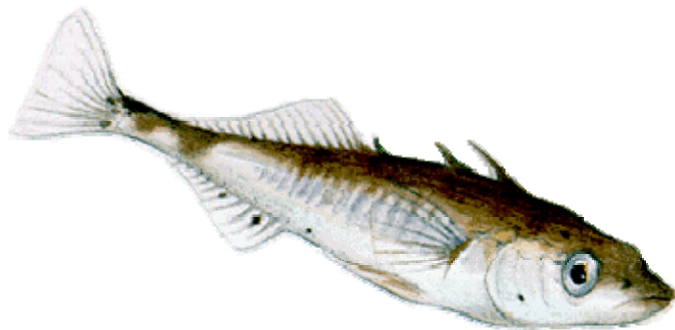


Verhaltensbiologische und genetische Untersuchungen zu  
Paarungsbarrieren zwischen Populationen des  
Dreistachligen Stichlings (*Gasterosteus aculeatus*)  
in Schleswig-Holstein



Diplomarbeit

vorgelegt von Birte Seiffert

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Max-Planck-Institut für Limnologie, Plön

April 2006



Verhaltensbiologische und genetische Untersuchungen zu  
Paarungsbarrieren zwischen Populationen des  
Dreistachligen Stichlings (*Gasterosteus aculeatus*)  
in Schleswig-Holstein

Diplomarbeit

vorgelegt von Birte Seiffert

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Max-Planck-Institut für Limnologie, Plön

April 2006



**Referent: Prof. Dr. Günther B. Hartl**  
Haustierkunde  
Zoologisches Institut  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Am Botanischen Garten 1-9  
24118 Kiel

**Koreferent: Prof. Dr. Thorsten Reusch**  
Plant Evolutionary Ecology  
Institute of Evolution and Biodiversity  
Westfälische Wilhelms-Universität  
Hüfferstr. 1  
48149 Münster

Titelbild aus

([www.vattenkikaren.gu.se/Fakta/arter/chordata/teleoste/gastacul/gastac/gif](http://www.vattenkikaren.gu.se/Fakta/arter/chordata/teleoste/gastacul/gastac/gif))

## Inhalt

1	Einleitung.....	5
1.1	Arten und ihre Entstehung .....	5
1.2	Evolutionenbiologie des Dreistachligen Stichlings .....	8
1.3	Paarungsverhalten des Dreistachligen Stichlings .....	10
1.4	Funktion und Struktur des MHC .....	11
1.5	Diversität des MHC und Partnerwahl .....	13
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Experiment 1: Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl.....	21
2.1.1	Herkunft und Hälterung der Fische .....	21
2.1.2	Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl .....	24
2.1.3	Genotypisierung.....	30
2.1.4	Statistische Analyse.....	32
2.2	Experiment 2: Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl.....	32
2.2.1	Herkunft und Hälterung der Fische .....	32
2.2.2	Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl.....	33
2.2.3	Statistische Analyse.....	34
3	Ergebnisse .....	35
3.1	Experiment 1: Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl.....	35
3.1.1	Genetische Differenzierung und Diversität der MHC Klasse IIB- Gene der Versuchsfische .....	35
3.1.2	Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl .....	37
3.2	Experiment 2: Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl.....	39
4	Diskussion .....	41
4.1	Experiment 1: Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl.....	41
4.2	Experiment 2: Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl.....	45
4.3	Allgemeine Betrachtung.....	46
5	Zusammenfassung .....	51
6	Literatur.....	53
7	Danksagung .....	65
8	Stellungnahme.....	67





## 1 Einleitung

### 1.1 Arten und ihre Entstehung

Was Arten sind und wie sie entstehen, sind zentrale Fragen der Evolutionsbiologie. Eine Art im biologischen Sinn ist eine Gruppe von Individuen, die sich untereinander potentiell erfolgreich fortpflanzen und die von anderen solchen Gruppen reproduktiv isoliert sind (biologisches Artkonzept, MAYR 1942). Artbildung (= Speziation) bedeutet immer die Entstehung reproduktiver Isolation, also die Entstehung von Paarungsbarrieren zwischen Populationen. Daher kommen Untersuchungen, die verschiedene Isolationsprozesse analysieren, eine entscheidende Bedeutung in der Evolutionsbiologie zu. Präzygote Isolationsmechanismen, wie Habitatisolation oder assortative Partnerwahl, verhindern die Entstehung hybrider Zygoten. Postzygote Mechanismen reduzieren die Überlebensfähigkeit oder die Fertilität von Hybriden (DOBZHANSKY 1970). Bei ökologisch verursachter postzygoter Isolation sind die Hybriden dadurch benachteiligt, dass sie an die gegebenen ökologischen Bedingungen beider Elternhabitate nicht gut angepasst sind (RUNDLE und NOSIL 2005).

Traditionell wird zwischen drei verschiedenen Speziationshypothesen unterschieden, die sich von geografischen Gesichtspunkten herleiten (u.a. MAYR 1963; MAYNARD SMITH 1966; BUSH 1969). Die erste Hypothese ist die der allopatrischen Artbildung. Sie misst der Unterbrechung des Genflusses zwischen Populationen durch geografische Barrieren eine entscheidende Bedeutung bei. Allopatrische Populationen werden sich aufgrund von genetischer Drift oder aufgrund unterschiedlicher Selektionsdrücke, verursacht von divergierenden Umweltbedingungen auf verschiedenen Seiten der geografischen Barriere, divergent entwickeln (TURELLI *et al.* 2001). Dabei können sowohl prä- als auch

postzygote Isolationsmechanismen als Nebenprodukt divergierender Entwicklung entstehen (Nebenprodukt-Mechanismus, engl. by-product mechanism) (SCHLUTER 2001). Treffen zwei noch nicht vollständig voneinander isolierte Populationen aufeinander und zeigen die Hybride eine reduzierte Fitness, kann sogenannte Verstärkung (engl. enhancement oder reinforcement) zu Artbildung zwischen diesen Populationen führen (DOBZHANSKY 1940). Das bedeutet, dass präzygote Isolationsmechanismen wie assortative Paarung und assortative Partnerwahl durch natürliche Selektion verstärkt werden, da so die Kosten der postzygoten reduzierten Hybridenfitness verringert werden. Einige Autoren halten allopatrische Modelle für ausreichend, um den Großteil der Speziationsereignisse zu erklären (MAYR 1963). Dieser Standpunkt ist heute aber nicht mehr allgemeiner Konsens, die Evidenz für andere Modelle wird immer deutlicher (VIA 2001).

