und kann damit einheimische Bestände gefährden. Desweiteren stellt die hohe parthenogenetische Reproduktionsrate ein nachhaltiges Problem resultierend aus der Hobbyaquaristik dar, wenn bedingt durch falsch verstandene Tierliebe überschüssige Nachkommen in europäische Biotope entlassen werden.

## 4 Schlussdiskussion

### 4.1 Die Brauchbarkeit der gewählten Gene für eine phylogenetische Analyse der Phyllopoda und Astacida

Zu Beginn einer phylogenetischen Arbeit steht die Wahl der zu bearbeitenden Merkmale, die eine möglichst hohe widerspruchsfreie Auflösung innerhalb der fraglichen Organismengruppe zulassen.

Eine konkrete Einschätzung des phylogenetischen Signals eines gewählten Gens oder DNA Abschnittes vor dem eigentlichen Beginn der Datenerhebung ist nur bedingt möglich. Dies ist natürlich vom Umfang der bereits vorhandenen Sequenzeinträge für ähnliche taxonomische Einheiten in den Genbanken abhängig.

Zu Beginn dieser Arbeit waren für die Crustacea die Sequenzen lediglich zweier mitochondrialer Genome (*Artemia franciscana* und *Daphnia pulex*) in der Datenbank verfügbar. Aufgrund der hohen morphologischen Diversität innerhalb der Phyllopoda, speziell innerhalb der Cladocera, fiel hier zunächst die Wahl auf die ribosomale 12S rRNA, die i. a. wegen ihrer sehr variablen Bereiche für relativ niedrige taxonomische Ebenen als tauglich bewertet wird. Um den zusätzlichen sehr alten Splits der Branchiopoda (z.B. Spinicaudata|Cladocera) Rechnung zu tragen, wurde die dritte Domäne, bekannt als innerhalb der 12S konservierteste Domäne, gewählt. Bezüglich der Phylogenese innerhalb der Phyllopoda ergab sich selbst bei denen als sehr alt einzuschätzenden Aufspaltungen eine recht zufriedenstellende Auflösung. Um über die phylogenetisch noch älteren Aufspaltungen plausible Aussagen treffen zu können (z.B. Notostraca|Diplostraca), versprach zunächst das sehr konservierte, proteincodierende Gen EF-1 $\alpha$  ein geeigneter Kandidat zu sein. Die Analyse des generierten EF-1 $\alpha$  Datensatzes (siehe Kapitel: 3.1.2.7) erlaubten zwar keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Spinicaudata-Cladocera Beziehungen, die Paraphylie der Spinicaudata mit einer höheren Affinität von *C. hislopi* zu den Cladocera zeigte sich aber auch hier. Es erwies sich daher als zweckmäßig die Datensätze zu kombinieren. Die Kongruenz der ML- und MP Ergebnisse des kombinierten Datensatzes lässt darauf schließen, dass sich beide Genbereiche bezüglich ihrer Homoplasieeffekte gegenseitig kompensieren.

Für die Astacida kam neben dem mitochondrialen 12S rRNA Gen auch das ebenfalls mitochondrial codierte cox1 Gen zum Einsatz. Hier zeigte sich der 12S Datensatz eindeutig als überlegen dem cox1 Datensatz, insbesondere bezüglich der Auflösung innerhalb der europäischen Astacidae und der amerikanischen Cambaridae. Der erheblich höhere Konservierungsgrad des cox1 Gens verursacht besonders bei diesen Aufspaltungsereignissen Polytomien. Auch hier zeigt die Kombination der Datensätze im Vergleich zu den Einzelanalysen weitgehend kongruente ML- und MP Ergebnisse.

#### **4.2 Zur Frage des ``taxon samplings`` und der Anzahl von Merkmalen nebst einer Bewertung des ``stratified sampling`` der Phyllopoda und Astacoidea und der ``database restricted`` Analyse der Arthropoda**

Unzureichendes ``taxon sampling`` wird häufig als Fehlerquelle für Missinterpretationen phylogenetischer Analysen angesehen (Johnson, 2001; Murphy et al., 2001). In einer experimentellen Studie zur Phylogenie eines Taxons sollten die gewählten Spezies Repräsentanten jeder Teilgruppe darstellen (``stratified sampling``, (Hillis, 1998)). Dieser Empfehlung konnte bezüglich der zu erörternden Fragestellungen innerhalb der Phyllopoda und Astacoidea im großen und ganzen nachgekommen werden, sodass eine Aussage über die Beziehungen der Hauptgruppen zueinander möglich wurde.

Innerhalb der Cladocera weist der Probenumfang bei den Anomopoda ein Ungleichgewicht auf. Aus den Teilgruppen Chydoridae, Macrothricidae konnten nur einige wenige Spezies berücksichtigt werden. Daher kann keine zuverlässige Aussage über die Stellung der Anomopoda innerhalb der Cladocera getroffen werden (siehe unten). Ähnlich kritisch ist das ``taxon sampling`` in einer Teilgruppe der Flusskrebse zu bewerten. Von dem westamerikanischen Taxon Pacifastacidae (fünf Spezies bekannt) stand nur eine Species (*Pacifastacus leniusculus*) zur Verfügung. Es hat sich zwar einerseits gezeigt, dass die Eliminierung von *P. leniusculus* aus dem Datensatz keinen Einfluß auf die nähere Verwandtschaft von amerikanischen Cambaridae zu europäischen Astacidae hat, andererseits muß eine mögliche Nicht-Monophylie der Astacidae (Scholtz, 1999) auf der Basis dieser Datensätze kritisch bewertet werden.

Die Anzahl der Merkmale, die zur Analyse der jeweils kombinierten Datensätze eingesetzt wurden, sind ausreichend. Inkongruenzen, resultierend aus den Einzelanalysen der Datensätze mit beiden Rechenverfahren, werden in der Regel aufgelöst, legt man die kombinierten Datensätze zugrunde. Obwohl generelle Übereinstimmung darüber besteht, dass die Betrachtung möglichst vieler Taxa eine phylogenetische Analyse stark verbessert (Lecointre et al., 1993; Graybeal, 1998; Poe, 1998; Zwickl & Hillis, 2002; Hillis et al., 2003) muß dies immer im Zusammenhang mit der Anzahl der betrachteten Merkmale stehen. Wie Graybeal (1998) in einer Simulation zeigen konnte, nimmt die Präzision der Analyse stark ab, wenn die Anzahl der Merkmale zu gering ist. Darüber hinaus wird von einigen Autoren die Beobachtung gemacht, dass die Länge der Datenmatrix einen höheren Einfluß auf die Präzision einer phylogenetischen Berechnung haben kann als die Anzahl der Taxa. (Poe & Swofford, 1999; Rosenberg & Kumar, 2003). Die Abhängigkeit der Analysequalität von Taxonanzahl und Länge des Datensatzes zeigt sich auch in dieser Studie in der kombinierten Analyse der Phyllopoda (Abbildung 11). Bei einer Merkmalsanzahl von 1036 konnte mit einer erheblich reduzierten Anzahl an Taxa ein einheitliches Ergebnis erzielt werden. Im umgekehrten Fall der 12S Analyse mit nur 408 bzw. 465 Merkmalen und 41 Taxa konnte eine kongruente ML- und MP Aussage nicht für alle Teiltaxa erzielt werden (Abbildung 4 und Abbildung 8).

Eine sogenannte ``database-restricted`` Analyse (Rosenberg & Kumar, 2003) wurde für die Arthropoda im Hinblick auf die Wahl einer geeigneten Aussengruppe für die Phyllopoda (Branchiopoda) anhand der Aminosäuresequenzen von 12 proteincodierenden Genen des Mitochondriums durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden einem vorhandenen Alignment (Hwang et al., 2001) weitere in der Genbank verfügbare Daten der Crustaceenarten *Tigriopus japonicus* (Maxillopoda, Copepoda), *Triops cancriformis* (Phyllopoda) und *Panulirus japonicus* (Malacostraca) hinzugefügt. Um der Frage des ``taxon samplings`` im Rahmen einer ``database-restricted`` Analyse so weit wie möglich gerecht zu werden, wurden zudem weitere Spezies der Arthropodenteiltaxa Chelicerata, Insecta und Myriapoda berücksichtigt.

Zu einer ausreichend gesicherten Hypothese der Phylogenese der Crustacea kann keine Aussage gemacht werden. Dies liegt sicherlich daran, dass nach wie vor Teiltaxa wie Remipedia, Cephalocarida, weitere Maxillopoda (z.B. Ostracoda, nach der Klassifikation von Brusca und Brusca (1990) ein Teiltaxon der Maxillopoda) und auch eher basal stehende Malacostraca aufgrund fehlender Daten nicht berücksichtigt werden konnten. Daher erscheint die hier gezeigte Nicht-Monophylie der Crustacea relativ zu allen weiteren Arthropodata fragwürdig (siehe Kapitel: 3.1.2.1 und Abbildung 2). Um sichere Aussagen zu erhalten, ist sicherlich die Sequenzierung einerseits sehr basaler und andererseits langsam evolvierender Taxa der Crustacea erforderlich. Auf diese Weise können ``long branch`` Effekte aufgehoben werden (Hendy & Penny, 1989; Graybeal, 1998; Rosenberg & Kumar, 2001; 2003). Dies dürfte die bestehenden Hypothesen über die Teiltaxa der Arthropoda (Mandibulata-Tetraconata) eher beeinflussen als die Vergrößerung des Artenumfanges bereits ausreichend repräsentierter Teiltaxa.

Beide Berechnungsmethoden lassen keine zuverlässige Aussage über die Stellung der Copepoda (Maxillopoda) innerhalb der Crustacea zu. Darüber hinaus wird die durch *T. japonicus* gezeigte Polyphyylie der Crustacea in der Parsimonie Analyse als Ergebnis einer ``long branch attraction`` bewertet. Dieses Phänomen (Felsenstein, 1978) auch „Felsenstein-Zone“ genannt, kann durch extrem schnelle Sequenzevolutionsraten ausgelöst werden (``long branch``), was zu einem artifiziellen Split (häufig an der Basis des Cladogramms) führt, d.h. dieses Taxon wird durch die phylogenetisch sehr entfernte Aussengruppe, die *per se* einen ``long branch`` darstellt, „angezogen“ (Philippe & Laurent, 1998). Felsensteins Simulationen (1978) zeigen, dass Parsimonie Methoden besonders anfällig für dieses Phänomen sind.

Dennoch konnte eine höhere Affinität der Crustacea zu den Hexapoda als zu den Myriapoda gezeigt werden und bestätigt damit vormals publizierte Ergebnisse (Shultz & Regier, 2000).

Erreichtes Ziel dieser Analyse war jedoch eine recht gezielte Determinierung einer geeigneten Außengruppe für die Phyllopoda. Die Außengruppe sollte einerseits phylogenetisch relativ nah verwandt zur Innengruppe der Phyllopoda sein, andererseits keine zu schnelle Sequenzevolution durchlaufen haben. Die Analysen zeigen eindeutig, dass die Anostraca näher verwandt sind mit den Phyllopoda als die Malacostraca, wie durch Ax (1999) favorisiert.

### 4.3 Grundsätzliche Bemerkungen zum Problem eines rDNA Alignments

Für die phylogenetische Analyse der 12S Daten der Phyllopoda wurden zwei verschiedene Alignmentverfahren gewählt. Einerseits ein durch das Programm POY generiertes Alignment, was sich strikt an die Idee der Parsimonie Methode hält und das Alignment errechnet, dessen Generierung der kürzesten Schrittzahl bedarf und andererseits ein Alignment, dass vor dem Hintergrund eines Sekundärstrukturmodells visuell erstellt wurde. Der Vorteil letzterer Methode ist der Einsatz des vermutlich stärksten und gelehrigsten Werkzeugs -das Gehirn- und erlaubt die Integration zusätzlicher Daten, wie Strukturdomänen (Graur & Li, 2000). Der wesentliche Nachteil ist die Subjektivität mit der man auf der Basis eines bestehenden Modells als *a priori* Annahme Hypothesen über die jeweilige Positionshomologie erstellt. Dennoch liefern vergleichende Studien der 16S-artigen Moleküle verschiedener Metazoa- Taxa mit denen der bakteriellen Vorläufermoleküle gute Argumente für die konservierten ``stem``-Bereiche innerhalb des betrachteten Moleküls (Gutell et al., 1994; Konings & Gutell, 1995), sodass hier von einer gemeinsamen Struktur ausgegangen werden kann. Darüber hinaus zeigen viele Untersuchungen, dass die visuelle Korrektur eines rDNA Alignments im Hinblick auf seine zugrunde liegende Sekundärstruktur eine phylogenetische Analyse im starken Maß verbessern kann (Hickson et al., 1996; Springer & Douzery, 1996; Billoud et al., 2000; Hickson et al., 2000).

Die auf Sekundärstrukturbasis generierten Alignments für die Phyllopoda und Astacoidea wurden im vollen Umfang, sowohl mit ``loop``- als auch ``stem``-Bereiche zur Rekonstruktion der Phylogenie herangezogen. In der Literatur besteht kein allgemeiner Consens zur Frage der Eliminierung von Datenblöcken aus Alignments. Während von einigen Autoren vorgeschlagen wird, vorrangig die gepaarten Regionen (``stems``) zu berücksichtigen (aufgrund der gesicherten Positionshomologie) (Lake, 1991; Olsen & Woese, 1993) und ``loop``-Regionen bei zu hoher Unsicherheit zu eliminieren, kommen Wheeler und Honeycutt (1988) zu dem Ergebnis, dass im Gegenteil die ``stem``-Regionen ein zu geringes phylogenetisches Signal aufweisen und daher geringer zu gewichten sind. Dixon und Hillis (1993) weisen in einer sehr umfangreichen Studie darauf hin, dass die Eliminierung von entweder ``stem``- oder auch ``loop``-Bereichen in jedem Fall zu einem erheblichen Verlust an Daten führt, der sich negativ auf die phylogenetische Analyse auswirken kann, insofern als dass entweder jüngere Aufspaltungen möglicherweise nicht sicher aufgelöst werden (im Fall von nicht bedachten ``loop``-Regionen) oder basale Aufspaltungen verrauschen (bei zu geringer Gewichtung von ``stem``-Bereichen). Um dieser Gefahr zu entgehen und um den sowieso schon relativ kurzen Datensatz nicht noch künstlich weiter zu verkürzen, war es hier angebracht den jeweils kompletten Datensatz zu bearbeiten.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Rekonstruktion der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Phyllopoda (Branchiopoda, Crustacea) und der Astacoidea (Astacida, Decapoda, Crustacea) mit Hilfe molekularer Datensätze. Zu diesem Zweck wurden Sequenzdaten von 33 Spezies der Branchiopoda und 16 Spezies der Astacida erhoben. Für die Phyllopoda kam das recht variable mitochondriale Gen 12S rRNA (3. Domäne) und das hochkonservierte nukleare Gen EF-1 $\alpha$  zum Einsatz. Die Astacida wurden ebenfalls mit den mitochondrial codierten Genen 12S rRNA und *cox1* bearbeitet. Bei Einbeziehung vorhandener Daten aus der Genbank bzw. Literatur (Hanner & Fugate, 1997; Munasinghe et al., 2003) wurden die Daten unter Berücksichtigung zweier verschiedener Gesichtspunkte phylogenetisch ausgewertet: Für den ribosomalen Datensatz der Branchiopoda kam gemäß der bestehenden Debatte über die Qualität unterschiedlicher Alignmentstrategien sowohl ein computergestütztes Alignment (POY), als auch ein auf der Basis der zuvor analysierten Sekundärstruktur manuell erstelltes Alignment zum Einsatz. Anhand der phylogenetischen Berechnung der Datensätze konnte gezeigt werden, dass ein unter Einbeziehung von Sekundärstrukturinformationen erstelltes Alignment das Ergebnis positiv beeinflusst (im Fall eines deutlichen Verwandtschaftsverhältnis zwischen Cladocera und *C. hislopi*) und das sogenannte „Rauschen“ aufgrund von Homoplasie, bedingt durch falsche Positionshomologien, für einige Splits minimieren kann. Alle Datensätze sowohl für die Branchiopoda, als auch für die Astacida wurden mit Maximum Likelihood- und Parsimonie Verfahren berechnet. Die Verwendung dieser beiden Methoden gibt die zusätzliche Möglichkeit, die Gefahr von Missinterpretationen durch artifizielle Teilergebnisse zu minimieren. Daher wurden konsequenterweise nur in beiden Methoden kongruente Ergebnisse als verlässlich diskutiert.

Die Phylogenie der Branchiopoda ist vor allem im Hinblick auf die Abstammungsverhältnisse der übergeordneten Taxa weitgehend ungelöst. Die Anwendung verschiedener molekularer Datensätze (12S rRNA und EF-1 $\alpha$ ) und verschiedener Stammbaumalgorithmen erbrachte für die wesentlichen Fragestellungen verlässliche Ergebnisse. So konnte die Paraphylie der Spinicaudata gezeigt werden und damit einhergehend das Cladoceromorpha- Konzept favorisiert werden. Auch für die viel diskutierte Hypothese der Diplostraca lassen sich Evidenzen finden, die allerdings aufgrund der nur mäßigen Unterstützung der hier generierten Daten mit weiteren molekularen Daten getestet werden sollte.