Das zweite Modell ist das der parapatrischen Speziation. Parapatrische Populationen kommen in unmittelbar aneinander angrenzenden Habitaten vor. Zwischen solchen Populationen befindet sich demnach keine geografische Barriere, durch die Genfluss direkt verhindert werden kann. Ist eine genügend weite geografische Ausbreitung gegeben, kann dennoch theoretisch jeder Mechanismus, der Divergenz zwischen allopatrischen Populationen bewirken kann, diese auch zwischen parapatrischen Populationen veranlassen (TURELLI *et al.* 2001).

Die dritte Hypothese ist die der sympatrischen Speziation. Populationen sind sympatrisch, wenn sie überlappende Verbreitungsgebiete besiedeln. Die Möglichkeit sympatrischer Speziation wurde lange Zeit angezweifelt (MAYR 1963). Neuere Modelle führten aber im letzten Jahrzehnt zu zunehmender Akzeptanz (VIA 2001). Einige dieser Modelle beziehen ökologisch verursachte reproduktive Isolation, verbunden mit Adaptation an alternative diskrete

Ressourcen und/oder Habitate, ein (Überblick in VIA 2001). Andere betonen Artbildung durch den Wettbewerb um kontinuierlich verteilte Ressourcen und sexuelle Selektion, die auf ein Kontinuum von Phänotypen wirkt. Der intermediäre Phänotyp wird weniger Ressourcen gewinnen als die extremen Phänotypen und daher weniger fit sein. Die resultierende disruptive Selektion kann zu reproduktiver Isolation zwischen sympatrischen Arten führen (TURELLI *et al.* 2001).

Neben der Einteilung von Speziationsereignissen nach geografischen Gegebenheiten spielt das Modell der ökologischen Speziation eine wichtige Rolle. Von ökologischer Artbildung spricht man, wenn divergierende Selektion auf Merkmale zwischen Populationen in kontrastierenden Umgebungen direkt oder indirekt zur Entstehung von reproduktiver Isolation führt (SCHLUTER 2001). Die klassische Vorstellung über ökologische Speziation ist folgende: Populationen evolvieren beginnende reproduktive Isolation in einer allopatrischen Phase, da sie Adaptationen an divergierende Umgebungen akkumulieren (Nebenprodukt-Mechanismus). Präzygote Isolation wird dann nach sekundärem Kontakt durch Verstärkung komplettiert. Die Zeit des sekundären Kontakts ist dabei nicht festgelegt, d.h. im Extremfall sind sowohl allopatrische als auch sympatrische Speziation vorstellbar. Eine Voraussage ökologischer Speziation ist die direkte Reduktion der Hybridenfitness durch ökologische Selektionsdrücke (SCHLUTER 1996). Hierzu wurde eine Studie mit limnetischen und benthischen sympatrischen Stichlingspopulationen (*Gasterosteus aculeatus*) durchgeführt. F1-Hybride zeigten im Labor keine Fitnessverluste, aber einen intermediären Phänotypen. Dadurch war ihre Fitness im Freiland reduziert, sie konnten weniger effektiv Nahrung aufnehmen und wuchsen langsamer (HATFIELD und SCHLUTER 1999). Sexuelle Selektion kann in ökologischer Speziation eine Rolle spielen, wenn divergierende Selektion zwischen

Habitaten zu Variationen in sekundären Geschlechtsmerkmalen, Paarungs- oder Kommunikationssystemen führt (RUNDLE und NOSIL 2005).

### 1.2 Evolutionsbiologie des Dreistachligen Stichlings

Die vorliegende Studie wurde anhand des Dreistachligen Stichlings (*Gasterosteus aculeatus*) als Studiensystem durchgeführt (s. Abb. 1). *G. aculeatus* ist ein wichtiger natürlicher Modellorganismus in Evolutions- und Verhaltensforschung, unter anderem wegen seiner weiten Verbreitung, seiner ökologischen Vielseitigkeit und seiner extremen phänotypischen Variation (BELL und FOSTER 1994). Man findet ihn in borealen und gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre, wo er küstennahe marine Habitate, Ästuar und verschiedene Süßwasserhabitate bewohnt. Marine Populationen haben nach dem Ende der letzten Eiszeit vor 12000 - 15000 Jahren wiederholt eine Vielzahl verschiedener Süßwasserlebensräume besiedelt (BELL und FOSTER 1994). Mit dieser Besiedlung ging die Entwicklung divergierender sympatrischer und parapatrischer Ökotypen einher (REUSCH *et al.* 2001b), die sich in Merkmalen wie Körpergröße (NAGEL und SCHLUTER 1998), Färbung (HAGEN und MOODIE 1979) oder des Verhaltens (FOSTER 1995) unterscheiden. Viele dieser Merkmale sind erblich (HAGEN und MOODIE 1979; MCPHAIL 1994; PEICHEL *et al.* 2001), und

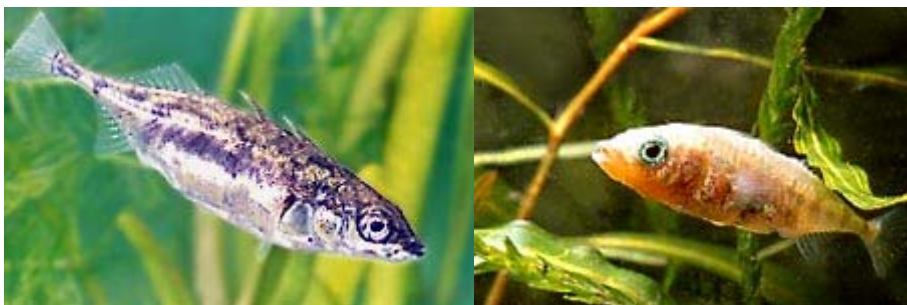


Abb. 1: *Gasterosteus aculeatus*. Links, Weibchen. Rechts, Männchen ([www.hansthiele.de/galerie/sonst/stichling/mann\\_2.jpg](http://www.hansthiele.de/galerie/sonst/stichling/mann_2.jpg) und [/wint\\_2.jpg](http://www.hansthiele.de/galerie/sonst/stichling/wint_2.jpg)).

Unterschiede scheinen durch ökologisch basierende divergierende Selektion entstanden zu sein (MCKINNON und RUNDLE 2002).

Mehrere Systeme wurden gefunden, in denen zwei morphologisch und ökologisch divergierende Populationen (Ökotypen) sym- oder parapatrisc h koexistieren (MCPHAIL 1992; LAVIN und MCPHAIL 1993; THOMPSON *et al.* 1997), (Überblick in MCKINNON und RUNDLE 2002). Da zwischen solchen sym- und parapatrischen Populationen keine geografischen Barrieren, aber erbliche Unterschiede (s.o.) vorhanden sind, müssen andere Isolationsmechanismen wirken. Beim Dreistachligen Stichling wurden in diesem Zusammenhang sowohl postzygote (SCHLUTER 1995; HATFIELD und SCHLUTER 1999; VAMOSI und SCHLUTER 1999; MCKINNON und RUNDLE 2002; RUNDLE 2002) als auch präzygote Isolationsmechanismen (NAGEL und SCHLUTER 1998; VINES und SCHLUTER 2005) gefunden.

In Schleswig-Holstein, Deutschland, kommt der Dreistachlige Stichling in verschiedenen Habitaten vor. Man findet Populationen in Flüssen, Seen, Ästuaren und dem Meer. In einer Studie über die phylogenetischen Beziehungen dieser Populationen zueinander konnte Folgendes gezeigt werden: Die anhand von neutralen genetischen Markern beobachtete genetische Divergenz zwischen Fluss- und Seepopulationen korrelierte vor allem mit Habitattyp und nicht mit geografischer Distanz oder Verbindung der Wasserwege (REUSCH *et al.* 2001b). Fluss- und Seepopulationen gehörten jeweils zu einer monophyletischen Klade. Die beobachtete Divergenz zeigt, dass zwischen parapatrischen See- und Flusspopulationen kein oder nur ein sehr geringes Maß an Genfluss herrscht. Zwischen Seen und Flüssen, die zu einem Wassersystem gehören, bestehen keine prinzipiellen geografischen Barrieren. Daher müssen andere ökologische oder ethologische Paarungsbarrieren vorhanden sein (REUSCH *et al.* 2001b). Eine Möglichkeit wäre die präzygote Isolation von Fluss- und

Seepopulationen durch assortative Partnerwahl, also Partnerwahl nur innerhalb der einzelnen Populationen bzw. Habitate.

### 1.3 Paarungsverhalten des Dreistachligen Stichlings

In verhaltensbiologischen Studien spielt der Dreistachlige Stichling wegen seines interessanten Brutverhaltens schon seit vielen Jahrzehnten eine Rolle (ROWLAND 1994). Während der Balzzeit färben sich die Augen der Männchen blau und ihre ventrale Körperseite rot (s. Abb. 1). Die Männchen errichten Territorien und bauen Nester aus filamentösen Algen und anderem Pflanzenmaterial (WOOTTON 1976). Das Nestmaterial wird zusammengehalten durch ein klebriges Sekret, das die Männchen in ihren hypertrophierten Nieren bilden und während Nestbau und Balzritual auf das Nest geben (sie „kleben“). Die klebrige Eigenschaft dieses Sekrets wird durch ein Protein namens Spiggin verursacht, ein Glykoprotein, das unter der Kontrolle androgener Hormone gebildet wird (JAKOBSSON *et al.* 1999). Die Weibchen folgen den Männchen im Verlauf des Balzrituals in das Nest und laichen dort ab. Danach besamt das Männchen die Eier und betreibt für zwei bis drei Wochen Brutpflege (WOOTTON 1976).

Weibliche Stichlinge wählen die Männchen, denen sie in das Nest folgen und mit denen sie sich verpaaren wollen (BELL und FOSTER 1994). Die Weibchen wählen dabei nach unterschiedlichen Gesichtspunkten. Visuelle Merkmale wie die Rotfärbung oder auch die Größe der potentiellen Paarungspartner spielen bei der Entscheidung der Weibchen eine Rolle (MILINSKI und BAKKER 1990; BAKKER und MUNDWILER 1994; NAGEL und SCHLUTER 1998). Neben diesen visuellen Merkmalen beeinflusst auch der Geruch der einzelnen Männchen die Wahl der Weibchen. Empfangen die Weibchen nur

olfaktorische (= geruchliche) Signale, werden Männchen mit Nest gegenüber Männchen ohne Nest bevorzugt (HABERLI und AESCHLIMANN 2004). Auch olfaktorische Signale über die Kombination der Allele des Hauptgewebekompatibilitätskomplexes (MHC, s.u.), die die potentiellen Partner besitzen, beeinflussen die Wahl des Weibchens (REUSCH *et al.* 2001a; AESCHLIMANN *et al.* 2003; MILINSKI 2003).

#### **1.4 Funktion und Struktur des MHC**

Der Hauptgewebekompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) ist eine chromosomale Region aus verschiedenen, teilweise eng gekoppelten Genen, die den größten bekannten Polymorphismus im Vertebratengenom aufweisen. Verschiedene Studien machen die Annahme wahrscheinlich, dass die extreme genetische Diversität durch natürliche Selektion aufrechterhalten wird und Pathogene die Diversifikation der MHC-Gene im Laufe der Zeit bewirken (DOHERTY und ZINKERNAGEL 1975), (Überblick in APANIUS *et al.* 1997). Diese Vermutung wird durch die entscheidende zellbiologische Rolle gestützt, welche die MHC-Moleküle während der Initiierung der adaptiven Immunantwort spielen.

MHC-Moleküle der Klasse I und II präsentieren Bruchstücke von Antigenen (Epitope) zirkulierenden T-Zellen, die dadurch aktiviert und zur Proliferation angeregt werden. Diese Erkennungsmoleküle sind damit entscheidend für die Erkennung von „Selbst“ und „Fremd“ und für das Festlegen der Ziele der adaptiven Immunabwehr. Jedes MHC-Molekül kann nur Peptide mit bestimmten Aminosäuresequenzen binden und präsentieren, führt also nur zur Erkennung eines bestimmten Spektrums von Parasiten-Antigenen. Funktionell verschiedene MHC-Moleküle werden demnach zur Erkennung

verschiedener Parasiten, bzw. –Antigene führen. Einzelne T-Zellen erkennen über den spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) einen bestimmten Komplex aus Antigen und MHC-Molekül und können nur von diesem Komplex aktiviert werden (JANEWAY 1997). MHC Klasse I-Moleküle werden auf allen somatischen Zellen exprimiert und präsentieren vor allem Antigene von intrazellulären Parasiten. MHC Klasse II-Moleküle werden nur auf spezialisierten Zellen des Immunsystems exprimiert (z.B. B-Zellen oder Makrophagen). Es sind Heterodimere aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die von A- und B-Genen codiert werden und vor allem dem Schutz gegen extrazelluläre Pathogene dienen (s. Abb. 2).