Innerhalb der sehr diversen Cladocera konnte betreffend der zwei konkurrierenden Hypothesen der Eucladocera und Gymnomera, dem Gymnomera- Konzept (Haplopoda + Onychopoda) der Vorzug gegeben werden. Ein Schwestergruppenverhältnis der Ctenopoda zu den Gymnomera wird ebenfalls gezeigt. Der Widerspruch zur klassischen Annahme der basalen Stellung der Ctenopoda wird hinsichtlich der vorliegenden Ergebnisse diskutiert.

Die Phylogenie der Phyllopoda (Außengruppe Anostraca) lässt sich zusammenfassend wie folgt hypothetisieren.

**(Notostraca (Laevicaudata (Spinicaudata (*C. hislopi* + Cladocera))))**

Innerhalb der monophyletischen Cladocera werden auf der Basis der Datensätze folgende Verwandtschaftsverhältnisse gestützt:

**(Anomopoda (Ctenopoda (Haplopoda (Onychopoda))))**

Eine Besonderheit dieser Arbeit liegt in der phylogenetischen Auswertung der Intronpositionen des Gens EF-1 $\alpha$  innerhalb der Branchiopoda. Hier konnten aus der vorhandenen Datenlage innerhalb der Metazoa drei für Phyllopoda typische Intronpositionen ermittelt werden. Zwei Introns sind jeweils Autapomorphien der Notostraca (Intron B) und der Cladocera (Intron D), während ein Intron als Synapomorphie von *C. hislopi* und den Cladocera gewertet werden kann (Intron C). Damit ergibt sich ein zusätzliches, starkes Argument für die Cladoceramorpha.

Die hier auf der Basis der vorliegenden molekularen Resultate der Astacoidea (Außengruppe Parastacoidea) zu stellenden Hypothesen stehen im Widerspruch zu der traditionell als unbestritten geltenden Vorstellung eines Monophylums der amerikanischen Cambaridae und der asiatischen *Cambaroides*, gemeinschaftlich zum Taxon Cambaridae vereint.

Die vorhandenen Ergebnisse aus der Auswertung der 12S rRNA und cox1 Datensätze rechtfertigen überzeugend die Hypothese einer Nicht-Monophylie der amerikanischen Cambaridae + *Cambaroides*. Vielmehr bilden die amerikanischen Cambaridae die Schwestergruppe zu den europäischen Astacidae. Da in der Nomenklatur nicht zwischen den amerikanischen Cambaridae + *Cambaroides* - gemeinschaftlich als Cambaridae bezeichnet - differenziert wird, sollte hier, sofern sich dieses Ergebnis verifizieren lässt, eine Namensänderung der amerikanischen Cambaridae angestrebt werden. Die basale Stellung der *Cambaroides* deutet ferner darauf hin, dass die Verbreitung der Astacoidea ihren Ursprung im ostasiatischen Raum genommen hat.

Desweiteren konnte die Herkunft des parthenogenetischen Marmorkrebses (Astacida, Astacoidea, amerikanische Cambaridae) eingegrenzt werden. In diesem Zusammenhang wurde auf die Gefahr einer sorglosen Hälterung bzw. Freisetzung in europäische Binnengewässer hingewiesen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adachi, J. & Hasegawa, M. (1996): Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA, *J. Mol. Evol.* 42, Seite 459-468.
- Albrecht, H. & von Hagen, H.O. (1981): Differential weighting of electrophoretic data in crayfish and fiddler crabs (Decapoda: Astacidae and Ocypodidae), *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, Seite 393-399.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25, Seite 3389-3402.
- Andersson, S.G.E.; Zomorodipour, A.; Andersson, J.O.; Sicheritz-Ponten, T.; Alsmark, U.C.M.; Podowski, R.M.; Näslund, A.K.; Eriksson, A.S.; Winkler, H.H. & Kurland, C.G. (1998): The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria, *Nature* 396, Seite 133-140.
- Ax, P. (1999):, Das System der Metazoa II: ein Lehrbuch der phylogenetischen Systematik., G. Fischer, Mainz.
- Ball, J. (1984): Memes as replicators, *Ethol. Sociobiol.* 5, Seite 145-161.
- Ballard, J.W.O.; Ballard, O.; Olsen, G.J.; Faith, D.P.; Odgers, W.A.; Rowell, D.M. & Atkinson, P. (1992): Evidence from 12S ribosomal RNA sequences that onychophorans are modified arthropods, *Science* 258, Seite 1345-1348.
- Belford, M.; Reaban, M.E.; Coetzee, T. & Dalgaard, J.Z. (1995): Prokaryotic introns and inteins: a panoply of form and function, *J. Bact.* 177, Seite 3897-3903.
- Billoud, B.; Guerrucci, M.-A.; Masselot, M. & Deutsch, J.S. (2000): Cirripede phylogeny using a novel approach: molecular morphometrics, *Mol. Biol. Evol.* 17, Seite 1435-1445.
- Bonen, L. & Vogel, J. (2001): The ins and outs of group II introns, *Trends Genet.* 17, Seite 322-331.
- Boore, J.L. & Brown, W.M. (2000): Mitochondrial genomes of *Galathealinum*, *Helobdella*, and *Platynereis*: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa, *Mol. Biol. Evol.* 17, Seite 87-106.
- Boore, J.L.; Collins, T.M.; Stanton, D.; Daehler, L.L. & Brown, W.M. (1995): Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements, *Nature* 376, Seite 163-165.
- Botnariuc, N. (1947): Contributions a la connaissance des phyllopoeds conchostraces de Roumanie, *Notationes Biologicae* 5, Seite 68-158.
- Bowman, T.E. & Abele, L.G. (1982): Classification of the recent Crustacea, Bliss, D.E., *The Biology of Crustacea*, Academic Press, London.

- Braband, A.; Richter, S.; Hiesel, R. & Scholtz, G. (2002): Phylogenetic relationships within the Phyllopoda (Crustacea, Branchiopoda) based on mitochondrial and nuclear markers, *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, Seite 229-244.
- Bremer, K. (1994): Branch support and tree stability, *Cladistics* 10, Seite 295-304.
- Brusca, R.C. & Brusca, G.J. (1990): *Invertebrates*, Sinauer Associates, Sunderland.
- Burge, C.B.; Tuschl, T. & Sharp, P.A. (1999): Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes, Gesteland, R.F.; Cech, T.R. und Atkins, J.F., *The RNA World*, 2nd Edition, Cold Spring Harbour, NY. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Calman, W.T. (1909): Crustacea, Lankester, E.R., *A Treatise on Zoology*, Part 7, Appendiculata Fasc. 3. Seite 1-346, Adam and Black, London.
- Camin, J.H. & Sokal, R.R. (1965): A method for deducing branching sequences in phylogeny, *Evolution* 19, Seite 311-326.
- Carapelli, A.; Frati, F.; Nardi, F.; Dallai, R. & Simon, C. (2000): Molecular phylogeny of the apterygotan insects based on nuclear and mitochondrial genes, *Pedobiologia* 44, Seite 361-373.
- Cavalier-Smith, T. (1978): Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox, *J. Cell. Sci.* 34, Seite 247-278.
- Cavalier-Smith, T. (1985): Selfish DNA and the origin of introns, *Nature* 315, Seite 283-284.
- Cavalier-Smith, T. (1991): Intron phylogeny: a new hypothesis, *Trends Genet.* 7, Seite 145-148.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Edwards, A.W.F. (1967): Phylogenetic analysis: models and estimation procedures, *Am. J. Hum. Genet.* 19, Seite 233-257.
- Cho, S.; Mitchell, A.; Regier, J.C.; Mitter, C.; Poole, R.W.; Friedlander, T.P. & Zhao, S. (1995): The highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1 $\alpha$  recovers morphology based tree of heliothine moths, *Mol. Biol. Evol.* 12, Seite 650-656.
- Claus, C. (1876): *Untersuchungen zur Erforschung der genealogischen Grundlage des Crustaceen-Systems*, Carl Gerold's Sohn, Wien.
- Clement, J.Q.; Maiti, S. & Wilkinson, M.F. (2001): Localization and stability of introns spliced from the *Pem* homeobox gene, *J. Biol. Chem.* 20.
- Crandall, K.A.; Harris, D.J. & Fetzner, J.W. (2000): The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences, *Proc. R. Soc. Lond. B* 267, Seite 1679-1686.
- Crease, T.J. & Taylor, D.J. (1998): The origin and evolution of variable-region helices in V4 and V7 of the small-subunit ribosomal RNA of branchiopod crustaceans, *Mol. Biol. Evol.* 15, Seite 1430-1446.

- Curole, J.P. & Kocher, T.D. (1999): Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes, *Tree* 14, Seite 394-398.
- Daniels, C.J.; Gupta, R. & Doolittle, W.F. (1985): Transcription and excision of a large intron in the tRNA gene of an archaebacterium, *Halobacterium volcanii*, *J. Biol. Chem.* 260, Seite 3132-3134.
- De Queiroz, K. & Poe, S. (2003): Failed refutations: further comments on parsimony and likelihood methods and their relationship to Popper's degree of corroboration, *Syst. Biol.* 52, Seite 352-367.
- De Rijk, P.; Wuyts, J.; Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (2000): The European large subunit ribosomal RNA database, *Nucleic Acids Res.* 28, Seite 177-178.
- DeSouza, S.J.; Long, M.; Klein, R.J.; Roy, S.; Lin, S. & Gilbert, W. (1998): Towards a resolution of the intron early/late debate: only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, Seite 5094-5099.
- Dixon, M.T. & Hillis, D.M. (1993): Ribosomal RNA secondary structure: compensatory mutations and implications for phylogenetic analysis, *Mol. Biol. Evol.* 10, Seite 256-267.
- Dohle, W. (2001): Are the insects terrestrial crustaceans? A discussion of some new facts and arguments and the proposal of the proper name "Tetraconata" for the monophyletic unit Crustacea + Hexapoda, Deuve, T., *Origin of the Hexapoda. Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 37 Seite 85-103.
- Doolittle, W.F. (1978): Gene in-pieces: were they ever together?, *Nature* 272, Seite 581-582.
- Douzery, E. & Catzeflis, F.M. (1995): Molecular evolution of the mitochondrial 12S rRNA in Ungulata (Mammalia), *J. Mol. Evol.* 41, Seite 622-636.
- Doyle, J.J. & Doyle, L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus* 12, Seite 13-15.
- Edgecombe, G.D.; Wilson, G.D.F.; Colgan, D.J.; Gray, M.R. & Cassis, G. (2000): Arthropod cladistics: combined analysis of histone H3 and U2 snRNA sequences and morphology, *Cladistics* 16, Seite 155-203.
- Eriksson, S. (1934): Studien über die Fangapparate der Branchiopoden nebst einigen phylogenetischen Bemerkungen, *Zool. bidrag fran Uppsala* 15, Seite 23-287.
- Felsenstein, J. (1973): Maximum-likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters, *Syst. Zool.* 22, Seite 240-249.
- Felsenstein, J. (1978): Cases in which parsimony or compatibility will be positively misleading, *Syst. Biol.* 27, Seite 401-410.
- Felsenstein, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach, *J. Mol. Evol.* 17, Seite 368-376.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution* 39, Seite 783-791.

- Felsenstein, J. (1986-1995): Phylip, 3.5.c
- Ferat, J.-L.; Gouar, M.L. & Michel, F. (1994): Multiple group II self-splicing introns in mobile DNA from *Escherichia coli*, *Life Sci.* 317, Seite 141-148.
- Ferat, J.-L. & Michel, F. (1993): Group II self-splicing introns in bacteria, *Nature* 364, Seite 358-361.
- Fetzner, J.W., Jr. & Crandall, K.A. (2002): Genetic variation, Holdich, D.M., *Biology of Freshwater Crayfish* Seite 291-326, Blackwell Science, Oxford.
- Fitzpatrick Jr., J.F. (1995): The eurasian far-eastern crawfishes: a preliminary overview, *Freshwater Crayfish* 8, Seite 1-11.
- Friedrich, M. & Tautz, D. (1995): Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods, *Nature* 376, Seite 165-167.
- Fryer, G. (1987a): A new classification of the branchiopod Crustacea, *Zool. J. Linn. Soc.* 122, Seite 491-536.
- Fryer, G. (1987b): Morphology and the classification of the so-called Cladocera, *Hydrobiologia* 145, Seite 19-28.
- Fryer, G. (1999): A comment on a recent phylogenetic analysis of certain orders of the branchiopod Crustacea, *Crustaceana* 72, Seite 1039-1050.
- Fryer, G. (2001): The elucidation of branchiopod phylogeny, *Crustaceana* 74, Seite 105-114.
- Fryer, G. (2002): Branchiopod phylogeny: facing the facts, *Crustaceana* 75, Seite 85-88.
- Galtier, N.; Gouy, M. & Gautier, C. (1996): SeaView and Phylo\_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny, *Comput. Applic. Biosci.* 12, Seite 543-548.
- Garchia-Machado, E.; Pempera, M.; Dennebouy, N.; Oliva-Suarez, M.; Mounolou, J. & Monnerot, M. (1999): Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta, *J. Mol. Evol.* 49, Seite 142-149.
- Gerstaecker (1866-1979): *Gliederfüßler (Arthropoda)*, Bronn, H.G., *Klassen und Ordnungen des Tierreichs*, Vol. 5, Teil 1 Seite 1029, Akademischer Verlag, Leipzig.
- Gilbert, W. (1978): Why gene in pieces?, *Nature* 271, Seite 501.
- Gilbert, W. (1987): The exon theory of genes, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 52, Seite 901-905.
- Giribet, G. (2001): Exploring the behaviour of POY, a program for direct optimization of molecular data, *Cladistics* 17, Seite 60-70.
- Giribet, G.; Edgecombe, G.D. & Wheeler, W.C. (2001): Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology, *Nature* 413, Seite 157-161.
- Giribet, G. & Ribera, C. (2000): A review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization, *Cladistics* 16, Seite 204-231.

- Gladstein, D. & Wheeler, W.C. (1996-2000): POY-Phylogeny reconstruction via direct optimization of DNA data, New York, American Museum of Natural History, 2.0
- Goldman, N. (1990): Maximum likelihood inference of phylogenetic trees, with special reference to a Poisson process model of DNA substitution and to parsimony analyses, *Syst. Zool.* 39, Seite 345-361.
- Goloboff, P.A. (1993-2000): PIWE/NONA/PHAST/SPA Parsimony with implied weights, Argentina, P. Goloboff, Instituto Miguel Lillo, Tucumán
- Graf, D.L. & Sparks, J.S. (2000): Sometimes too much is not enough: a comment on the use of mtDNA to recover ancient divergences, *Naiive Verificationist* 1, Seite 1-13.
- Graur, D. & Li, W.-H. (2000): *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2. Auflage, Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts.
- Gray, M.W. (1989): The evolutionary origins of organelles, *TIG* 5, Seite 294-299.
- Gray, W.M.; Burger, G. & Lang, F. (1999): Mitochondrial Evolution, *Science* 283, Seite 1476-1481.
- Graybeal, A. (1998): Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem?, *Syst. Biol.* 47, Seite 9-17.
- Gruner, H.E. (1993): Crustacea, Gruner, H.E., KAESTNER, Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band 1: Wirbellose Tiere 4. Teil: Arthropoda (ohne Insecta). Seite 448-1030, G. Fischer, Jena.
- Gutell, R.R.; Larsen, N.; Hertz, G.Z.; Putz, J.S & Stormo, G.D. (1992): Identifying constraints on the higher-order structure of RNA: continued development and application of comparative sequence analysis methods, *Nucleic Acids Res.* 20, Seite 5785-5795.
- Gutell, R.R.; Larsen, N. & Woese, C.R. (1994): Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective, *Microbiol. Rev.* 58, Seite 10-26.
- Gutell, R.R.; Weiser, B.; Woese, C.R. & Noller, H.F. (1985): Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA, *Prog. Nucleic Acid Res.* 32, Seite 155-215.
- Haeckel, E. (1866): *Generelle Morphologie der Organismen: Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformierte Descendenz-Theorie*, Georg Rieme, Berlin.
- Hanner, R. & Fugate, M. (1997): Branchiopod phylogenetic reconstruction from 12S rDNA sequence data, *J. Crust. Biol.* 17, Seite 174-183.
- Hasegawa, M.; Kishino, H. & Yano, K. (1985): Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA, *J. Mol. Evol.* 22, Seite 160-174.
- Hasiotis, S.T & Mitchell, C.E. (1989): Lungfish burrows in the Upper Triassic Chincle and Dolores formations Colorado Plateau-discussion: new evidence suggests origin by a burrowing decapod crustacean, *J. Sediment. Petrol.* 59, Seite 871-875.
- Hendy, M.D. & Penny, D. (1989): A framework for the quantitative study of evolutionary trees, *Syst. Zool.* 38.