Die genetische Architektur des MHC wurde bei verschiedenen Spezies eingehend untersucht (u.a. KAUFMAN *et al.* 1995; AMADOU *et al.* 1999; BECK *et al.* 1999; GUNTHER und WALTER 2001). Vergleiche zeigen Gemeinsamkeiten, aber auch große Unterschiede in der Organisation des MHC zwischen den einzelnen Arten (FLAJNIK und KASAHARA 2001). Ein großer Unterschied zwischen dem MHC der Tetrapoden und dem der Knochenfische (Actinopterygii) ist,

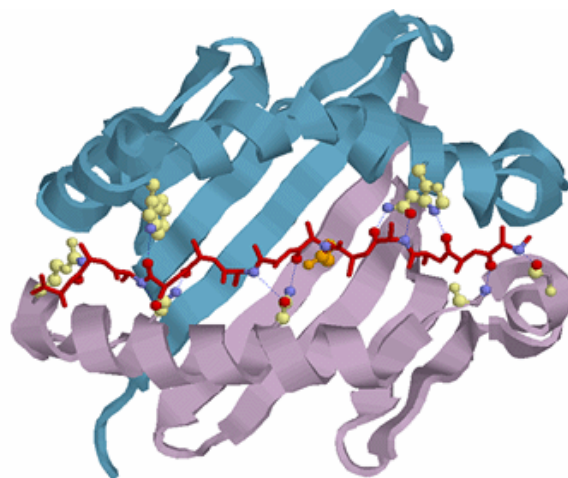


Abb. 2: Struktur der Antigen präsentierenden Region (APR) eines menschlichen MHC Klasse II-Proteins (HLA-DR1) mit einem gebundenem Antigen ([www.molvisions.com/products/imgs/bin3d.gif](http://www.molvisions.com/products/imgs/bin3d.gif)).



dass die Klasse I- und Klasse II-Gene der Knochenfische nicht in einer gemeinsamen Kopplungsgruppe vorliegen (SATO *et al.* 2000).

Der Dreistachlige Stichling besitzt wahrscheinlich bis zu zwölf verschiedene Klasse I- und sechs verschiedene Klasse IIB-Loci (SATO *et al.* 1998). Alle Klasse I- und Klasse II-Loci sind eng gekoppelt, wobei Klasse I- und Klasse II-Gene, wie bei anderen Knochenfischen, zu verschiedenen Kopplungsgruppen gehören. Die angenommenen sechs Loci des MHC Klasse IIB weisen sehr ähnliche Sequenzen auf, vermutlich weil sie durch Duplikation vor relativ kurzer Zeit entstanden sind und verschiedene Loci Sequenzmotive durch Genkonversion auszutauschen scheinen (REUSCH *et al.* 2004).

### 1.5 Diversität des MHC und Partnerwahl

Generell werden zwei verschiedene Mechanismen genannt, durch die natürliche Selektion durch Parasiten den balancierten Polymorphismus des MHC bewirken kann (POTTS und WAKELAND 1993; APANIUS *et al.* 1997; EDWARDS und HEDRICK 1998). Erstens sollte natürliche Selektion denjenigen Parasiten-Genotyp begünstigen, der am besten den Abwehr-Mechanismen des häufigsten Wirts-Genotyps entkommen kann. Wirts-Individuen mit seltenen MHC-Allelen sollten demnach einen Vorteil haben. Steigt dann die Frequenz dieser seltenen Allele in der Wirtspopulation, steigt auch der Selektionsdruck auf den Parasiten, Adaptationen an diese Allele zu evolvieren, und der Prozess beginnt von vorn. Dieser koevolutive Prozess kann zu einem stabilen Polymorphismus des MHC in der Wirtspopulation führen (negativ frequenz-abhängige Selektion), (BODMER 1972). Zweitens ist es leicht vorstellbar, dass Individuen, die möglichst viele funktionell verschiedene MHC-Allele tragen, einen Vorteil besitzen, da sie ein möglichst großes Spektrum verschiedener Pathogene

erkennen. Heterozygote Individuen sollten demnach eine höhere Fitness erreichen als homozygote (Heterozygoten-Vorteil oder Überdominanz), (DOHERTY und ZINKERNAGEL 1975; HUGHES und NEI 1988). Beide Mechanismen müssen sich nicht unbedingt gegenseitig ausschließen.

Wenn MHC-Diversität durch Selektion durch Parasiten bewirkt wird, sollte auch MHC-abhängige Partnerwahl, über die die Fitness der Nachkommen im Hinblick auf Parasitenresistenz erhöht werden kann, selektionsbegünstigt sein. (PENN und POTTS 1999). Verschiedene Studien zeigen, dass Individuen ihre Partner im Hinblick auf deren MHC-Allele nach unterschiedlichen Gesichtspunkten wählen (PIERTNEY und OLIVER 2006): Sie wählen dissortativ, um die Heterozygotie der Nachkommen zu erhöhen (BEAUCHAMP *et al.* 1988; YAMAZAKI *et al.* 1988; POTTS *et al.* 1991) oder um Inzucht zu minimieren (MANNING *et al.* 1992; OLSEN *et al.* 1998); oder sie wählen den Partner, mit dem sie eine optimale Anzahl verschiedener MHC-Allele über mehrere Loci für die Nachkommen erreichen (AESCHLIMANN *et al.* 2003). Informationen über den MHC von potentiellen Paarungspartnern werden dabei über olfaktorische Signale erlangt, wobei noch nicht klar ist, welche Substanzen diesen Geruch bewirken (EGGERT *et al.* 1998; PENN und POTTS 1998).

Auch der Dreistachlige Stichling zeigt MHC-abhängige Partnerwahl. Auf Populationsebene zeigt *G. aculeatus* eine hohe Diversität an Allelen des MHC Klasse IIB. Die einzelnen Fische weisen allerdings im Schnitt eine mittlere Anzahl verschiedener MHC Klasse IIB-Allele auf, anstelle der maximal möglichen (REUSCH *et al.* 2001a). Man findet also ein Optimum anstelle eines Maximums. Solch ein MHC-Optimum wird von manchen Theorien vorhergesagt (NOWAK *et al.* 1992; DEBOER und PERELSON 1993): Während positiver Selektionsprozesse im Thymus werden nur die T-Zellen bewahrt, die mit einer bestimmten Affinität an MHC-Moleküle der Klasse I und II (beladen mit körpereigenen

Peptiden) binden (Vonboehmer 1994). Während der darauf folgenden negativen Selektion werden alle T-Zellen eliminiert, die mit genügend hoher Affinität an MHC-Moleküle (und körpereigene Peptide) binden, um die T-Zellen zu aktivieren (Nossal 1994). Um eine starke Eliminierung von T-Zellen während negativer Selektionsprozesse zu verhindern und gleichzeitig die Erkennung diverser Pathogene zu gewährleisten, sollte es eine optimale Anzahl verschiedener Allele in einem Individuum geben (NOWAK *et al.* 1992).

Weibliche Stichlinge scheinen Paarungspartner entsprechend dieser Theorie zu wählen. Sie bevorzugen den Geruch eines Männchens, mit dem sie für ihre Nachkommen eine mittlere, optimale Anzahl an MHC Klasse IIB-Allelen (zusammen ca. zwölf Allele, bzw. sechs Allele in den Nachkommen bei vermutlich sechs Loci) erreichen. Sie scheinen demnach in der Lage zu sein, Informationen über Anzahl und Art der Allele ihres eigenen MHC und des MHC des potentiellen Partners zu detektieren und zu benutzen, um die eigenen Allele möglichst optimal komplettieren zu können (AESCHLIMANN *et al.* 2003). Die Partnerwahl unter diesen Gesichtspunkten kann demnach dazu dienen, ein immungenetisches Optimum, also hohe Parasitenresistenz, zu erreichen (MILINSKI 2003).

Verschiedene Studien zeigen, dass die Weibchen von einer solchen Strategie tatsächlich profitieren. In natürlichen Populationen wurde die niedrigste Parasitendiversität und der niedrigste Befall bei Stichlingen mit einer mittleren, optimalen Anzahl an MHC Klasse IIB-Allelen gefunden (WEGNER *et al.* 2003b). Laborexperimente ergaben ein ähnliches Bild, und lassen darauf schließen, dass eine optimale Anzahl an MHC Klasse IIB-Allelen die größte Resistenz verleiht (WEGNER *et al.* 2003a). Fische mit einer mittleren Anzahl an MHC Klasse IIB-Allelen scheinen die Aktivität des angeborenen Immunsystems reduzieren und damit verbundene negative Nebeneffekte (reaktive

Sauerstoffmoleküle) minimieren zu können (KURTZ *et al.* 2004). Diese Studien liefern jeweils Hinweise auf eine optimale, mittlere Anzahl an MHC Klasse IIB-Molekülen von circa sechs Allelen pro Individuum.

Fluss- und Seepopulationen von *G. aculeatus* in Schleswig-Holstein unterscheiden sich interessanterweise in der Zusammensetzung der Allele des MHC Klasse IIB (WEGNER *et al.* 2003b; WEGNER 2004). Das heißt, dass die meisten der Allele, die man in Flusspopulationen findet, nicht in Seepopulationen vorhanden sind und umgekehrt. Außerdem hat man auch Unterschiede in der Diversität der Parasitenfauna, die man in den beiden Habitattypen vorfindet, beobachtet. Dreistachelige Stichlinge aus Seen sind von mehr Parasitenarten befallen als Stichlinge aus Flüssen, häufig auch mit höherer Intensität (KALBE *et al.* 2002).

### 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Populationen einer Art, die in unterschiedlichen Habitattypen wie Seen und Flüssen vorkommen, sind wahrscheinlich von verschiedenen Parasitenarten befallen. Solche Populationen sollten jeweils an die Parasitenfauna ihres Heimathabitats adaptiert sein und sich daher in bestimmten Merkmalen unterscheiden. Diese Adaptation kann zum Beispiel die Gene des MHC betreffen, da verschiedene MHC-Allele vorteilhaft in der Detektierung unterschiedlicher Parasiten sind. Hybride zwischen beiden Habitattypen sollten Fitnessverluste erfahren, da sie an keines der beiden Habitate optimal angepasst sein werden (SCHLUTER 2001). Diese Tatsache kann zu Artbildung führen, beispielsweise durch Verstärkung, da jeder Mechanismus, der die Entstehung solcher benachteiligter Hybride verhindert, selektionsbegünstigt sein sollte (DOBZHANSKY

1940). Ein solcher Mechanismus kann assortative Partnerwahl und Paarung sein.



Abb. 3: Die verschiedenen Habitattypen See und Fluss. Gezeigt sind zwei der untersuchten Standorte. Links, Vierer See. Rechts, Schwale.

Tatsächlich unterscheiden sich, wie oben beschrieben, Fluss- und Seepopulationen des Dreistachligen Stichlings in Schleswig-Holstein sowohl in der Parasitenfauna (KALBE *et al.* 2002) als auch am MHC Klasse IIB (WEGNER *et al.* 2003b; WEGNER 2004). Die Unterschiede am MHC zwischen Fluss- und Seepopulationen könnten durch Adaptation an die unterschiedliche Parasitenfauna evolviert und Hybride zwischen diesen Populationen schlechter adaptiert und daher weniger fit sein. Des Weiteren lässt die genetische Divergenz zwischen Fluss- und Seepopulationen auf das Vorhandensein einer Paarungsbarriere schließen, die nicht durch geografische Gegebenheiten verursacht wird (REUSCH *et al.* 2001b). Diese Paarungsbarriere kann aufrechterhalten werden, indem die Weibchen Paarungspartner aus ihren Ursprungspopulationen, also assortativ, wählen. Des Weiteren ist es gut vorstellbar, dass die Weibchen sich dabei olfaktorisch an den unterschiedlichen MHC-Genotypen in den jeweiligen Habitaten orientieren. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob

die weiblichen Stichlinge der Fluss- und Seepopulationen Paarungspartner mit einem MHC-Genotyp aus ihrem Ursprungshabitat und allgemeiner Partner aus ihren Ursprungshabitaten anhand olfaktorischer Signale bevorzugen. Diese assortative Partnerwahl könnte die genetische Divergenz zwischen Fluss- und Seepopulationen des Dreistachligen Stichlings in Schleswig-Holstein erklären.