- Hennig, W. (1966): Phylogenetic systematics, University of Illinois, Urbana.
- Hickson, R.E.; Simon, C.; Cooper, A.C.; Spicer, G.S.; Sullivan, J. & Penny, D. (1996): Conserved sequence motifs, alignment, and secondary structure of the third domain of animal 12S rRNA, *Mol. Biol. Evol.* 13, Seite 150-169.
- Hickson, R.E.; Simon, C. & Perrey, S.W. (2000): The performance of several multiple sequence alignment programs in relation to secondary-structure features for an rRNA Sequence, *Mol. Biol. Evol.* 17, Seite 530-539.
- Hillis, D.M. (1998): Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, and investigator bias, *Syst. Biol.* 47, Seite 3-8.
- Hillis, D.M.; Pollock, D.D.; McGuire, J.A. & Zwickl, D.J. (2003): Is sparse taxon sampling a problem for phylogenetic inference?, *Syst. Biol.* 52, Seite 124-126.
- Hobbs Jr., H.H. (1988): Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution, Holdich, D.M. und Lowery, R.S., *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Seite 52-82, Croom Helm, London.
- Hoeh, W.R.; Stewart, D.T.; Sutherland, B.W. & Zouros, E. (1996): Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia), *Evolution* 50, Seite 2276-2286.
- Holdich, D.M. & Reeve, I.D. (1988): Functional morphology and anatomy, Holdich, D.M. und Lowery, R.S., *Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation*. Seite 11-51, Croom Helm, London.
- Hovemann, B.; Richter, S.; Walldorf, U. & Cziepluch, C. (1988): Two genes encode related cytoplasmatic elongation factors 1 alpha (EF-1 alpha) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stagespecific expression, *Nucleic Acids Res.* 16, Seite 3175-3194.
- Huxley, T.H. (1880): *The Crayfish: an Introduction in the Study of Zoology*, Kegan Paul, Trench & Co., London.
- Hwang, U.W.; Friedrich, M.; Tautz, D.; Park, C.J. & Kim, W. (2001): Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods and chelicerates, *Nature* 413, Seite 154-157.
- Johnson, K.P. (2001): Taxon sampling and the phylogenetic position of Passeriformes: evidence from 916 avian cytochrome b sequences, *Syst. Biol.* 50, Seite 128-136.
- Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969): Evolution of protein molecules, Munro, H.N., *Mammalian Protein Metabolism*. Seite 21-132, Academic Press, New York.
- Kerfoot, C.W & Lynch, M. (1987): Branchiopod communities: associations with planktivorous fish in space and time, Kerfoot, W.C. und Sih, A., *Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities*. Seite 367-378, Hanover: University Press of New England.
- Kidwell, M.G. & Lisch, D.R. (2001): Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution, *Int. J. Org. Evol.* 55, Seite 1-24.

- Kim, S.H. (1979): Crystal structure of yeast tRNA-phe and general structural features of other tRNAs, Schimmel, P.R.; Soll, D. und Abelson, J.N., Transfer RNA: structure, properties and recognition., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Kishino, H. & Hasegawa, M. (1989): Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea, J. Mol. Evol. 29, Seite 170-179.
- Kjer, K.M. (1995): Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs, Mol. Phylogenet. Evol. 4, Seite 314-330.
- Kluge, A.G. (2001): Philosophical conjectures and their refutation, Syst. Biol. 50, Seite 322-330.
- Konings, D.A.M & Gutell, R.R. (1995): A comparison of thermodynamic foldings with comparatively derived structures of 16S and 16S-like rRNAs, RNA 1, Seite 559-574.
- Kurabayashi, A. & Ueshima, R. (2000): Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive ophisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genome organization, Mol. Biol. Evol. 17, Seite 266-277.
- Lake, J. (1991): The order of sequence alignment can bias the selection of tree topology, Mol. Biol. Evol. 8, Seite 378-385.
- Lang, B.F.; Burger, G.; O'Kelly, C.J.; Cedergren, R.; Golding, G.B.; Lemieux, C.; Sankoff, D.; Turmel, M. & Gray, M.W. (1997): An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature, Nature 387, Seite 493-497.
- Lavrov, D.V.; Boore, J.L. & Brown, W.M. (2002): Complete mtDNA sequences of two millipedes suggest a new model for mitochondrial gene rearrangements: duplication and nonrandom loss, Mol. Biol. Evol. 19, Seite 163-169.
- Lecointre, G.; Philippe, H.; Van Le, L. & Le Guyader, H. (1993): Species sampling has a major impact on phylogenetic inference, Mol. Phylogenet. Evol. 2, Seite 205-224.
- Li, W.H. (1997): Molecular evolution, Sinauer; Sunderland, MA.
- Linder, F. (1945): Affinities within the Branchiopoda with notes on some dubious fossils, Ark. för Zool. 37A, Seite 1-28.
- Llopart, A.; Comeron, J.M.; Brunet, F.G.; Lachaise, D. & Long, M. (2002): Intron presence-absence polymorphism in *Drosophila* driven by Darwinian selection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, Seite 8121-8126.
- Logsdon, J.M., Jr.; Stoltzfus, A. & Doolittle, W.F. (1998): Recent cases of spliceosomal intron gain?, Curr. Biol. 8, Seite R560-R563.
- Logsdon Jr., J.M. (1998): The recent origins of spliceosomal introns revisited, Curr. Opin. Genet. Dev. 8, Seite 637-648.

- Lynch, M. & Richardson, A.O. (2002): The evolution of spliceosomal introns, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, Seite 701-710.
- Machida, R.J.; Miya, M.U.; Nishida, M. & Nishida, S. (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda), *Mar. Biotechnol.* 4, Seite 406-417.
- Margush, T. & McMorris, F.R. (1981): Consensus n-trees, *Bull. Math. Biol.* 43, Seite 239-244.
- Martin, J.W. & Belk, D. (1988): Review of the clam shrimp family Lynceidae Stebbing, 1902 (Branchiopoda: Conchostraca), in the Americas, *J. Crust. Biol.* 8, Seite 451-482.
- Martin, J.W. & Cash-Clark, C.E. (1995): The external morphology of the onychopod ``cladoceran`` genus *Bythotrephes* (Crustacea, Branchiopoda, Onychopoda, Cercopagididae), with notes on the morphology and phylogeny of the order Onychopoda, *Zool. Scripta* 24, Seite 61-90.
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977): A new method for sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, Seite 560-564.
- Michel, F. & Ferat, J.L. (1995): Structure and activities of group II introns, *Annu. Rev. Biochem.* 64, Seite 435-461.
- Mordukhai-Boltovskoi, P.D. (1968): On the taxonomy of the Polyphemidae, *Crustaceana* 14, Seite 197-209.
- Moreira, D.; Le Guyader, H. & Philippe, H. (1999): Unusually high evolutionary rate of the elongation factor 1 alpha genes from the Ciliophora and its impact on the phylogeny of eukaryotes, *Mol. Biol. Evol.* 16, Seite 234-245.
- Mullis, M.W.; Falcoma, F.; Scharf, S.; Snikl, R.; Horn, G. & Ehrlich, H. (1986): Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51, Seite 260.
- Munasinghe, D.H.N.; Murphy, N.P. & Austin, C.M. (2003): Utility of mitochondrial DNA sequences from four gene regions for systematic studies of Australian freshwater crayfish of the genus *Cherax* (Decapoda: Parastacidae), *J. Crust. Biol.* 23, Seite 402-417.
- Murphy, W.J.; Eizirik, W.E.; Johnson, W.E.; Zhang, Y.P.; Ryder, O.A. & O'Brien, S.J. (2001): Molecular phylogenetics and the origin of placental mammals, *Nature* 409, Seite 614-618.
- Nardi, F.; Carapelli, A.; Fanciulli, P.P.; Dallai, R. & Frati, F. (2001): The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielensis*: evidence for heteroplasmy and tRNA translocations, *Mol. Biol. Evol.* 18, Seite 1293-1304.
- Nardi, F.; Spinsanti, G.; Boore, J.L.; Carapelli, A.; Dallai, R. & Frati, F. (2003): Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic?, *Science* 299, Seite 1887-1889.
- Negrea, S.; Botnariuc, N. & Dumont, H.J. (1999): Phylogeny, evolution and classification of the Branchiopoda (Crustacea), *Hydrobiologia* 412, Seite 191-212.
- Nixon, K.C. (1999-2000): Winclada (beta), N.Y., Ithaca, 0.9.9

- Nugent, J.M. & Palmer, J.D. (1991): RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution, *Cell* 66, Seite 2636-2640.
- Olesen, J. (1998): A phylogenetic analysis of the Conchostraca and Cladocera (Crustacea, Branchiopoda, Diplostraca), *Zool. J. Linn. Soc.* 122, Seite 491-536.
- Olesen, J. (2000): An updated phylogeny of the Conchostraca-Cladocera clade (Branchiopoda, Diplostraca), *Crustaceana* 73, Seite 869-886.
- Olesen, J. (2002): Branchiopod phylogeny-continued morphological support for higher taxa like the Diplostraca and Cladocera, and for paraphyly of 'Conchostraca' and 'Spinicaudata', *Crustaceana* 75, Seite 77-84.
- Olesen, J.; Martin, J.W. & Roessler, E.W. (1996): External morphology of the male of *Cyclestheria hislopi* (Baird, 1859) (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata), with a comparison of male claspers among the Conchostraca and Cladocera and its bearing on phylogeny of the "bivalved" Branchiopoda, *Zool. Scripta* 25, Seite 291-316.
- Olsen, G.J. & Woese, C.R. (1993): Ribosomal RNA: a key to phylogeny, *FASEB J.* 7, Seite 113-123.
- Ortmann, A.E. (1897): Ueber 'Bipolarität' in der Verbreitung mariner Tiere, *Zoologische Jahrbücher, Abteilung Systematik.* 9, Seite 571-595.
- Page, R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Comput. Applic. Biosci.* 12, Seite 357-358.
- Palmer, J.D. & Logsdon, J.M., Jr. (1991): The recent origins of introns, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, Seite 470-477.
- Philippe, H. & Laurent, J. (1998): How good are deep phylogenetic trees?, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, Seite 616-623.
- Phillips, A.; Janies, D. & Wheeler, W.C. (2000): Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis, *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, Seite 317-330.
- Poe, S. (1998): Sensitivity of phylogeny estimation to taxonomic sampling, *Syst. Biol.* 47, Seite 18-31.
- Poe, S. & Swofford, D.L. (1999): Taxon sampling revisited, *Nature* 398, Seite 299-300.
- Popper, K. (1963): *Conjectures and Refutations*, Schick, T., Routledge and Keagan Paul, London.
- Preuss, G. (1951): Die Verwandtschaft der Anostraca und Phyllopopoda, *Zool. Anz.* 147, Seite 50-63.
- Regier, J.C. & Shultz, J.W. (1997): Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods, *Mol. Biol. Evol.* 14, Seite 902-913.
- Regier, J.C. & Shultz, J.W. (1998): Molecular phylogeny of arthropods and the significance of the Cambrian 'explosion' for molecular systematics, *Am. Zool.* 38, Seite 918-928.
- Richter, S. (2002): The Tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea, *Org. Divers. Evol.* 2, Seite 217-237.

- Richter, S.; Braband, A. & Scholtz, G. (2001): The phylogenetic relationships of 'predatory water-fleas' (Cladocera: Onychopoda, Haplopoda) inferred from 12S rDNA, *Mol. Phylogenet. Evol.* 19, Seite 105-113.
- Rieppel, O. (1999): Einführung in die computergestützte Kladistik, Dr. Friedrich Pfeil, München.
- Rivera, M.C. & Lake, J.A. (1992): Evidence that eukaryotes and eocyte prokaryotes are immediate relatives, *Science* 257, Seite 74-76.
- Rode, A.L. & Babcock, L.E. (2003): Phylogeny of fossil and extant freshwater crayfish and some closely related nephropid lobsters, *J. Crust. Biol.* 23, Seite 418-435.
- Roessler, E.W. (1995): Review of Colombian Conchostraca (Crustacea) -ecological aspects and life-cycles-family Cycletheriidae, *Hydrobiologia* 298, Seite 113-124.
- Roger, A.J. & Doolittle, W.F. (1993): Molecular evolution Why introns-in-pieces?, *Nature* 364, Seite 289-290.
- Roger, A.J.; Sandblom, O.; Doolittle, W.F. & Philippe, H. (1999): An Evaluation of elongation factor 1alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes, *Mol. Biol. Evol.* 16, Seite 218-233.
- Rosenberg, M.S. & Kumar, S. (2001): Incomplete taxon sampling is not a problem for phylogenetic inference, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, Seite 10751-10756.
- Rosenberg, M.S. & Kumar, S. (2003): Taxon sampling, bioinformatics, and phylogenomics, *Syst. Biol.* 52, Seite 119-124.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987): The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4, Seite 406-425.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA.
- Sanchis, A.; Michelena, J. M.; Latorre, A.; Quicke, D. L. J.; Gärdenfors, U. & Belshaw, R. (2001): The phylogenetic analysis of variable-length sequence data: elongation factor-1 alpha introns in european populations of the parasitoid wasp genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae), *Mol. Biol. Evol.* 18, Seite 1117-1131.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulsen, A.R. (1977): DNA-sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, Seite 5463-5467.
- Sanmartín, I.; Enghoff, H. & Ronquist, F. (2001): Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic, *Biol. J. Linn. Soc.* 73, Seite 345-390.
- Schmidt, H.A.; Strimmer, K.; Vingron, M. & von Haeseler, A. (1999-2000): TREE-PUZZLE, 5.0
- Schmidt, H.A.; Strimmer, K.; Vingron, M. & von Haeseler, A. (2002): TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing, *Bioinformatics* 18, Seite 502-504.
- Schminke, H.K. (1981): Adaptation of Bathynellacea (Crustacea, Syncarida) to life in the interstitial ('Zoea Theory'), *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 66, Seite 575-637.

- Schminke, H.K. (1996): Crustacea, Krebse, Westheide, W. und Rieger, R., Spezielle Zoologie. 1. Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. Seite 501-581, Fischer, Stuttgart.
- Scholtz, G. (1993): Teloblasts in decapod embryos: an embryonic character reveals the monophyletic origin of freshwater crayfishes (Crustacea, Decapoda), Zool. Anz. 230, Seite 45-54.
- Scholtz, G. (1995): Ursprung und Evolution der Flußkrebse (Crustacea, Astacida), Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin (NF) 34, Seite 93-115.
- Scholtz, G. (1998): Von Zellen und Kontinenten-die Evolution der Flusskrebse (Decapoda, Astacida), Staphia 58, Seite 205-212.
- Scholtz, G. (1999): Freshwater crayfish evolution, Freshwater Crayfish 12, Seite 37-48.
- Scholtz, G. (2002): Phylogeny and evolution, Holdich, D.M., Biology of Freshwater Crayfish. Seite 30-52, Blackwell Science, Oxford.
- Scholtz, G.; Braband, A.; Tolley, L.; Reimann, A.; Mittmann, B.; Lukhaup, C.; Steuerwald, F. & Vogt, G. (2003): Parthenogenesis in an outsider crayfish, Nature 421, Seite 806.
- Scholtz, G. & Kawai, T. (2002): Aspects of embryonic and postembryonic development of the Japanese freshwater crayfish *Cambaroides japonicus* (Crustacea, Decapoda) including a hypothesis on the evolution of maternal care in the Astacida, Act. Zool. 83, Seite 202-212.
- Scholtz, G. & Richter, S. (1995): Phylogenetic systematics of reptantian Decapoda (Malacostraca: Crustacea), Zool. J. Linn. Soc. 113, Seite 289-328.
- Schram, F.R. (2001): Phylogeny of decapods: moving towards a consensus, Hydrobiologia 449, Seite 1-20.
- Schwenk, K.; Sand, A.; Boersma, M.; Brehm, M.; Mader, E.; Offerhaus, D. & Spaak, P. (1998): Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the Cladocera, Aquat. Ecol. 32, Seite 37-51.
- Sharp, P.A. (1985): On the origin of RNA splicing and introns, Cell 42, Seite 397-400.
- Shultz, J.W. & Regier, J.C. (2000): Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean + hexapod clade, Proc. R. Soc. Lond. B 267, Seite 1011-1019.
- Sidall, M.E. & Kluge, A.G. (1997): Probabilism and phylogenetic inference, Cladistics 13, Seite 313-336.
- Smith, G.W. (1912): The freshwater crayfishes of Australia, Proc. Zool. Soc. 10, Seite 144-171.
- Spears, T. & Abele, L.G. (2000): Branchiopod monophyly and interordinal phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA, J. Crust. Biol. 20, Seite 1-24.
- Springer, M.S. & Douzery, E. (1996): Secondary structure and patterns of evolution among mammalian 12S rRNA molecules, J. Mol. Evol. 43, Seite 357-373.