Es wurden dazu zwei Experimente durchgeführt. In beiden hatten die Weibchen jeweils die Wahl zwischen dem Geruch von zwei verschiedenen Männchen. Im ersten Experiment wurden Versuche zur MHC Klasse IIB-abhängigen Partnerwahl vorgenommen. Hier sollte anhand von Stichlingen aus einer See- und einer Flusspopulation geprüft werden, ob die weiblichen Fische den Geruch eines Männchens mit Ursprungs-MHC-Genotyp (also aus dem Ursprungshabitat des Weibchens stammend) gegenüber dem eines Männchens mit fremdem MHC-Genotyp bevorzugen. Dazu wurden zwei verschiedene Unterexperimente entwickelt. In Unterexperiment A sollte getestet werden, ob sich die Weibchen aufgrund der Herkunft der Allele bzw. des MHC-Genotyps (also „Ursprungsgenotyp“ oder „fremder Genotyp“) entscheiden. In dem beide Männchen in Kombination mit dem Weibchen dieselbe Anzahl an verschiedenen MHC-Allelen ergaben, wurde hier für die Allelzahl kontrolliert. In Unterexperiment B dagegen sollte getestet werden, ob sich die Weibchen anhand der unterschiedlichen Anzahl an MHC Klasse IIB-Allelen, die sie in Kombination mit dem Männchen mit dem Ursprungs- und mit dem Männchen mit dem fremden MHC-Genotyp erreichen, entscheiden. Denn es ist gut vorstellbar, dass die Kombination mit dem Männchen mit fremdem MHC-Genotyp das Optimum übersteigt.

Im zweiten Experiment wurden Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl durchgeführt. Hier sollte getestet werden, ob die Weibchen den Geruch eines Männchens aus ihrem Ursprungshabitat gegenüber dem eines

Männchens aus dem fremden Habitat anhand allgemeiner olfaktorischer Signale bevorzugen. Dazu wurden Versuche an jeweils zwei See- und zwei Flusspopulationen durchgeführt.

In beiden Experimenten wurde gegen die Nullhypothese getestet, dass kein Unterschied im Wahlverhalten auftritt, das heißt, dass die Weibchen den Geruch keines der beiden Männchen bevorzugen. Unsere Erwartung entsprechend den obigen Ausführungen war, dass die Weibchen Männchen mit einem Ursprungs-MHC-Genotyp bzw. Männchen aus ihren Ursprungshabitaten gegenüber Männchen mit fremdem MHC-Genotyp bzw. Männchen aus dem fremden Habitat favorisieren würden.

---



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Experiment 1: Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl

#### 2.1.1 Herkunft und Hälterung der Fische

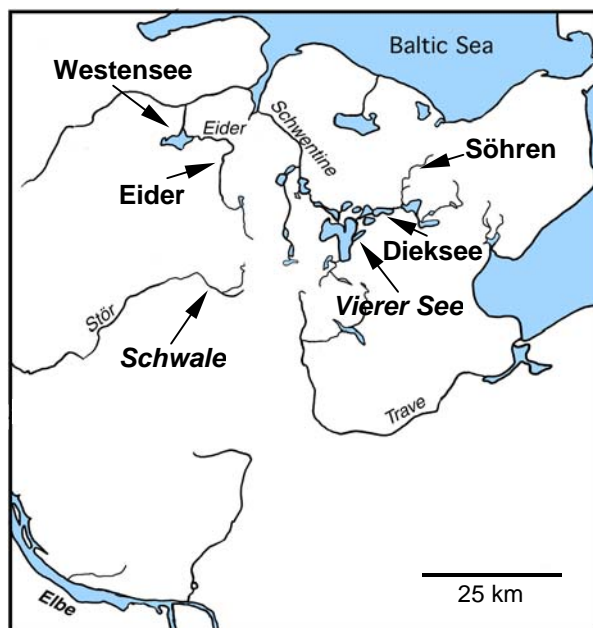


Abb. 4: Standorte der Experimentalpopulationen in Schleswig-Holstein. *Kursiv*: Experiment 1. Gerade: Experiment 2.

Die Versuchsfische (*Gasterosteus aculeatus*) stammten aus zwei verschiedenen Habitaten, einem See (Vierer See) und einem Fluss (Schwale) in Schleswig-Holstein, Deutschland. Die beiden Habitate sind nicht direkt miteinander verbunden (s. Abb. 4). Die für das Experiment verwendeten Männchen und Weibchen stammten aus zwei verschiedenen Ursprungspopula-

tionen. Die Männchen waren Labornachzuchten der F2-Generation, die Weibchen Wildfänge aus Vierer See und Schwale. Durch diese Kombination waren Männchen und Weibchen genetisch unabhängig voneinander.

Ich habe Männchen der F2-Generation verwendet, weil es so möglich war, die genetischen Effekte des MHC von solchen im restlichen Genom getrennt zu betrachten. Für ihre Nachzucht waren Wildfänge aus Vierer See und Schwale untereinander gekreuzt worden (RAUCH 2006). Die resultierenden F1-Hybride waren wiederum miteinander verpaart worden, wobei keine Paarungen zwischen Verwandten stattfanden. Die F2-Nachkommen jeden Paares

wurden als eine Familie bezeichnet. Es wurden vier dieser Familien ausgewählt, bei denen die vorhandenen MHC Klasse IIB-Allele alle entweder eindeutig als aus dem Fluss (R) oder als aus dem See (L) stammend identifiziert werden konnten. Die F2-Hybride innerhalb einer Familie wiesen vier verschiedene MHC Klasse II B-Genotypen auf: den reinen Fluss-MHC (RR), den reinen See-MHC (LL) und die beiden hybriden MHC (RL bzw. LR), wobei nur die Fische mit reinem Fluss- oder See-MHC-Genotyp für die Versuche verwendet wurden. Das restliche Genom konnte zwischen beiden Habitattypen frei rekombinieren, der genetische Hintergrund beider Gruppen von Experimentalfischen war also identisch. Daher konnten die Ergebnisse auf den MHC Klasse IIB oder zumindest auf die Kopplungsgruppe, innerhalb der er vererbt wird, zurückgeführt werden. Verteilt auf die vier Familien standen insgesamt 50 Männchen mit reinem Fluss- und 48 mit reinem See-MHC zur Verfügung. Bezogen auf den MHC Klasse IIB stellten Männchen mit RR-MHC für die Schwale-Weibchen Männchen mit Ursprungs-MHC-Genotyp dar, Männchen mit LL-MHC trugen den fremden MHC-Genotyp. Für die Vierer-See-Weibchen galt das Umgekehrte.