- Stoltzfus, A.; Logsdon, J.M., Jr.; Palmer, J.D. & Doolittle, W.F. (1997): Intron 'sliding' and the diversity of intron positions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, Seite 10739-10744.
- Strimmer, K. & von Haeseler, A. (1996): Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies, *Mol. Biol. Evol.* 13, Seite 964-969.
- Strimmer, K. & von Haeseler, A. (1997): Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, Seite 6815-6819.
- Strukla, G.C. & Padgett, R.A. (2002): A catalytically active group II intron domain 5 can function in the U12-dependent spliceosome, *Mol. Cell* 9, Seite 1145-1150.
- Studier, J.A. & Keppler, K.J. (1988): A note on the neighbour-joining algorithm of Saitou and Nei, *Mol. Biol. Evol.* 5, Seite 729-731.
- Swain, T.D. & Taylor, D.J. (2003): Structural rRNA characters support monophyly of raptorial limbs and paraphyly of limb specialization in water fleas, *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, Seite 887-896.
- Swofford, D.L.; Olsen, G.J.; Waddell, P.J. & Hillis, D.M. (1996): *Phylogenetic inference*, Hillis, D.M.; Moritz, C. und Mable, B.K., *Molecular systematics*, Sinauer, Sunderland, MA.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Mol. Biol. Evol.* 10, Seite 512-526.
- Tasch, P. (1969): Branchiopoda, Moore, C., *Treatise on invertebrate paleontology*, part R: Arthropoda 4 1 Seite 128-191, Geological Society of America, Boulder, and University of Kansas Press, Lawrence, Kansas.
- Taylor, D.J.; Crease, T.J. & Brown, W.M. (1999): Phylogenetic evidence for a single long-lived clade of crustaceans cyclic parthenogens and its implications for the evolution of sex, *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, Seite 791-797.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997a): ClustalX, 1.8
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997b): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 24, Seite 4876-4882.
- Titus, T.A. & Frost, D.R. (1996): Molecular homology assessment and phylogeny in the lizard family Opluridae (Squamata: Iguania), *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, Seite 49-62.
- Turbeville, J.M.; Pfeifer, D.M.; Field, K.G. & Raff, R.A. (1991): The phylogenetic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences, *Mol. Biol. Evol.* 8, Seite 669-686.
- Umetsu, K.; Iwabuchi, N.; Yuasa, I.; Saitou, N.; Clark, P.F.; Boxshall, G.; Osawa, M. & Igarashi, K. (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of a tadpole shrimp (*Triops cancriformis*) and analysis of museum samples, *Electrophoresis* 23, Seite 4080-4084.
- Van de Peer, Y.; Van de Rijk, P.; Wuyts, J.; Winkelmans, T. & De Wachter, R. (2000): The European small subunit ribosomal RNA database, *Nucleic Acids Res.* 28, Seite 175-176.

- Van de Peer, Y.; Van den Broeck, I.; De Rijk, P. & De Wachter, R. (1994): Database on the structure of small ribosomal subunit RNA, *Nucleic Acids Res.* 22, Seite 3488-94.
- Wada, H.; Kobayashi, M.; Sato, R.; Satoh, N.; Miysaka, H. & Shirayama, Y. (2002): Dynamic insertion-deletion of introns in deuterostome EF-1 alpha genes, *J. Mol. Evol.* 54, Seite 118-128.
- Wägele, J.W. (2000): *Grundlagen der Phylogenetischen Systematik*, Dr. Friedrich Pfeil, München.
- Wägele, J.W.; Erikson, T.; Lockhart, P. & Misof, B. (1999): The Ecdysozoa: artifact or monophylum?, *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 37, Seite 211-223.
- Walossek, D. (1993): The Upper Cambrian *Rehbachella* and the phylogeny of Branchiopoda and Crustacea, *Fossils Strata* 32, Seite 1-202.
- Walossek, D. (1995): The Upper Cambrian *Rehbachella*, its larval development, morphology and significance of Branchiopoda and Crustacea, *Hydrobiologia* 298, Seite 1-13.
- Walossek, D. (1999): On the Cambrian diversity of Crustacea, Schram, F.R. und von Vaupel Klein, J.C., *Crustaceans and the Biodiversity Crisis-Proceedings of the Fourth International Crustacean Congress*, Amsterdam. Seite 3-27, Brill, Leiden.
- Weiner, A. (2002): SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you, *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, Seite 343-350.
- Wheeler, W.C. (1995): Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data, *Syst. Biol.* 44, Seite 321-331.
- Wheeler, W.C.; Cartwright, P. & Hayashi, C.Y. (1993): Arthropod phylogeny: a combined approach, *Cladistics* 9, Seite 1-39.
- Wheeler, W.C. & Honeycutt, R.L. (1988): Paired sequence differences in ribosomal RNAs: evolution and phylogenetic implications, *Mol. Biol. Evol.* 5, Seite 90-96.
- Whiting, K.G.; Carpenter, J.C.; Wheeler, Q.D. & Wheeler, W.C. (1997): The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology, *Syst. Biol.* 46, Seite 1-68.
- Wilson, K.; Cahill, V.; Ballment, E. & Benzie, J. (2000): The complete sequence of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods?, *Mol. Biol. Evol.* 17, Seite 863-874.
- Wilson, R. (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigation biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium, *Science* 282, Seite 2012-2018.
- Wingstrand, K.G. (1978): Comparative spermatology of the Crustacea Entomostraca I subclass Branchiopoda, *Kong. Dansk. Vidensk. Selsk. Biolog. Skrifter* 22, Seite 1-67.
- Woese, C.R. (1987): Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51, Seite 221-271.
- Woese, C.R.; Magrum, L.J.; Gupta, R.; Siegel, R.B.; Stahl, D.A.; Kop, J.; Crawford, N.; Brosius, J.; Gutell, R.; Hogan, J.J. & Noller, H.F. (1980): Secondary structure model for bacterial 16S

- ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence, *Nucleic Acids Res.* 8, Seite 2275-2293.
- Yamauchi, M.; Miya, M. & Nishida, M. (2002): Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (Crustacea: Decapoda), *Gene* 295, Seite 89-96.
- Yang, Z. (1993): Maximum likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites, *Mol. Biol. Evol.* 10, Seite 1396-1401.
- Zrzavý, J. & Stys, P. (1997): The basic body plan of arthropods: insights from evolutionary morphology and developmental biology, *J. Evol. Biol.* 10, Seite 353-367.
- Zuckerlandl, E. & Pauling, L. (1965): Molecules as documents of evolutionary history, *J. Theor. Biol.* 8, Seite 357-366.
- Zwickl, D.J. & Hillis, D.M. (2002): Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error, *Syst. Biol.* 51, Seite 588-598.
- Zwieb, C.; Glotz, C. & Brimacombe, R. (1981): Secondary structure comparisons between small subunit ribosomal RNA molecules from six different species, *Nucleic Acids Res.* 9, Seite 3621-3640.

# Anhang

## 12S rRNA (Branchiopoda)

	27 part.		27'		27'	
Artemia	-ACAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUAGUUCA--UUU	CCAAU----	UUAA	
Boccident	UAAAACUG-GG	-AUUAGAUAC	CCCACUAUUU----UAU	CUUUU-----	GAU	
Linderiell	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Bpinnata	UAAAACUG-GG	-AUUAGAUAC	CCCACUAUUU----UAU	CUUAU-----	AUU	
Parartemia	-CCAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUAGA-CU--UAA	AUAGA-----	UUU	
Streptocep	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Lapus	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUCUU--UAU	UGUUU---	AGUGC	
Lbilobatus	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Taustral	-UAAACUA-GG	-AUUAGAU-C	CC-UAUUAUUCUC-UAU	AUAUA----	AUUG	
Tcancrif	-UAAACUA-GG	-AU-AGAU-C	CCAUAU-AUCCCA-UAU	AAAUU---	UGUUG	
Tlongicau	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Ltatei	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUUAU--GAA	GUGAA-GUUAAA		
Lbiformis	AUAGACUAUGG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUAAU--AG	AUGAA--UAAAA		
Lbrachyuru	-UAAACUA-GG	-AUUAGAGAC	CCUAUUUAUAGUAAAA	AUGUU-----	GU	
Imnadia	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUACUAUUCUU--AUC	CUU-----	CAUUG	
Cestheriel	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUCAU--A-C	CUAA----	AAUUG	
Cherneyi	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUCAC--A-C	CUAA----	AACUG	
Leptesther	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUACUAUUCUC--AU-	UAUA----	AUUCG	
Lkawachien	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUACUAUUCUC--AU-	CAAU----	UUUUG	
Limnadia	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUCUU--AU-	CUAA----	UUUUG	
Eulimnadia	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Lbirchii	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUACUAUUCUU--A-C	CUCC----	CGUUG	
Eocycticus	--AAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUACUAUUCUU--A-C	CUUU---	AUAAUG	
Cyzicus	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Cyclesther	-AAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUCUU--A--	CUAAUGUUAUUUG		
Simocephal	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGUUAUUUU-----	CUAAA-UUUUUU		
Eurycercus	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Pseudochyd	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUAUUUAUUUA-AAU-	GAAAG----	UUUA	
Moina	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Bosmina	UAAAAUCA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGGUUAUCA-AUUUA	CUUUA-----	AGA	
Ilyocryptu	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Dpulex	-AAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGUUAUUCUAAAUA	UAAUG-----	UAA	
Ceriodaphn	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNNNN		
Scapholebe	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGUUAUUAUGAGUUA	UAAUC-----	GAU	
Sida	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGUUAUU-UU---AA	CUAAA---	UGAUU	
Diaphanoso	-AAAACUA-GG	-AUUAGAGAC	CCUGCUAUUUUA---GU	AAAAA----	UUUA	
Leptodora	-UAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGUUAUUCUU-----	CUUGAAAGCUUA		
Polyphemus	-AAGACUA-GG	-AUUAGAGAC	CCUAUUUAUUCUA---GC	CCCUC-----	UAUG	
Bythotreph	-AAACCCAGGG	AAUAGAUAC	CCUGCUAUACUA---GU	AUACA----	UAUG	
Evadne	-AAAAGCA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGUUAUCCCA---GC	CCAAU--	AACUUG	
Pleuckarti	-AAAACUA-GG	-AUUAGAUAC	CCUGUUAUCCCA---GU	UGACUU---	CUUG	

	22'	31		31'	32		
Artemia	CCUG	GGU	AGU	AU-----UAUUUA-	ACCU	AAAGAAUU	UGGCGGUUUCUA
Boccident	CUUG	GGU	AGU	AA-----GAUUGAA-	ACCU	AAAGAAUU	UGGCGGUUUUUG
Linderiell	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGUUUAAA
Bpinnata	CUUG	GGU	AGU	AA-----UAUUGAA-	ACCU	AAAGAAUU	UGGCGGUUUUUG
Parartemia	CUGG	GGU	AGU	AU-----UAUAGAA-	ACCU	AAAGAAUU	UGGCGGUUUCUA
Streptocep	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGUUUUUA
Lapus	CCUG	GGU	AGU	AGAGA-U--AUUUUUA	ACCU	AAAGAAUU	UGGCGGUACUUC
Lbilobatus	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGUACUUC
Taustral	CCAG	GGU	AGU	AAAAA----AUUUUUA	ACCU	AAAGAAUU	UGGCGGUACUUU
Tcancrif	CCAG	GGU	AGU	AGAGA-----UCUUUA	ACCU	AAAGAAUU	UGGCGGUACUUC
Tlongicau	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGACGGUACCUU
Ltatei	CUUG	AGU	AGU	AGAAU----UUUUUUA	ACUC	AAAGAAUU	UGGCGGUUUUUU
Lbiformis	CUUG	AGU	AGU	AGAUU----UAUUUUA	ACUC	AAAGAAUU	UGGCGGUUUUUU
Lbrachyuru	CUUG	GGU	AGU	AUAAA----UUUUUUA-	ACCC	AAAGAAUU	UGGCGGUUUUUU
Imnadia	CCAG	GGU	AGU	AAAAG-AUUAUCUCCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGACGGUACUUC
Cestheriel	CCAG	GGU	AGU	AAAAG-AUAUUCUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGGCGGCACUUC
Cherneyi	CCGG	GGU	AGU	AAAAG-AUAUUCUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGGCGGCACUUC
Leptesther	CUCG	GGU	AGU	AAAAG-AGAUCUUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGACGGCACCCC
Lkawachien	CCCG	GGU	AGU	AAAAG-AGAUCUUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGACGGCACUUC
Limnadia	CCAG	GGU	AGU	AAAAG-UAAAUCUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGACGGCACUUC
Eulimnadia	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGACGGCACUUC
Lbirchii	CCAG	GGU	AGU	AAAAG-AAAUCUUCAA	ACCC	AAAGAAU-	UGACGGCACUUC
Eocycticus	CUAG	GGU	AGU	AAAAG-ACAAUCUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGACGGCACUUC
Cyzicus	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGCAUUUC
Cyclesther	CUGG	GGU	AGU	AAAAG-AGGAUCUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGGCGGUGCUUU

Simocephal	CAAG	GGU	AGU	AAAAG-UUAUCCUCAA	ACCC	AAAGGUUU	UGGCGGCAUUUU
Eurycercus	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGUGUCUU
Pseudochyd	UUUG	GGU	AGU	AAAAG-UAAUUCUCAA	ACCC	ACAGAUUC	UGGCGGUAUUUU
Moina	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGUAUUUC
Bosmina	UUAG	GGU	AGU	AAAAG-UUGUGCUCAA	ACCC	AAAGAUUU	UGGCGGUAUUUC
Ilyocryptu	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGCAUUUU
Dpulex	AUAG	GGU	AGU	AAAAG-UAGUUCUCAA	ACCC	AAAGAUUU	UGGCGGUAUUUC
Ceriodaphn	NNNN	NNN	NNN	NNNNNNNNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNNU	UGGCGGCAUUUU
Scapholebe	CUAG	GGU	AGU	AAAAGCUUAUUCUCAA	ACCC	AAAGGUUU	UGGCGGCUUUUU
Sida	UUAG	GGU	AGU	AAAAG-AUGUUCUCAA	ACCC	AAAGAUUU	UGGCGGUAUUUC
Diaphanoso	UCAG	GGU	AGU	AAAAG-AAAUCUCAA	ACCC	AAAGACUU	UGGCGGUAUUUC
Leptodora	CUAG	GGU	AGU	AAAAG--AAUUCUCAA	ACCC	AAAGAAUU	UGGCGGUAACUU
Polyphemus	UAAG	GGU	AGU	AAAAG-AUGUUCUCAA	ACCC	AAAGAUUU	UGGCGGUGCCUU
Bythotreph	UUAG	GGU	AGU	AAAAG-AAAUCUCAA	ACCC	AAAGACUU	UGGCGGCAUCCU
Evadne	UCAG	GGU	AGU	AAAAG-ACGUUCUCAA	ACCC	AAAGAUUU	UGGCGGCAUCUU
Pleuckarti	UCAG	GGU	AGU	AAAAG-AUAUUCUCAA	ACCC	AAAGAUUU	UGGCGGCAUCUU