Die F2-Fische wurden in verschiedenen Klimakammern vor Versuchsbeginn nacheinander vier Wochen unter Herbst- (12°C Luft- und Wassertemperatur und 12 L : 12 D Photoperiode), vier Wochen unter Winter- (6°C und 8 L : 16 D), sechs



Abb. 5: Männchen mit Nest im Aquarium.

Wochen unter Frühlings- (12°C und 12 L : 12 D) und neun Wochen unter Sommerbedingungen (18°C und 15 L : 9 D) gehältert. Die Versuche habe ich unter Sommerbedingungen durchgeführt. Die Fische befanden sich in Gruppen zu circa 20 Individuen in 10 l-Plastikaquarien mit kontinuierlichem Wasseraustausch von 1 l h<sup>-1</sup>. Erst im Sommerraum habe ich an ihrer Rotfärbung erkennbare Männchen einzeln in entsprechende 10 l-Aquarien gesetzt. Für die spätere MHC-Typisierung wurde jedem Männchen (insgesamt 296 Individuen) ein Stück des ersten Dorsalstachels (ca. 2 mm) abgeschnitten. Allen Männchen habe ich Nestmaterial aus Garnstücken und Sand mit in das Aquarium gegeben (s. Abb. 5) (AESCHLIMANN *et al.* 2003).

Die Versuchsweibchen wurden Ende Mai bis Ende Juni in beiden Habitaten in Ufernähe mit Hilfe einfacher Käscher gefangen und getrennt nach Habitat unter Frühlingsbedingungen (s.o.) gehältert. Anfang August habe ich je 30 Weibchen aus Vierer See und Schwale in den Sommerraum, in dem sich auch die Versuchsmännchen befanden (s.o.), umgesetzt. Die Weibchen wurden hier in Gruppen von fünf Individuen in 10 l-Plastikaquarien gehältert. Nach einer Woche habe ich die 60 Weibchen einzeln in entsprechende Aquarien gesetzt und ein Stück des ersten Dorsalstachels jeden Weibchens für die nachfolgende MHC-Typisierung abgeschnitten.

Gefüttert wurden alle Fische unter Herbst-, Winter- und Frühlingsbedingungen drei Mal pro Woche mit gefrorenem Futter (rote Mückenlarven, InterRyba). Unter Sommerbedingungen bekamen sie ebenfalls drei Mal pro Woche gefrorenes Futter und zusätzlich jeden Tag Lebendfutter (Artemia, Tubifex, rote und weiße Mückenlarven, InterRyba; Daphnia, Wildfänge). Die Weibchen erhielten während der Experimente dazu ein zweites Mal täglich Lebendfutter.

## 2.1.2 Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl

### *Aufbau des Strömungskanals*

Die Versuche zur Partnerwahl wurden in einem Strömungskanal durchgeführt (s. Abb. 6). Darin wurde ein kontinuierlicher Wasserstrom erzeugt, der auf beiden Seiten des Kanals gleich stark war. Ein Teil des Kanals war durch zwei feine Drahtnetze, die senkrecht zur Fließrichtung angeordnet waren, vom Rest des Kanals abgetrennt. Hier hinein wurde das Testweibchen während der Versuche gesetzt (Testbereich, s. Abb. 6). Von der Einströmöffnung bis hinunter zu dem Testbereich verlief parallel zum Wasserstrom in der Mitte des Kanals eine trennende Wand. Dadurch wurde ein laminarer Wasserstrom über den Testbereich hinweg erzeugt, so dass sich auch dort, wo die trennende Wand fehlte, das Wasser der linken und rechten Seite des Kanals nicht vermischte.

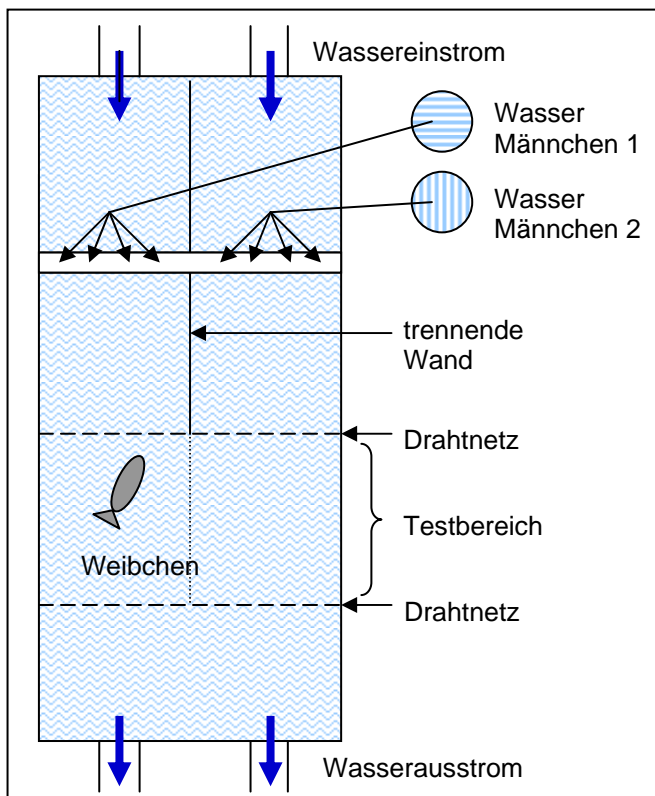


Abb. 6: Strömungskanal. Die gestrichelte vertikale Linie stellt die imaginäre Mittellinie des Testbereichs dar. Nähere Erläuterungen siehe Text. Verändert nach (HABERLI und AESCHLIMANN 2004).

Für weitere Details siehe (REUSCH *et al.* 2001a; AESCHLIMANN *et al.* 2003; HABERLI und AESCHLIMANN 2004; MILINSKI *et al.* 2005).