		33		34		35		35'	
Artemia	AA-CUUA	CUAGA	GG	AACCGCCCC	AUAAA	CG	ACAAUCCA	CG	AGACAAUCGA
Bocci	AA-CUCU	CUAGA	GG	AAUCUGUCCU	AUAAU	CG	AUAGCCCA	CG	AAUUUAUUUA
Linderiella	AA-CUUA	CUAGG	GG	AAUCUGUCCU	AUAAU	CG	AUAGCCCA	CG	AGCAUUUACU
Bpinnata	AA-CUCU	CUAGA	GG	AAUCUGUCCU	AUAAU	CG	AUAGCCCA	CG	AACUUUUUA
Parartemia	GA-CUCA	UCAGA	GG	AACUGUCCCC	GUAUU	CG	AUAAUCCA	CG	AGUAAAAGGUA
Streptocephal	AA-CUUA	CUAGA	GG	AACCGUCCCC	GUAUU	CG	AUAGUCCA	CG	AGUUUAUGCA
Lepidurus	AUUCUUA	CUAGA	GG	AACCGUCUCU	UGUAU	CG	AUAUCCA	CG	AUUAAAUUUA
Lepibilo	AUUCUUA	CUAGA	GG	AACCGUCUCU	UGUAU	CG	AUAACCCA	CG	AUUAAAUUU-
Taustrali	AUUCUUA	CUAGA	GG	AACCGUCUCU	UGGAU	CG	AUAAUCCA	CG	UUUAAAUGUA
Tcancri	AUUCUUA	CUAGA	GG	AACCGUCUCU	UGGAU	CG	AUAUCCA	CG	UUUAAAUGUA
Tlong	ACUCUUA	CUAGA	GG	AACCGUCUCU	UGGAU	CG	AUAAUCCA	CG	UUUUA-UGUA
Ltatei	AU-CAGU	UUAGA	GG	AACCGUUA	AUAAU	UG	AUAGUCCA	CA	UUUAUUCUUA
Lbiformis	AU-CAAU	UUAGA	GG	AACCGUUA	GUAUU	UG	AUAGUCCA	CG	UUUUUUCUUA
Lbrachyurus	AU-CAGA	UUAGA	GG	AACCGCUAA	GUAUU	CG	AUAGUCCA	CG	UUUUUUCUUG
Imnadia	ACUCUUU	CCAGA	GG	AACCGUCCC	GUAUU	CG	ACAAUCCA	CG	UUUUACCUUA
Caenella	AUUCUCC	CCAGA	GG	AACCGUCCC	UUUAU	CG	ACAAUCCA	CG	CUUAACCUUA
Caenestheria	AUUCUCU	UCAGA	GG	AACCGUCCC	UUUAU	CG	ACAAUCCA	CG	CUUAACCUUA
Leptestheria	AU-CUUA	CCAGA	GG	AACCGUCCC	AUAAU	CG	AUAAUCCA	CG	CUACAACUUA
Lkawachiensis	AU-CUUA	CCAGA	GG	AACCGUCCC	AUAAU	CG	AUAAUCCA	CG	UUAAACCUUA
Limnadia	ACUCUUU	CCAGA	GG	AACCGUCCC	GUAUU	CG	ACAGUCCA	CG	CUAAACCUUA
Eulimnadia	AUUCUUA	UCAGA	GG	AACCGUCCC	UUUAU	CG	AUAGUCCA	CG	UUUUUACUUG
Limnadopsis	AUCCUUA	CCAGA	GG	AACCGUCCC	UUUAU	CG	AUAGUCCA	CG	UUUUUACCUA
Eocycticus	AUUCUUA	UCAGA	GG	AACUGUCCCC	UUUAU	CG	AUAAUCCU	CG	UUUAUCCUUU
Cyzicus	AUUCUCU	UCAGA	GG	AACUGUCCCC	UUUAU	CG	ACAAUCCC	CG	CUUUUACCUA
Cyclestheria	UA-CUGG	CCAGA	GG	AACUGUCCU	GUAUU	UG	AUAUCCU	CA	AAU-AUCUUA
Simocephalus	AA-CCAA	ACAGA	GG	AGCUUGUCCU	AUAAU	CG	AUAAUCCU	CG	UUUUUUCUUA
Eurycercus	UA-CUAA	GCAGA	GG	AGCUUGUCUC	AUAAU	CG	AUAAUCCC	CG	UUUUUUCUUA
Pseudochydoru	UA-GUAA	ACAGA	GG	AAUUUGCCUA	GUAUU	UG	AUAAUCCU	CG	UUUGAUUCUU
Moina	UA-CCAA	AUAGA	GG	AGCUUGUCCC	GUAUU	CG	AUAAUCCU	CG	UUUAUUCUUA
Bosmina	GA-CCAG	ACAGA	GG	AGCUUGUUUU	UUUAU	UG	AUGAUCCC	CA	UUUUUUCUUA
Ilyocryptus	AA-CCUU	GCAGG	GG	AGCUUGUCUU	GUAUU	CG	AUAAUCCU	CG	UAAUAUCUUA
Daphnia	UA-CCUA	AUAGA	GG	AGCUUGUCCU	AUAAU	UG	AUAGUCCC	CA	UUUUUUCUUA
Ceriodaphnia	UG-CCGA	ACAGA	GG	AGCUUGUUUC	GUAUU	UG	AUAAUCCU	CA	AUACACCUUA
Scapholeberis	UA-CCUA	CCAGA	GG	AGUUUGUCCC	GUAUU	UG	AUAAUCCC	CA	CUUUUACCUUA
Sida	CA-CUUU	ACAGA	GG	AGCUUGUCUC	AUAAU	UG	AUAAUCCU	CG	AUUUACCUUU
Diaphanosoma	CA-CACA	ACAGA	GG	AGCUUGUCCC	AUAAU	CG	AUAAUCCC	CG	UUUUUUCUUA
Leptodora	UA-CCUA	ACAGA	GG	AGCUUGCCU	UUAAA	UG	AUAGUCCC	CG	UUAGAUCUUU
Polyphemus	UA-CCUA	GUAGA	GG	AGCUUGUCGU	AUAAU	UG	AUAAUCCC	CA	UUAAAUCUUA
Bythotrepes	AA-CCUA	ACAGA	GG	AGCUUGUCAC	AUAAU	UG	AUACCCU	CA	UUUAUUCUUU
Evadne	AA-CCUC	ACAGA	GG	AGCUUGUCGU	GUAUU	CG	AUAAUCCC	CG	AUAAAUCUUA
Podon	AA-CCUC	ACAGA	GG	AGCUUGUCGU	GUAUU	CG	AUAAUCCC	CG	UUAAAUCUUA

	36		38		39	40	40'	
Artemia	CCCGUUC	UUGUAAAACA	GUUUUAUACCGUCGUU	-U--A	GGGG-AU	UAA	AUAA	AUA
Bocci	CCUAUUU	UUGUUUAU-CA	GUUUUAUACCGCCGUU	-U--A	GGGA-AC	UAA	AUAA	AUA
Linderiella	CCUUUUU	UUGUCUA-CA	GUUUUAUACCGCCGUC	GU--A	GGGA-AU	UGU	UAAA	GCA
Bpinnata	CCUAUUU	UUGUUUUCAG	GUUUUAUACCGCCGUU	-U--A	GGGA-AC	UAA	AUGA	AUA
Parartemia	CCUGUCC	UCGUUGU-CA	GUUUUAUACCGUCGUU	-U--A	GAGA-GC	UUC	AUUA	AUA
Streptocephal	CCUAUUU	UUGUCAC-CA	GUUUUAUACCGCCGUU	-U--A	GUGA-AU	UAA	AUAA	AUA
Lepidurus	CAUAUUU	UUGUUUU-CA	GUUUUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AU	UUU	UAAA	AAA
Lepibilo	CAUAUUU	UUGUUUU-CA	GUUUUAUACCGCCGUU	GUACA	GAUU-AU	UUU	UAAA	GAA
Taustrali	CAUGUUU	UGGUUUU-CA	GUUUUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AU	UUU	UAAA	AAA
Tcancri	CAUAUUU	UUGUAUU-CA	GUUUUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AU	UUU	UAGA	AAA
Tlong	CAUGUUU	UUGUUUU-CA	GUUUUAUACCGCCGUU	GUACA	GAUU-AU	UUU	UAAA	AAA
Ltatei	CAUUGAU	UUGUUUAU-CA	GUUUUAUACCUCCGUU	GU-CA	GAAAGGU	UUU	GAAA	AAU
Lbiformis	CAUUAGU	UUGUUGUUA	GUUUUAUACCUCCGUU	GU-UA	GAAAGAU	UUU	GAAA	AAU
Lbrachyurus	CAUUAAU	UUGUUUAU-CA	GUUUUAUACCUCCGUU	GU-AA	GAAAGAU	UUU	UAAA	AAU
Imnadia	CCUUCUU	UUGUC---UA	GUUUUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUA-AU	UCU	AAAA	AGA
Caenella	CCUUUUU	UAA----CA	GUUUUAUACCGCCGUU	GC-CA	GAUA-AU	UUU	UCCA	AAA
Caenestheria	CCUUCCC	CCA----UA	GUUUUAUACCGCCGUU	GC-CA	GAUA-AU	UCC	CCCA	AAA

Leptestheria	CUUUUUC	UAAUG--AAG	GCUUGUAUACCGCCGUU	GC-CA	GAUA-AU	UUU	UAAA	AAA
Lkawachiensis	CUUUCCC	UAAUU---AA	GCCUGUAUACCGCCGUU	GC-CA	GAUA-AU	UUU	CAAA	AAA
Limnadia	CCCUUUU	UUAUU---UA	GUUUGUAUACCGCCGUU	GC-CA	GAUA-AU	UCU	CAAA	AGA
Eulimnadia	CCUUUUU	UUGUUU--AA	GUUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUG-AU	UCU	UAGA	AGA
Limnadopsis	CCCUUUU	UCAUA---AA	GUUUGUAUACCGCCGUU	GC-CA	GAUG-AU	UCU	UAAA	AGA
Eocycticus	CCUUUUU	UUU-----	GUUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUA-AU	UUU	UAGA	AAA
Cyzicus	CCUUUUU	UGCUU---AA	ACUUGUAUACCGCCGUU	GC-CA	GAUA-AU	UCU	CACA	AGA
Cyclestheria	CUUAUUU	UUGUAUAACA	GUUUGUAUACCGCCGUU	GG-CA	GAUG-GU	CUU	AUAA	GAG
Simocephalus	CCUUUUU	UUGUA---GA	GCUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UUC	AUAA	AGA
Eurycercus	CCUUUUU	UUGUA---AA	GCUUGUGUAC-UCCGUU	GU-CA	GGUU-GC	UUC	UUAA	GAG
Pseudochydroru	CUUUUCU	UAUUU---A	GUUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UUU	UGAA	AAU
Moina	CUUCUUU	UUGUC---GA	GUUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UUC	AUUA	GAA
Bosmina	CUUCAGU	UAAU---UA	GUUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	CUU	UAAA	GAG
Ilyocryptus	CUUUAAU	UUAU---GA	-UUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUC-AC	UUU	UAAA	GGA
Daphnia	CCCUUUU	UUGUU---AA	GCUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UUU	AAAA	GAA
Ceriodaphnia	CCU-UUU	UUAUU---CA	GUUUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UCU	AUAA	AGA
Scapholeberis	CUCGCUC	UUGUU---UA	GCUUGUAUACCGCCGUU	GA-CA	GGUU-AC	UUC	AUAA	GAA
Sida	CUUGGUU	UUGUAUAGCA	GUUUGUAUACCGCCGU-	GU-CA	GGUU-AC	UUU	AAAA	GAA
Diaphanosoma	CUUAACU	UAGUAUU-CA	GUUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GGUU-AC	UUU	AAAA	GAA
Leptodora	CUUAACC	UUGUUU-UCA	ACUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GACU-AC	UCU	UAUA	GGA
Polyphemus	CUUAACU	UUGUAA-ACA	GCUUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UCC	UAGA	GGA
Bythotrephes	CUUGGCU	UAGUAAUUC	ACCUAAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UCU	AAAA	GGG
Evadne	CUUAGCU	UGGUUUUCA	GCUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UCC	AAUA	GGA
Podon	CUUAAUU	UGGUAAUCA	GCUUGUAUACCGCCGUU	GU-CA	GAUU-AC	UCC	UAUA	GGA

Artemia	--A	CU-GCUC	UUAA	UUGC	UUAG----	GCUA	AUAAAUCA	GAUCAAGGGUAGC
Bocci	--G	AU-UUUC	UAAA	UUAA	CUAG----	UUAA	UUAAAUCA	GGUCAAGGGUAGU
Linderiella	--C	CU-UUCC	UUAA	AAGG	AGUA----	UCUC	GUAAGUCA	GGUCAAGGGUAGC
Bpinnata	--G	AU-UUCC	AAGA	UUAA	UUAG----	UUAA	UAAAAUCA	GGUCAAGGGUAGC
Parartemia	--G	CC-UCUC	UCAG	AGGC	CUAG----	GCCC	ACAAAUCA	GAUCAAGGGUAGC
Streptocephal	--A	UU-UCUC	UUAA	UUAA	UUAG----	UUGA	AAAAAUUCU	GGUCAAGGGUAGU
Lepidurus	--U	AU-UAUC	UAAU	UAGU	UUUU---	ACUA	UGACAUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Lepibilo	--U	AU-UAUC	UAAU	UAGU	UUUU---	ACUG	GGACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Taustrali	--U	AU-AAUC	UAAU	UAGU	AGUUA---	AUUG	GGACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Tcancri	--U	AU-AAUC	UAGU	UAAU	UUAAAG--	UUUA	UGACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Tlong	--U	AU-AAUC	UAAA	UUAA	UAAUUA--	AUUG	-GACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Ltatei	--U	CUUUUGA	AAGU	AAUU	GAUUU---	AAGU	--ACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Lbiformis	--U	UUUUUAU	UUUU	AAUU	UUUU---	AAAU	--ACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Lbrachyurus	--U	CUUUUAU	UAAU	AAGA	UAUUC---	AAAU	--ACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Imnadia	--U	AU-UAUC	UAAA	UUAA	CUAUUUU-	UACU	-AACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Caenella	--C	AU-UAUC	AAAC	UCAA	UAAUUU--	UAAA	-GACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Caenestheria	--U	AU-UAUC	AAAC	UCAA	CAUUUU--	CAAA	-GACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Leptestheria	--U	AU-UAUC	UAAA	AUAA	AAUUUU--	UAAG	-GACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Lkawachiensis	--C	AU-UAUC	UAAA	UUAA	GAUUUU--	UAUG	-GACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Limnadia	--A	AU-UAUC	UAAA	UUAA	CUAUUU--	UACU	-AACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Eulimnadia	--U	AU-CAUC	UUAA	UUAA	CUAUUU--	UACU	-GACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Limnadopsis	--U	AU-CAUC	UAAA	UCAA	UUUUUU--	UAAC	-AACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Eocycticus	--C	AU-UAUC	UAAU	AUAA	AAGAAA--	CAAU	-AACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Cyzicus	--G	AU-UAUC	UUUA	UCAA	GAUCCU--	UACU	-AACUUCA	GGUCAAGGGUCAGU
Cyclestheria	--U	UC-UUUC	CACA	AAAA	GUGUUU--	CU-U	--ACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Simocephalus	AAC	GU-UUUC	AAAU	AAAA	AUAUU--	UUUU	UUACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Eurycercus	--U	GC-GACC	UAAA	AAAA	CAUU----	UUUU	GCACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Pseudochydroru	--A	GA-AAUC	GGAA	UAAA	GAGU----	UUUA	UAACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Moina	--U	GUUUUCC	UAAA	AAUA	AUUU----	UU-G	UGACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Bosmina	--U	GU-UUUC	UAAA	AAAA	UAAU----	UUUU	AAACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Ilyocryptus	--U	GU-CUUC	AAUA	AAGA	UAUU----	GCUU	UGACUUCA	GGUCAAGGGUCAGU
Daphnia	--C	GU-UUUC	AG-G	AAAA	AUAUU--	UUUC	UUACUUCA	GGUCAAGGGUCAGU
Ceriodaphnia	--C	GU-UUUC	AA-U	AAAU	AUAAU--	UUUU	CUACUUCA	GGUCAAGGGUAGC
Scapholeberis	--A	GU-UUCC	AA-U	AAAG	ACAAC--	UCUA	AUACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Sida	--U	GU-UUCC	UUCA	UUGA	UAAU----	UUAA	AGACUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Diaphanosoma	--U	GU-UCCC	ACUA	AAUA	ACCCCAAC	UUCA	AAAAUUCA	GGUCAAGGGUCAGC
Leptodora	--U	GU-CUUC	UAGA	AAAA	UAAU----	UUUU	UCACUUCA	GGUCAAGGGUCAGU
Polyphemus	--A	GU-UUUC	GAGU	UAGA	UAAU----	UCUA	UUACUUCA	GGUCAAGGGUAGC
Bythotrephes	--U	GU-UUUC	UCUA	AAGA	UAGU----	UCUU	UUACUUCA	GGUCAAGGGUAGU
Evadne	--C	GU-UUUC	AAUA	AAUA	UAAU----	UUUU	UUACUUCA	GGUCAAGGGUCAGU
Podon	--U	GU-UUUC	AAUA	AAGA	AAGG----	UCUU	UUACUUCA	GGUCAAGGGUCAGU

Artemia	UUAU	GUCCGGG	A--	GAGGGUGGGUU	ACAA	UAA	----GACC	UUA
Bocci	UUAU	GAAUAGG	A--	AGAGAUGGAUU	ACAA	UAA	---AAUUU	UUA
Linderiella	UUAU	GAGAGAG	C--	AGUGAUGGAUU	ACAA	UAA	----UAAA	UUA
Bpinnata	UUAU	GGAUAGG	A--	AGAGAUGGAUU	ACAA	UAA	----AAUU	UUA
Parartemia	UUAC	GGGCAGG	U--	GGAGGUGGAUU	ACAC	UGA	----G-CU	UUA
Streptocephal	UAAU	AAAUAGG	A--	AGAGGUGGGUU	ACAA	UGA	----UAUU	UUA
Lepidurus	CAAU	AAAGUGG	GG-	AGUAGUGGGUU	ACAA	UAA	-UAUUAAA	UUA
Lepibilo	CAAU	AAUAUG	G--	AGUAGUGGGUU	ACAA	UAA	-AAUUAAA	UUA
Taustrali	UUAU	AAGCAUG	GG-	AGUAGUGGGUU	ACAA	UAG	-AUUAAA	UUA

Tcancricri	UUAU	AAUAUG	GG-	AGAAGUGGGUU	ACAA	UAA	-AUUAUAA	UUA
Tlong	UUAU	AAACAUG	G--	AGUAGUGGGUU	ACAA	UAA	-UAUAGAA	UUA
Ltatei	UUAU	AUUAUG	A--	UGAAAUGGGUU	ACAA	UUA	-AGUCAAU	UUA
Lbiformis	UUAU	AUUAUG	A--	UGAAAUGGGUU	ACAA	UUA	-UUUUAU	AAU
Lbrachyurus	UUAU	GUUAUG	U--	UGUAGUGGGUU	ACAA	UAU	-AAUUAU-	AUA
Imnadia	UUAU	AAGAAGG	U--	GGUGAUGGGUU	ACAA	UAA	-UUUAUAA	UUA
Caenella	CUAU	GAAAAGG	U--	GGAGGUGGGUU	ACAA	UAA	UAUAUAAA	UUA
Caenestheria	UGAU	GAAAAGG	U--	GGAGGUGGGUU	ACAG	UAA	UUCUAUAA	UUA
Leptestheria	UUAU	GAAAAGG	A--	GGAGGUGGGUU	ACAA	UAA	-CUUUUAA	UUA
Lkawachiensis	UUAU	GAGAAAG	A--	GGAGGUGGGUU	ACAA	UAA	-UUUUUAU	UUA
Limnadia	CUAU	AGAGGGG	U--	GGUGAUGGGUU	ACAU	UAA	-UAAUAAA	UUA
Eulimnadia	UUGG	AAAAAGG	U--	GGUGAUGGGUU	ACAU	AAU	-UAAAAGA	GUU
Limnadopsis	UUAU	AAAAAGG	A--	GGAGAUGGGUU	ACAU	UAA	-CCAUAAG	UUA
Eocycticus	UUAU	AAAAAGG	U--	GGUGGUGAGUU	ACAA	UAA	-CUAUAAG	UUA
Cyzicus	CAAU	GAAAAGG	U--	GGUGGUGGGUU	ACAA	UAG	-UUUAUAA	CUA
Cyclestheria	UUAU	AAUAAG	U--	GAGGAUGAGUU	ACAA	UAA	-UGAAAAA	UUA
Simocephalus	UAAU	AAAAAGG	U--	AGUGGUGAGCU	ACAA	UUU	-AAUUUAA	AAA
Eurycercus	UUAU	GAAAAGG	A--	GAGGAUGAGCU	ACAA	UAA	-AUUUUAU	UUA
Pseudochydoru	UUAU	GGAAAAG	UUU	UUUGGUGAGUU	ACAA	UAA	-UUUUUAA	UUA
Moina	GGAU	AGAGAAC	G--	GGAGAUGAGCU	ACAA	UAA	-AUUUUAU	UUA
Bosmina	UUAU	ACUAAAG	U--	UUGAAUGAGCU	ACAA	UUA	-ACCAUAU	UAA
Ilyocryptus	UUAU	AGUAAAG	A--	AUUGAUGAGCU	ACAA	UUA	-GAUUUAU	UAA
Daphnia	UUAU	AGAAGGG	C--	AGUGAUGAGCU	ACAA	UUU	-UUAAUAG	AAA
Ceriodaphnia	UUAU	AAAAAGG	A--	GAAAAUUAGCU	ACAA	UUU	---AAAAU	AAA
Scapholeberis	CCAU	GAGCGAG	A--	GGAGAUGAACU	ACAA	UUC	-UCUAGAA	GAA
Sida	UUAU	AACUAAG	A--	GAAGAUGAGCU	ACAU	UUA	-AUUUUAU	UAA
Diaphanosoma	UUAU	GAUUAAG	A--	GGUGAUGAGCU	ACAA	UUA	-AAUAUAA	UAA
Leptodora	UUAU	GGUUAAG	U--	GGUGGUGAGCU	ACAA	UUA	-AAUUUAU	UAA
Polyphemus	CUAU	GGUUAAG	G--	AUUGAUGAGCU	ACAA	UUU	-AUGU-AU	AAA
Bythotrephes	CUAU	GAUUAAG	A--	GUAGAUGAGCU	ACAA	UAA	-AUGUUUA	UUA
Evadne	CUAU	AGUUAAG	UU-	UCAGAUGAGCU	ACAA	UUA	-GAGUUAC	UAA
Podon	UUAU	AGUUAAG	UC-	GCAGAUGAGCU	ACAA	UUA	-AAGUUUA	UAA

Artemia	AACGGAA--	UUUU	CAUUUUUAUC	AUGG	-AGAAGAAGGUGGA	UUUAG	AAGUA
Bocci	AACGGAUUG	UUAA	AAUUUAGAU	UUUA	--UUUGAAGGUGGA	UUUAG	AAGUA
Linderiella	AGACGAU-	AUGU	AGAAUUAU	UCUU	-AUUUGAAGGUGGA	CUUAG	AAGUA
Bpinnata	-AACGAAC-	UUGA	AACUUACGU	UUGC	--CCAGAAGGUGGA	UUUAG	AAGUA
Parartemia	CUGCGGAC-	UCAG	UUUUGUAUU	AGAC	-UGAUAUAAAGUGGA	UUUGA	AAGUA
Streptocephal	UAACGGAU-	UAUG	AUCUUUAGG	GAUU	-GUAUAAAGGUGGA	UUUAG	AAGUA
Lepidurus	UUACGGAU-	UAAU	AAUUGUA-U	AAUU	AUUUAUAAAGGUGGA	UUUAG	UAGUA
Lepibilo	UUACGGCC-	UGAC	AAUUGUAUU	AGUU	GUUAUUAAAGGUGGA	UUUAG	UAGUA
Taustali	U-ACGGAU-	UAAU	UAAUGUAUU	GUUG	AUUUAUGAAGGUGGA	UUUAG	UAGUA
Tcancricri	U-ACGGAU-	UAGU	AUGUGUA-	ACAU	AUUUAUAAAGGUGGA	UUUAG	UAGUA
Tlong	U-ACGGAU-	UAAU	UAGUGUAUU	ACAA	AUUUAUGAAGGUGGA	UUUAG	UAGUA
Ltatei	GGUGUGGU-	AUUU	GAAAAGUG-	CCGU	-----GAAAUUGGA	UUUUA	GAGUA
Lbiformis	GGUUUAGU-	GUUU	GAAACAGUA	CUAU	-----GAAAUUGGA	UUUUA	AAGUA
Lbrachyurus	UGGGUUUGU-	UGAU	UGAAACAUU	AAUU	---UUUUUAAUUGGA	UUUUA	UAGUA
Imnadia	CAC-GGA--	AAUU	UUAU-GAAA	AAAC	AAU-UUAAGGUGGA	UUUGG	AAGUA
Caenella	AACGGAU--	AAUU	CUAU-GAAA	AAGA	AUU-UGAAGGUGGA	UUUGG	UAGUA
Caenestheria	UACGGAU--	AAUU	CUAU-GCAA	AAGA	AUU-UGAAGGUGGA	UUUGA	UAGUA
Leptestheria	UACGGG---	AAGU	AAAU-GUAA	AAAA	ACU-AGAAGGUGGA	UUUGG	CAGUA
Lkawachiensis	CACGAA---	AAGU	AUAU-GAAA	ACAA	ACU-GGAAGGUGGA	UUUGG	UAGUA
Limnadia	AACGGG---	AAUU	UAAU-GAAA	AAAU	GAU-UUAAGGUGGA	UUUGG	AAGUA
Eulimnadia	AACGGGA--	AAGG	AAAUGAAA	AAUU	AACUAUAAAGGUGGA	UUUGA	AAGUA
Limnadopsis	UACGG---	AAGA	AAAUGAAA	AAUU	AACUAU-AAAGGUGGA	UUUGA	AAGUA
Eocycticus	AACGGG---	CAGU	CUAU-GAAA	UAAU	GGCUAGAAGGUGGA	UUUGA	AAGUA
Cyzicus	CACGAAA--	GAAU	UCCAUGAAA	AAGA	AUUUAUGAAGGUGGA	UUUGA	CAGUA
Cyclestheria	UUUUGGAU-	UAGA	GCUU-GAAA	GAGU	UUUAUGAAGGUGGA	UUUGG	UAGUA
Simocephalus	-AACCGAU-	AUUA	GUUUUAUAU	CUUU	UG---GAAGGUGGA	UUUGC	UAGUA
Eurycercus	AAACGGAA-	AAGA	AUUGAAAAA	UUUU	UCA--AAGGUGGAA	UUUGC	CAGUA
Pseudochydoru	GA-CGAAU-	UAAA	AUUGAAACU	AUUU	UAG--GAAGGUGGA	UUUGU	UAGUA
Moina	U-ACGAAG-	GAUC	--UUUGAAA	AAAA	GAUAGGAAGGUGGA	UUUAC	UAGUA
Bosmina	UUACGGAC-	UAUU	UUUGUAAAA	GAAA	UAC--GAAGGAGGA	UUUGU	AAGUA
Ilyocryptus	U-AUGGAU-	UUUA	GUUGAAUA	CUGA	GUU--GAAGGUGGA	CUUGC	AAGUA
Daphnia	-UACGGAU-	UUUA	GGUUUAAAA	CUCA	GG--UGAAGGUGGA	UUUUA	UAGUA
Ceriodaphnia	ACUCGGAU-	UGUU	UGUUAAACC	AAUA	AU---GAAGAUGGA	UUUNN	NNNNN
Scapholeberis	AUACGGAU-	GGGG	AGCUAUAUU	AACC	CU---GAAGGUGGA	UUUGU	CAGUA
Sida	UAACGGAU-	UAUG	UAUGAAAAA	UCAU	---AUGAAGGCGGA	UUUGU	GAGUA
Diaphanosoma	AAACGAAU-	CAAU	--GGUGAAA	CCCA	-UUAAGAAGGUGGA	UUUGU	AAGUA
Leptodora	UUUUGGAU-	UAGU	-UUUUAAAC	AUGG	CUA-UGAAAGGUGGA	UUUGU	CAGUA
Polyphemus	-UACGGAA-	AUAA	--AGUGUAA	UCUU	UAU-UGAAGGUGGA	UUUAC	UAGUA
Bythotrephes	-UACGGAU-	AAAA	--AGUGUAA	-UCU	UUUAGGAAGGUGGA	UUUGU	UAGUA
Evadne	-UACGGAU-	UUAA	--GGUGUAA	UCCU	UCU-UGAAGGUGGA	UUUGU	CAGUA
Podon	-UACGGAU-	UUUA	-AGGUGUAA	UCCU	UUUAUGAAGGUGGA	UUUGU	UAGUA

48/48'

32'

Artemia      AGGCC-----UAUCAACC-U      GAAGGA-GG CUC      **UGAGAAAUGUACA**      CAUCGCCCG

Bocci	AAAUU-----UGAGUUUU-U	GAAAUG-AG	CUC	UGAAAAUGUACA	CAUCGCCCG
Linderiella	ANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Bpinnata	AAAAU-----AAAAGUUUG-G	GAAAUG-AG	CUC	UGAAAAUGUACA	CAUCGCCCN
Parartemia	AACUA----UAGAAAAAGUUGA-A	GAAAGA-GG	C-C	CUGAAAAUGUACA	CAUCGCCCN
Streptocephal	AAUUUNNNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Lepidurus	AAAUAGAAAUAAGGUUUUAU-U	GAAUUG-AG	CUC	UGAAGUGUGUACA	CAUCGCCCG
Lepibilo	AAUUAAAAUAANNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Taustrali	AAUUAAGAAUAAAAUUCUUUU-U	GAAAUG-AG	CUC	UGAAGUGUGUACA	CAUCGCCCG
Tcancri	AAUUUAGAAUAAAAUUCUUUAU-U	GAAGUU-GG	CUC	UGAGGUGUGUACA	CAUCGCCCG
Tlong	AAUUUAGAAUAAANNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Ltatei	AUUCUGUUUAAGGAAAACAAG-U	GAAUUU-UG	CUC	UGGGAUGUGCACA	CAUCGCCCG
Lbiformis	AUAAUUUUUAAGGAAAAUUUU-U	GAAUUUAGC	UCC	UAAAAUGUGCCCA	CGCCGCGCC
Lbrachyurus	AUUUUUUUAAGUAAAAUAAU-U	GAAUUU-UG	CCC	UAAGAUGUGCACA	CAUCGCCCG
Imnadia	AAAUUUUUUAGAAAGAUAAU-U	GAAAAA-AG	CUC	UGAGAUGUGUACA	CAUCGCCCG
Caenella	AAUCCUCUUAGCAAAGGGGU-U	GAAAUG-AG	CUC	UGAAAUGUGCACA	CAUCGCCCG
Caenestheria	AACCCUCUUAGCAAAGGGGU-U	GAAAUG-AG	CUC	UGAAAUGUGCACA	CAUCGCCCG
Leptestheria	AGUGUCGUUAGCAAAGAACAC-U	GAAAAA-AG	CUC	UGGGGUGUGUACA	CAUCGCCCG
Lkawachiensis	AAUAUAGUUUAGCAAACCAU-U	GAAAAG-AG	CCC	UGAGAUGUGUNNN	NNNNNNNNN
Limnadia	AACUUUCUUUAGUAAAGUAAG-U	GAAAAA-AG	CUC	UGAGAUGUGUACA	CAUCGCCCG
Eulimnadia	AACUUUCUCUUNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Limnadopsis	AAUUUUAUUUCAUCAAUAAU-U	GAAAAA-AG	CUC	UGAGAUGUGUACA	CAUCGCCCG
Eocyzius	AAAUCAAUUUAGUAAUUGAU-U	GAAAAA-AG	CUC	UGAGAUGUGUACA	CAUCGCCCG
Cyzicus	AAUUUUUUUAGUANNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Cyclestheria	AGGUUUAUUUAGAAAAUUUCC-U	GAAACU-GU	UUC	UAAAGUGUGCACA	UAUCGCCCG
Simocephalus	AAAUUG-UUUUAGUAUAACUUUU	GAAGAA-GG	UAA	AAGAAUGUGUACA	UAUCGCCCN
Eurycerus	ANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Pseudochydoru	AGUUUACUUAAUGAAGUGAAU-U	GAAGCA-UC	CUC	UAAAAUUGCACA	CAUCGCCCG
Moina	ACUUUUUUCAGUAANNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Bosmina	AAUUAAUUUAUGAUAAUUACU-U	GAAGCAAGG	CAA	UAGAAUUGUACA	UAUCGCCCG
Ilyocryptus	A-UAGUUAAUAGAGUGUAAUUA-U	GAAUUU-GG	CUA	UAGAAUGUGUACA	CAUCGCCCG
Daphnia	AAUUUA-CUUUAGUACAGUAAGUU	GAAUAA-GG	CAA	UAGGAUGUGCACA	UAUCGCCCN
Ceriodaphnia	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN	NNN	NNNNNNNNNNNN	NNNNNNNNN
Scapholeberis	AUAGUCUUUAAGAAUAAACUAU	GAACUA-GG	CA-	UAAAACGUGUACA	UAUCGCCCG
Sida	AAUUUUUUUAAUUUAUAAAGAAU-U	GAAUUUAG	CAA	UAGAAUUGUACA	UAUCGCCCG
Diaphanosoma	AGUGUAUUUAAGAAAGAUUCAC-U	GAAGGU-UG	CAA	UGAAAUUGCACA	UAUCGCCCG
Leptodora	AAUAAAAUUAGAAUAAUUUU-U	GAAUAA-GG	CUA	UGGGAUGUGCACA	UAUCGCCCG
Polyphemus	AAAUACUUUAAGAAUAAUUUU-U	UAAGUU-GG	CUC	UGAGGUUUGUACA	UAUCGCCCG
Bythotrephes	AAAUACUUUAAGAAUAAUUUU-U	UAAGUU-GG	CUC	UGAGGUGUGUACA	UAUCGCCCG
Evadne	AAUUUUUUUAAGAAAGAAUAAU-U	GAAGUU-GG	CUC	UGAGAUGUGUACA	UAUCGCCCG
Podon	AGUUAAUUUAAGAAAGGUUAGC-U	GAAUUU-GG	CUC	UGAGAUGUGUACA	UAUCGCCCG

12S rRNA Alignment der Branchiopoda der 3. Domäne und partiell der 2. Domäne, erstellt auf der Basis einer Sekundärstrukturanalyse. Blau markierte Nukleotide bezeichnen die ``stem''-Regionen.





Eulimnadia ----A-----G-U-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUG-AUUCUU-AGAAGA-U  
 Lbirchii ----A-----G-U-UU-GUAUACCGCCGUUGC--CAGAUG-AUUCUU-AAAAGA-U  
 Eocycticus ----G-U-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-AUUCUU-AGAAGA-C  
 Cyzicus -----A-ACUU-GUAUACCGCCGUUGC--CAGAUU-AUUCUU-ACAAGA-G  
 Cyclesther ----A-CA---G-U-UU-GUAUACCGCCGUUGG--CAGAUG-GUCUUA-UUAGAG-U  
 Simocephal ----A-----G-C-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCUAAAAGAAC  
 Eurycercus ----A-----G-C-UU-GUGUACU-CGCUUGU--CAGGUU-GCUUCU-UUAGAG-U  
 Pseudochyd ----A-----G-U-UU-GUGUACUGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-GAAAAU-A  
 Moina ----A-----G-U-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-UUAGAA-U  
 Bosmina ----A-----G-U-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AAAGAG-U  
 Ilyocryptu ----A-----G-U-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AAAGAA-U  
 Dpulex ----A-----G-C-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AAAGAA-C  
 Ceriodaphn ----A-----G-U-UU-AUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCUAAAAGAC--  
 Scapholebe ----A-----G-C-UU-GUAUACCGCCGUUGA--CAGGUU-ACUUCUAAAAGAA--  
 Sida ----AG---CAG-U-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGGUU-ACUUCU-AAAGAA-U  
 Diaphanoso ----U---CAG-C-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGGUU-ACUUCU-AAAGAA-U  
 Leptodora ----U---CAA-C-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AUAGGA-U  
 Polyphemus ----A---CAG-C-UU-AUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AGAGGA-A  
 Bythotreph ----A---UUC-A-C-UU-AUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AAAGGG-U  
 Evadne ----U---UCAG-C-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AUAGGA-C  
 Pleuckarti ----A---UCAG-C-UU-GUAUACCGCCGUUGU--CAGAUU-ACUUCU-AUAGGA-U

39' 42' 42' 38'  
 Artemia CUGCUCU-U-A-AUUGCU---UAGGCU-A-AU--AAAUCAGAUCAAGGUGUAGCUUAAU  
 Boccident AUUUUCU-A-A-AUUAAC---UAGUUA-A-UU--AAAUCAGGUCAAGGUGUAGUUAU  
 Linderiell CUUUCCU-U-A-AAAGGA---GUAUCU-C-GU--AAGUCAGGUCAAGGUGUAGCUUAAU  
 Bpinnata AUUUCCA-A-G-AUUAU---UAGUUA-A-UA--AAAUCAGGUCAAGGUGUAGCUUAAU  
 Parartemia CCUCUCU-C-A-GAGGCC---UAGGCC-C-AC--AAAUCAGAUCAAGGUGUAGCUUAC  
 Streptocep UUUUCUCU-U-A-AUUAU---UAGUUG-A-AA--AAAUCUGGUCAAGGUGUAGUUAU  
 Lapus AUUAUCU-A-A-UUAGUU---UAUUAU-C-U-AU-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCCAAU  
 Lbilobatus AUUAUCU-A-A-UUAGUU---UAUUAU-C-U-GG-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCCAAU  
 Taustral AUAAUCU-A-A-UUAGUA---GUUAU-U-GG-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Tcancrif AUAAUCU-A-G-UUAAU---UAAAGU-U-UAGACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Tlongicau AUAAUCU-A-AAUUAUA---AUUAU-U-GG--ACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Ltatei CUUUUGA-A-A-GUAAU---GAUUAU-A-GU--ACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Lbiformis CUUUUAU-U-U-UUAAU---UUAUAU-A-AU--ACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Lbrachyuru CUUUUAU-U-A-UUAGA---UAUUAU-A-AU--ACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Imnadia AUUAUCU-A-A-AUUAAC---UAUUUUUA-CU-AACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Cestheriel AUUAUCA-A-A-CUCAU---AAUUUU-A-AA-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Cherneyi AUUAUCA-A-A-CCUAC---AAUUUC-A-AA-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Leptesther AUUAUCU-A-A-AAUAA---AUUUUU-A-AG-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Lkawachien AUUAUCU-A-A-AUUAAG---AUUUUU-A-UG-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Limnadia AUUAUCU-A-A-AUUAAC---UAUUUU-A-CU-AACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Eulimnadia AUCAUCU-U-A-AUUAAC---UAUUUU-A-CU-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Lbirchii AUCAUCU-A-A-ACUAA---UAUUUU-A-AC-AACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Eocycticus AUUAUCU-U-A-UUUA---AGAAAC-A-AU-AACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Cyzicus AUUAUCU-U-U-AUCAAG---AUCCUU-A-CU-AACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Cyclesther UCUUUCU-A-C-AAAAAG---UGUUUC-U--U--ACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Simocephal GUUUUCA-AAU-AAAAU---AAUUUU-U--U-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Eurycercus GCGACCU-U-A-AAAAAC---AAUUUU-U--G-CACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Pseudochyd GAAUUCG-G-A-AUAAAG---AGUUUU-A--U-AACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Bosmina GUUUUCU-A-A-AAAAU---AAUUUU-U--A-AACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Ilyocryptu GUUUUCA-A-U-AAAGAU---AUUGCU-U--U-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Dpulex GUUUUCA-G-G-AAAAU---AUUUUU-C--U-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Ceriodaphn GUUUUCA-A-U-AAAAU---AAUUUU-U--C-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Scapholebe GUUUUCA-A-U-AAAGAC---AACUCU-A--A-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Sida GUUUUCU-U-C-AUUGAU---AAUUUA-A--A-GACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Diaphanoso GUUCCACU-A-AAUAACCCCAACUUC-A--A-AAUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Leptodora GUUUUCU-A-G-AAAAU---AAUUUU-U--U-CACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Polyphemus GUUUUCG-A-G-UUAGAU---AAUUCU-A--U-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Bythotreph GUUUUCU-C-U-AAAGAU---AGUUUCU-U--U-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Evadne GUUUUCA-A-U-AAAU---AAUUUU-U--U-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU  
 Pleuckarti GUUUUCA-A-U-AAAGAA---AGGUCU-U--U-UACUUCAGGUCAAGGUGCAGCUUAAU

36' 34' 45 45' 47  
 Artemia GUCCGGAG-A-G--GGUGGUUACAAUAGA-C-CU-U-A-A-A-C--G--GAAU--U-U--U-C  
 Boccident GAAUAGGA-G-A--GAUGGAUACAAUAAA-U-UU-UUA-A-A-C--G--GAUG--U-U--A-A  
 Linderiell GAGAGAGCA-G-U--GAUGGAUACAAUAAU-AAUU-A-A-G-A-C--G--AUUA--U-G--U-A  
 Bpinnata GGAUAGGA-G-A--GAUGGAUACAAUAAA-U-UU-U-A-A-A-C--G--AACG--U-U--G-A  
 Parartemia GGGCAGGUG-G-A--GGUGGAUACACUGAGC-U-UU-A-C-U-G-C--G--GACU--C-A--G-U  
 Streptocep AAAUAGGA-G-A--GGUGGAUACAAUAGA-U-UU-U-A-U-AAC--G--GAUU--A-U--G-A  
 Lapus AAAUGUGGGAG-U--AGUGGUUACAAUAAU-U-UA-A-A-UUA-UU-A-CGGAU--U-A-AU-A  
 Lbilobatus AAAUAGGAG-G-U--AGUGGUUACAAUAAA-U-UA-A-A-UUA-UU-A-CGGCC--U-G-AC-A  
 Taustral AAGCAUGGGAG-U--AGUGGUUACAAUAGAU-U-AA-A-A-UUA-U--A-CGGAU--U-A-AU-U  
 Tcancrif AAAUAGGGAG-A--AGUGGUUACAAUAAU-U-AU-A-A-UUA-U--A-CGGAU--U-A-GU-A  
 Tlongicau AAAAUGGAG-G-U--AGUGGUUACAAUAAU-U-AG-A-A-UUA-U--A-CGGAU--U-A-AU-U  
 Ltatei AUUAAGAU-G-A--AAUGGUUACAAUAAUAG-U-CA-A-U-A-A-U--G--GUGU--G-G--U-A

Lbiformis AUUUAUGAU-G-A--AAUGGGUUACAAUUAUU-U-UA-A-U-A-A-U--G--GAUU--A-G--U-G  
Lbrachyuru GUUUAUGUU-G-U--AGUGGGUUACAAUUAUU-U-UA-A-A-U-A-U--G--GGUU--G-U--U-G  
Imnadia AAGAAGGUG-G-U--GAUGGGUUACAAUUAUU-U-UA-A-A-UUA-C--A-CGGAA--A-U--U-U  
Cestheriel GAAAAGGUG-G-A--GGUGGGUUACAAUUAUA-U-A-A-UUA-A--A-CGGAU--A-A--UUC  
Cherneyi GAAAAGGUG-G-A--GGUGGGUUACAGUUAUUUA-U-A-A-UUA-U--A-CGGAU--A-A--UUC  
Leptesther GAAAAAGAG-G-A--GGUGGGUUACAAUUAUU-U-UU-A-A-UUA-U--A-CGGAA--A-G--U-A  
Lkawachien GAGAAAGAG-G-A--GGUGGGUUACAAUUAUU-U-UU-A-UUA-C--A-CGGAA--A-G--U-A  
Limnadia AAGAGGGUG-G-U--GAUGGGUUACAUUUAUA-U-UA-A-A-UUA-A--A-CGGAA--A-U--U-U  
Eulimnadia AAAAAAGGUG-G-U--GAUGGGUUACAUUUAUA-U-AA-A-G-UUA-A--C-CGGAA--A-G--A-A  
Lbirchii AAAAGGGAG-G-A--GAUGGGUUACAUUUAUU-U-UA-A-A-UUA-U--A-CGGAA--G-A--A-A  
Eocycticus AAAAAAGGUG-G-U--GGUGAGUUACAAUUAUU-U-UA-A-UUA-A--A-CGGAA--A-G--U-C  
Cyzicus GAAAAGGUG-G-U--GGUGGGUUACAAUUAUU-U-UU-A-A-CUA-C--A-CGAAA-GA-A--UUC  
Cyclesther AAAUAGGUG-G-A-G--GAUGAGUUACAAUUAUU-U-AA-A-A-UUA-U--UAUGGAU--U-A--G-A  
Simocephal AAAAGGGUA-G-U--GGUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-A-AAA-A--A-CAGAU--A-U--U-A  
Eurycercus GAAAAGGAG-G-U--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-U-UUA-A--AACGGAA--A-A--G-A  
Pseudochyd GGAAAAGUU-U-UUUGGUGAGUUACAAUUAUU-U-UU-A-A-UUA-G--A-CGAAU--U-A--A-A  
Moina AGAGAAGCG-G-A--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UA-A-U-UUA-U--A-CGAAU--G-A--U-C  
Bosmina ACUAAAGUU-U-G--AAUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-U-UUA-U--UAUGGAU--U-A--U-U  
Ilyocryptu AGUAAAGAG-U-U--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-U-UUA-U--A-UGGAU--U-U--A-A  
Dpulex AGAAGGGCA-G-U--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-AU-A-G-AAA-U--A-CGGAU--U-U--U-A  
Ceriodaphn AAAAAAGGAG-A-A--AAUAGCUACAAUUAUU-U-AU-A-A-AAC-U--C-CGGAU--UGU--U-U  
Scapholebe GAGCGAGAG-G-A--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-AG-A-AGAA-U--A-CGGAU--GGG--G-A  
Sida AACUAAAGAG-A-A--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UA-A-U-UUA-U--A-ACGGA--U-U--A-A  
Diaphanoso GAUUAAGAG-G-U--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UA-A-U-UUA-A--A-ACGAA--U-C--A-A  
Leptodora GGUUAAGUG-G-U--GGUGAGCUACAAUUAUU-U-UA-A-U-UUA-U--U-AUGGA--U-U--A-G  
Polyphemus GGUUAAGGA-U-U--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-U-AAA-U--A-CGGAA--A-U--A-A  
Bythotreph GAUUAAGAG-U-A--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-U-UUA-U--A-CGGAA--A-A--A-A  
Evadne AGUUAAGUU-UCA--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-U-UUA-U--A-CGGAU--U-U--A-A  
Pleuckarti AGUUAAGUC-GCA--GAUGAGCUACAAUUAUU-U-UU-A-U-UUA-U--A-CGGAU--U-U--A-A

33'

Artemia A-UUUUAUC-AUGGA-GA-A-G-A-AGGUGGA-UUUAGAAGUAAAGGC-C-UAUCAACC--  
Boccident A-AUUUAGA-UUUUA-UU-U-G-A-AGGUGGA-UUUAGAAGUAAA--A-UUUGA-G--  
Linderiell G-AAAUAUU-UUUUA-UU-U-G-A-AGGUGGA-CUUAGAAGUAAANNNNNNNNNNNNNNN  
Bpinata A-ACUUACG-UUUGC-CC-A-G-A-AGGUGGA-UUUAGAAGUAAA--A-AUAAAAG--  
Parartemia U-UUGUAUU-AGACU-GA-U-A-A-AGAUGGA-UUUGAAGUAAAACU-A-UAGAAAAG  
Streptocep U-CUUUAGG-GAUUG-UA-U-A-A-AGGUGGA-UUUAGAAGUAAANNNNNNNNNNNNNNN  
Lapus A-UUGUA-U-AAUUA-UU-A-UUA-AGGUGGA-UUUAGUAGUAAAUAUAG-AAAUAUAAA-  
Lbilobatus A-UUGUAAU-AGUUG-UU-A-UUA-AGGUGGA-UUUAGUAGUAAANNNNNNNNNNNNN  
Tausalral A-AUGUAAU-GUUGA-UU-A-UGA-AGGUGGA-UUUAGUAGUAAAUAUAG-GAAUAAA-  
Tcancrif U-GUGUAA--ACAUA-UU-A-UUA-AGGUGGA-UUUAGUAGUAAAUAUAG-GAAUAAA-  
Tlongicau A-GUGUAAU-ACAAA-UU-A-UGA-AGGUGGA-UUUAGUAGUAAANNNNNNNNNNNNN  
Ltatei U-UUGAAA--AGUGC-CG-U-G-A-AAUUGGA-UUUAGUAGUAAAUAUAG-UUUUAGGA-  
Lbiformis U-UUGAAAAC-AGUAC-UA-U-G-A-AAUUGGA-UUUUAAGUAAAUAUAG-UUUUAGGA-  
Lbrachyuru A-UUGAAAAC-AUUUA-UU-U-U-UUAUUGGA-UUUUAUAGUAAAUAUAG-UUUUAGUA-  
Imnadia U-AUGAAA-ACAA-UU-U--A-AGGUGGA-UUUGAAGUAAAUAUAG-UUUUAGAA-  
Cestheriel U-AUGAAA--AAGAA-UU-U-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UCUUAGCA-  
Cherneyi U-AUGCAA--AAGAA-UU-U-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UCUUAGCA-  
Leptesther A-AUGUAAA-AA-AA-CU-A-G-A-AGGUGGA-UUUGGCAGUAAAGUGUC-GUUUAGCA-  
Lkawachien U-AUGAAA-CA-AA-CU-G-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-GUUUAGCA-  
Limnadia A-AUGAAA-AAUGA-UU-U--A-AGGUGGA-UUUGAAGUAAAUAUAG-CUUUAGUA-  
Eulimnadia A-AUGAAA-ANUAA-CU-AU--A-AGGUGGA-UUUGAAGUAAANNNNNNNNNNNNN  
Lbirchii A-AUGAAA-AUUUA-CU-A--A-AGGUGGA-UUUGAAGUAAAUAUAG-UUUUAGUA-  
Eocycticus U-AUGAAAU-AAUGG-CU-A-G-A-AGGUGGA-UUUGAAGUAAAUAUAG-AUUUAGUA-  
Cyzicus C-AUGAAA--AAGAA-UUAU-G-A-AGGUGGA-UUUGACAGUAAANNNNNNNNNNNNN  
Cyclesther GCUUAGAAAG-AGUUU-UA-U-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UUUUAGUA-  
Simocephal G-UUUUAAU-ACUUU-UG--G-A-AGGUGGA-UUUGCUAGUAAAUAUAG-UUUUAGUA-  
Eurycercus A-UUGAAA- AUUCU-UC-A--A-AGGUGGA-UUUGCCAGUAAANNNNNNNNNNNNN  
Pseudochyd A-UUGAAA-UAUUU-UA-G-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-CUUUAGUA-  
Bosmina U-UUGUAAA-AGAAA-UA-C-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UUUUAGUA-  
Ilyocryptu G-UUGAAAU-ACUGA-GU-U-G-A-AGGUGGA-CUUGCAAGUAAAUAUAGAGAGUG-  
Dpulex G-GCUUAAA-ACUCA-GG-U-G-A-AGGUGGA-UUUUAUAGUAAAUAUAG-CUUUAGUA-  
Ceriodaphn G-UUAAAAC-AAUAA-UG----A-AGAUGGA-UUUNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
Scapholebe G-CUAAA- AACCC-UG----A-AGGUGGA-UUUGCAGUAAAUAUAGGCUUUAAGAA-  
Sida G-UAGAAA-AAUCA-UA-U-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UUUUAGUA-  
Diaphanoso U-GGUGAAA-CCAU-UA-A-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UUUUAGAA-  
Leptodora U-UUUUAAA-CAUGGCUA-U-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-AAUAGAA-  
Polyphemus A-GUGUAAU-CUUU--AU-U-G-A-AGGUGGA-UUUUACAGUAAAUAUAG-UUUUAGAA-  
Bythotreph A-GUGUAAU-CUUU--UA-U-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UUUUAGAA-  
Evadne G-GUGUAAU-CCUU--CU-U-G-A-AGGUGGA-UUUGCAGUAAAUAUAG-UUUUAGAA-  
Pleuckarti G-GUGUAAUCCUU--UA-U-G-A-AGGUGGA-UUUGUAGUAAAUAUAG-UUUUAGAA-

32'

Artemia ---U--GAAG---GAG-GCUC-UGAGAAAUGUACACAUCGC-C-CG  
Boccident ---UU-UUUGAAA-UGA-GCUC-UUGAAAUGUACACAUCGC-C-CG



## 12S rRNA Alignment (Astacida)

```

Parastacodes AAAUUUAAAGAA-UUUGGCGG-AUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Afranklini AAAUUCAAAGAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUCUGUAAAACGAU
Paranephros AAAUUCAAAGAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAUGAU
partCF AAAUUUAAAGAA-UUUGGCGGUGUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Pfallax AAAUUUAAAGAA-UUUGGCGGUGUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Pclarkii AAAUUUAAAGAA-UUUGGCGGUGUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Olimosus AAAUUUAAAAAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAUCGAU
Aastacus AAAUUUAAAAAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Atorrentium AAAUUUAAAGAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUCUCCUAAAACGAU
Cdauricus AAAUUUAAAAAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Cschrenckii AAAUUUAAAAAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Csimilis AAAUUUAAAAAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAU
Cjaponicus AAAUUUAAAGAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAC
Apallipes AAAUUUAAAGGA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUCUCUAAAACGAU
Aleptodactylus AAAUUUAAAAAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAACGAC
Pleniusculus AAAUUUAAAAAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAUGAU
Engaeus AAAUUCAGGGGA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUCUGUAAAUGAU
Geocharax AAAUUUAAAGAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUCUAAAUGAU
Euastacus AAAUUCAGAGAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUUUUUAAAUGAU
Cherax AAAUUCAGAGAA-UUUGGCGGUUUUUAGUCUAGUUAGAGGAACCGUUCUGUAAAUGGAU
***** * * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *

```

```

Parastacodes GCGACACGAAAUAUCUUGCUUUAUUUUUGUCCGCAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Afranklini ACUACACGAAAGAAUCUUAUCUUAUUUUUGUUU-UCAGUUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Paranephros ACAACACGUA AAAUCUUAUCUAGUUUUUGUAAAACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
partCF ACAACACGCAUUUUUUACUUAUUUUUAGUUAUCCGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Pfallax ACAACACGCAUUUUUUACUUAUUUUUAGUUAUACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Pclarkii ACAACACGCAUUUUUUACUUAUUUUUAGUUAUACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Olimosus AUACCACGCAUUUUUUACUUAUUUUUAGUUAUACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Aastacus AAAACACGCAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUAGUUAUACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Atorrentium AAUACACGCAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUAGUUAUACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Cdauricus ACUACACGCAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUUGUAU-UCAGUUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Cschrenckii ACUACACGCAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUUGUAU-UCAGUUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Csimilis ACUACACGCAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUUGUAU-UCAGUUUGUAUACCGUCAUUUUGCAGUAU
Cjaponicus AUUACACGCAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUUGUAU-UCAGUUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Apallipes AGUACACGCAUUUAUCUUGCUUUAUUUUUAGUUAUACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Aleptodactylus AAUACACGCAUUUAUCUUAUCUUGUUAUUAAGUAU-UCAGUUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Pleniusculus ACUACACGCAUUUAUCUUGCUUGUUAUUAAGUAUUAUACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Engaeus_12s GCUGCACGUAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUGUUAAGUUAUUAUACCUCCAUUUUAAGUAU
Geocharax_12s ACUACACGUAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUGU--AUAGUUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Euastacus_12s ACUACACGUAUUUAUCUUGCUUAUUUUUUGUUAACAGCUUGUAUACCGUCAUUUUAAGUAU
Cherax_12s ACUACACGUAUUUAUCUUAUCUUAUUUUUUGUUAACAGCUUGUAUACCAUCAUUUUAAGUAU
**** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Parastacodes ACUUUUUUAUGAUUGAGUUUUUUAAAUAUCA-AAGGUC-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Afranklini ACCUUUUAUGAGGGAGUUUUUUGUAAUAUGUGGAGU-CAGAUUAUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Paranephros ACUUUUUAUGAAAAGAGUUUUUGAGAGUAUA-AAUU-UAAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
partCF AUUU-AUGAGAAAAUUAUUUGAGAUCAUUAUU--UGAAUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Pfallax AUUU-AUGAGAAAAUUAUUUGAGAUCAUUAUU--UGAAUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Pclarkii AUUU-AGGAGAAAAUUAUUUGAAAUCAUUAUU--UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Olimosus AUUU-AUGAGAAAAUUAUUUGAAAUCAUUAUU--UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Aastacus AUUU-AAGAGAGAAUUAUUUAGAAUCAUGUUAUA-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Atorrentium AUUU-AAGAGAGAAUUAUUUAAAUAUCAUUAUA-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Cdauricus AUUU-GAGAAAUAACAUAUUUAGGAUCA-AUAUUU-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Cschrenckii AUUU-GAGAGUAUUUAUUUAGGAUCA-AAAGGU-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Csimilis AUUU-AAGAGUAACAUAUUUAGGACCA-GUAUUU-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Cjaponicus AUUU-GAGAAAUAACAUAUUUGGAAUCA--UAGUU-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Apallipes AUUU-AAGAGAGAAUUAUUUAGAUUAUUUAUA-UGAAUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Aleptodactylus AUUU-AAGAGAGAAUUAUUUAAAUAUCAUUAUUG-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Pleniusculus AUUU-AAGAAAGAAUUAUUUAAAUAUCAUUUUUU-UGAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Engaeus_12s ACUUUUUAUGAAAAGUUAUUUGAGAAUA-AAUUUUUUAAAUAUUUAGGUAUCAAGGUGCAG
Geocharax_12s AUUUUUUAUGAAUUAUUUGUUGAGAUUAGAAUUUUUUUUAAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Euastacus_12s ACUUUUUAUGAAUUAUUUGUUAUUUUAAGGAUU--UAAGUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Cherax_12s ACCCUUAUUGGUUAGUUAUUGA-ACUUAUUUUUUUUAAAUAUUUUAAGUAUCAAGGUGCAG
Parastacodes CUUAUAAAU-AAGUAAAUAUGGUUAACAUAUUUUUUUUUAUA-ACGGAGUAAGAGAUU
Afranklini CUUAUAGGU-AAGAAGAAUUGGUUAACAUAUUUUUUUUUAUA--AUGUAUUUAGUGGUUG

```

```

Paranephros      CUA AUGAAU-UAGUAAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUAAUUUU--ACGAAUUAGAAUUUG
partCF           CUUAUAAGU-AAGUAAAAUUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU-AUGAAUUAAAGUAAUU
Pfallax          CUUAUAAGU-AAGUAAAAUUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU-AUGAAUUAAAGUAAUU
Pclarkii         CUUAUAAAAU-AAGUAAAAUUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU-AUGAAUUAAAGUAAUU
Olimosus         CUUAUGGGU-AAGUAAACAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU-AUCGAUUAAAGUAAUU
Aastacus         CUUAUGAGU-AAGUAAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--ACGGAUUUUAAUAAUU
Atorrentium      CUA AUGAAU-AAGAAGAGGUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--ACGGAUUUUAAUAAUU
Cdauricus        CUUAUAAAAU-AAGAAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAUUAACGGAGUUAAAAUUU
Cschrenckii      CUUAUAAAAU-AAGGCAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAUUAACGGAGUUAAAGGUUU
Csimilis         CUUAUAAAAU-AAGAAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAUUA-CGGAGUUAAAAUUU
Cjaponicus       CUUAUAAAAU-AAGAAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU-AACGGAGUUAAUAAUU
Apallipes        CUUAUAAAAU-AAGAAAAGAUGGAUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--ACGGAUUUUAAUAAUU
Aleptodactylus  CUA AUGAAU-AAGAAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--AUGGAUUUUAAUAAUU
Pleniusculus     CUUAUGGAC-AAGUAAAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--AUGAAUUAGGGUUUU
Engaeus_12s      CUUAUAAGGAUAGGGGAGAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--AAUGGAUUGAUGAAGG
Geocharax_12s   CUUAUGAAU-UAGCGAGAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--UACGGAUUGAUUUUUAG
Euastacus_12s   CUUAUAAGU-UAGAAGAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--AAUGGAUCAGUGUUAA
Cherax_12s      UUA AUGGGU-AAGAAGAAAUGGGUUACAAUAAAAUUUUUUAAU--GACGAUUAGUAGUUG
                *  **          **          ***  ***** *  **          ***          *

Parastacodes     UAAAU----UGAUNNNNNNNNNNN
Afranklini       AAUGA----UUGUUNNNNNNNNNNN
Paranephros      AAUAA----AUUUUAUGNNNNNNNN
partCF           AAAUA----UAUUUAUGAAGGAGG
Pfallax          AAAUA----UAUUUAUGACGGGGG
Pclarkii         AAAUA----UAUUUAUGAAGGAGG
Olimosus         AAAUA----UAUUUAUGAAGGAGG
Aastacus         AAAUA----UUUUUAUGAAGGAGG
Atorrentium      AAAUA----UAUUAGUGAAGGGGG
Cdauricus        AAAAA----UUUUAAUGAAGGAGG
Cschrenckii      AAAAA----UUU-AAUGAAGGAGG
Csimilis         AAAAA----UUUUUAUGAAGGAGG
Cjaponicus       AAAGA----UUUUAAUGAANNNNN
Apallipes        AAACA----UGUUAAUGAAGGAGG
Aleptodactylus  AAAUA----UAUUNNNNNNNNNNN
Pleniusculus     AAAUA----UAGCUAUGNNNNNNNN
Engaeus_12s      AAGAGGUAGUUUCAUGAAGGAGG
Geocharax_12s   AAAAA----UAAUUUAUGAAGGAGG
Euastacus_12s   AAUUAG----UAUUGUGAAGGUGG
Cherax_12s      AAAGG----UUUCUAUGAAGGGGG
                *

```

12S rRNA Alignment der Astacida generiert mit dem Alignmentprogramm Clustal X unter ``default``- Optionen.

## Abkürzungsverzeichnis

- BA = ``bootstrap``
- CML = Prozentuale Unterstützung der Splits in „n“ Topologien. CML wird für Consensus Stammbäume angewendet, die auf der Basis von Maximum Likelihood berechnet wurden.
- DI = ``decay`` Index
- IUPAC Code für Nukleotide (``ambiguities``):
  - M= A oder C, W= A oder T, D= A,G oder T, V= A,C oder G
  - K= G oder T, S= G oder C, H= A, C oder T, N= A, C, G oder T
  - R= A oder G, Y= T oder C, B= C,G oder T
- ML = Maximum Likelihood
- MP = Maximum Parsimonie
- ``One letter code`` für hier angemerkte Aminosäuren:
  - A = Alanin, D = Asparaginsäure, E = Glutaminsäure, F = Phenylalanin, G = Glycin, I = Isoleucin, K = Lysin, N = Asparagin, P = Prolin, Q = Glutamin, S = Serin, T = Threonin, V = Valin

## Lebenslauf

Name	Anke Maria Braband
Geboren am	15. 01. 1963 in Berlin
1970-1975	Besuch der St. Ursula Grundschule in Berlin
1975-1976	Besuch der 1. Oberschule (Gesamtschule) in Berlin
1976-1984	Besuch des Arndt - Gymnasiums in Berlin
1985	Zwei Semester Studium der Philosophie an der Technischen Universität in Berlin.
1986-1994	Studium der Biologie an der Freien Universität in Berlin.
1991	Eheschließung mit Herrn Rudi Giese.
1994-1995	Diplomarbeit am Institut für Genbiologische Forschung in Berlin bei Prof. Dr. Brennicke. Thema: Vergleichende Analyse der Transkriptionsinitiation des 18S rRNA Gens in den Mitochondrien dikotyledoner Pflanzen.
1996-2000	Mitarbeit in der molekularbiologischen Firma Replicon GmbH. Arbeitsfeld: Sequenzdatenerhebung und Auswertung für phylogenetische Studien und Kundenbetreuung.
seit 1997	Doktorandin am Fachbereich Vergleichende Zoologie bei Prof. Scholtz an der Humboldt-Universität zu Berlin. Thema der teilweise von der DFG getragenen Dissertation: Phylogenetische Beziehungen innerhalb verschiedener Crustacea Taxa anhand unterschiedlicher molekularer Marker.
1998	Ehescheidung und Wiederannahme des gebürtigen Namens Braband.
2001-2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Scholtz im DFG Schwerpunktprogramm "Evolution entwicklungsbiologischer Prozesse". Charakterisierung des <i>wingless</i> Segmentierungsgens von <i>Orchestia cavimana</i> (Amphipoda) und <i>Porcellio scaber</i> (Isopoda).
Ab März 2002	Beginn einer Kooperation mit dem Forschungszentrum Jülich GmbH zur Ermittlung von Sequenzdaten verschiedener Grünalgen Taxa.

## Danksagung

Prof. Dr. Gerhard Scholtz danke ich für die Bereitstellung des Themas der Phylogenie der Flusskrebse und für die Möglichkeit diese Arbeit in den Räumlichkeiten der Humboldt- Universität zu beenden.

Priv. Doz. Dr. Stefan Richter sei für die unermüdliche Jagd und Bestimmung der vielen verschiedenen Branchiopoden gedankt und auch für die Diskussionsbereitschaft über das Thema Phylogenie. Dies war sicherlich trotz einiger Dissonanzen für beide Seiten lehrreich.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Dr. Jørgen Olesen, Prof. Dr. Walter Hödl und vielen mir leider persönlich nicht bekannten Wissenschaftlern für die Bereitstellung einiger systematisch relevanter Spezies bedanken.

Prof. Dr. Arndt von Haeseler möchte ich für die ständige Gesprächsbereitschaft, die vielen Tips und vor allem die geduldigen Erklärungen zum Umgang mit Maximum Likelihood Berechnungen danken, die mir sehr geholfen haben, diese für einen Laien schwierig umsetzbare Herausforderung zu meistern.

Einen Dank allen Mitgliedern der AG für eine angenehme und lustige Zeit.

Meiner Mutter und auch der Familie Hiesel bzw. Stickel sei herzlich gedankt für die großen Hilfen, insbesondere in der Zeit, als schwere Krankheit und Existenznot fast alles zum Erliegen brachte. Ohne diese Hilfen hätte ich die Arbeit nicht fertig stellen können.

Mein größter Dank geht an Dr. Rudolf Hiesel, der mein wichtigster Begleiter in diesen Jahren war. Seine Idee zu dieser Arbeit, sein Engagement bei der Suche eines geeigneten Doktorvaters, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und der entsprechenden Geräte in seiner Firma Replicon GmbH, seine unermüdliche Diskussionsfreude über alle Fragen der Phylogenie und nicht zuletzt sein großes molekularbiologisches und zoologisches Wissen, das er an mich weitergegeben hat, machen ihn nicht nur zum Initiator dieser Arbeit, sondern zu meinem eigentlichen Lehrer.

## Publikationsliste

A. Braband, vormals A. Giese

**Giese, A., Thalheim, C., Brennicke, A., Binder, S.** (1996) Correlation of nonanucleotide motifs with transcription initiation of 18S rRNA genes in mitochondria of pea, potato and Arabidopsis. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 429-436.

**Richter, S; Giese, A.; Hiesel, R.; Scholtz, G.** (1998): Aspects of cladoceran phylogeny inferred by DNA data. *Proceedings and abstracts of the 4th International Crustacean Congress Amsterdam*, 20. – 24.07.1998.

**Grohmann, L., Bokermann, I., Sonntag, R., Unseld, M., Hiesel, R., Malek, O., Giese, A., Brennicke, A.** (1999) Whale meat from protected species is still being sold on Japanese markets. *Naturwissenschaften* **86**: 350-351.

**Giese, A.; Richter, S.; Hiesel, R.; Scholtz, G.** (1999): Die molekular-systematische Verwendbarkeit der mitochondrialen 12S rDNA am Beispiel der Branchiopoda. 9. Crustaceologentagung in Deutschland, Berlin, 25. – 28.02.1999.

**Richter, S.; Giese, A., Aladin, N.V.; Scholtz, G.** (1999): Aspekte der Phylogenie und Evolution der Onychopoda (Cladocera). 9. Crustaceologentagung in Deutschland, Berlin, 25. – 28.02. 1999.

**Braband, A., Richter, S., Hiesel, R., Scholtz, G.** (2000) Phylogeny of the Branchiopoda (Crustacea) inferred by DNA data. *Zoology* **103**, Supplement III (DZG 93.1), 99.

**Richter, S.; Braband, A.; Aladin, N.; Scholtz, G.** (2001): The phylogenetic relationships of ‚predatory water-fleas‘ (Cladocera: Onychopoda, Haplopoda) inferred from 12S rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* **19**: 105-113

**Braband, A.; Richter, S.; Hiesel, R.; Scholtz, G.** (2001): Phylogenetic relationships of the Branchiopoda inferred by DNA data. *Fourth International Large Branchiopod Symposium, La Paz – Mexiko* **23**. – 27.1.2001.

**Braband, A., Richter, S., Hiesel, R., Scholtz, G.** (2002) Phylogenetic relationships within the Phyllozoa (Crustacea, Branchiopoda) based on mitochondrial and nuclear markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* **25**: 229-244.

**Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Vogt, G.** (2003): An enigmatic parthenogenetic crayfish: a promising model organism or a threat to freshwater ecosystems? *Nature* **421**: 806.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 27. 10. 2004

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Anke Braband', written in a cursive style.

Anke Braband