In dem Strömungskanal konnte ein Versuchswelbchen getestet werden, indem ihm stimulierendes Wasser aus zwei Geruchsquellen auf verschiedenen Seiten des Kanals angeboten wurde. Als stimulierende Geruchsquellen habe ich Wasser aus den Aquarien zweier Testmännchen verwendet (s.u.), das durch jeweils vier dünne Schläuche (Durchmesser 2 mm) mit Hilfe einer peristaltischen Präzisionspumpe (ISMATEC MV, 100 W, 50 Hz) gleichzeitig in die linke bzw. die rechte Seite des Kanals gepumpt wurde ( $100 \text{ ml min}^{-1}$ ).

Das Verhalten des Welbchens wurde mit Hilfe einer digitalen Videokamera aufgenommen, die oberhalb des Testbereichs angebracht war. Von dort wurde es auf einen Monitor überspielt. Eine horizontal auf dem Monitor eingezeichnete Linie (die „Mittellinie“) teilte den Testbereich imaginär in eine in Fließrichtung linke und rechte Hälfte (s. Abb. 6, hier als gepunktete Linie dargestellt). In dem Testbereich selber war diese Linie nicht vorhanden.

#### *Experimentelle Kombination der Versuchsfische*

Der MHC Klasse IIB der Versuchsfische wurde vor Versuchsbeginn genetisch analysiert und die jeweils pro Fisch vorhandenen Allele bestimmt (siehe 2.1.3. Genotypisierung). Pro Versuch habe ich ein reifes Welbchen aus der Schwale oder dem Vierer See mit Wasser aus den Aquarien zweier Männchen im Strömungskanal stimuliert. Die zwei Männchen stammten aus derselben Familie. Eines besaß einen reinen Fluss-MHC Klasse IIB (RR), das andere einen reinen See-MHC Klasse IIB (LL). Die Welbchen wurden also mit einem Männchen mit MHC-Genotyp aus der Ursprungspopulation und einem Männchen mit fremdem MHC-Genotyp getestet. Es sind zwei verschiedene Mechanismen vorstellbar, wie eine Paarungsbarriere zwischen Fluss- und Seepopulationen

durch olfaktorische Partnerwahl aufgrund von MHC-Unterschieden durch die Weibchen gebildet werden könnte. Die Versuchstripletts aus einem Weibchen und zwei Männchen habe ich daher in zwei Unterexperimenten auf unterschiedliche Weise zusammengestellt:

Unterexperiment A: In diesem Unterexperiment wurde für einen Einfluss der Allelzahl auf die Wahl des Weibchens kontrolliert, um eine mögliche Partnerwahl auf die Herkunft des MHC zurückführen zu können. Die Allele (MHC Klasse IIB) des Weibchens ergaben in Kombination mit einem Männchen dieselbe oder eine höchstens um ein Allel voneinander abweichende Anzahl an Allelen wie in Kombination mit dem zweiten Männchen (zur Zählweise s.u.). Versuche, in denen das Männchen mit dem Ursprungs-MHC-Genotyp eine höhere Anzahl ergab, wurden gleich häufig durchgeführt wie Versuche, in denen das Männchen mit dem fremden MHC-Genotyp eine höhere Anzahl ergab. Es wurden 19 Versuche durchgeführt.

Unterexperiment B: In diesem Unterexperiment sollte folgende Hypothese getestet werden: Die Kombination der MHC-Allele eines Weibchens mit denen eines Männchens mit fremdem MHC-Genotyp sollte häufig eine über dem Optimum liegende Anzahl an Allelen ergeben. Daher sollte nicht das Männchen mit dem fremden, sondern das Männchen mit dem Ursprungs-MHC-Genotyp gewählt werden. In Unterexperiment B wurden die Weibchen verwendet, für die keine zu Unterexperiment A passenden Männchen gefunden wurden. Abgesehen davon habe ich die Tripletts zufällig zusammengestellt. Wurde ein nicht zu Unterexperiment A passendes Weibchen reif, habe ich es an diesem Tag in Unterexperiment B eingesetzt. Die Allele (MHC Klasse IIB) des Weibchens ergaben also in Kombination mit dem einen Männchen

zufällig eine um mindestens 1,5 Allele höhere oder niedrigere Anzahl an Allelen wie in Kombination mit dem anderen Männchen. Es wurden 15 Versuche durchgeführt.

Die Weibchen stammten in beiden Unterexperimenten etwa zur Hälfte jeweils aus dem Vierer See und der Schwale. Jedes Weibchen wurde nur einmal verwendet. Aufgrund ihrer limitierten Anzahl habe ich die meisten Männchen in beiden Unterexperimenten und damit zweimal eingesetzt. Ein Männchenpaar aus je einem der Unterexperimente wurde in dieser Zusammenstellung auch in dem jeweils anderen verwendet, aber mit jeweils einem anderen Weibchen kombiniert. Es wurde darauf geachtet, dass ungefähr die Hälfte der Männchenpaare zuerst in Unterexperiment A, die andere Hälfte zuerst in Unterexperiment B eingesetzt wurde. Pro Familie und Unterexperiment wurden zwei bis acht erfolgreiche Replikate durchgeführt.

*Zählweise der Allele*

Weibchen:	a    b    c
Männchen:	d    b    e

Abb. 7: Fiktives Beispiel für MHC-Allele.

Die Allele von Weibchen und Männchen wurden folgendermaßen zusammengezählt: Alle Allele des Weibchens wurden aufsum-

miert. Dazu wurden die Allele des Männchens addiert, die nicht im Weibchen auftauchten. Zusätzlich rechnete man 0,25 Punkte für alle die Allele des Männchens, die auch im Weibchen vorhanden waren. Denn solche Allele werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in den Nachkommen zu finden sein als Allele, die nur in einem der beiden Fische vorkommen. Zur Verdeutlichung soll hier ein fiktives Beispiel dienen (s. Abb. 7): Zählt man alle Allele des Weibchens zusammen (a,b,c), plus die, die beim Männchen, aber nicht beim Weibchen auftauchen (d,e), erhält man fünf Allele. Dazu addiert man

noch ein Mal 0,25 für das Allel, das bei beiden Fischen auftaucht (b). Hier ergeben sich in Kombination also 5,25 Allele.

### *Versuchsprotokoll*

Jeden Morgen habe ich die reifen und ablaichbereiten Weibchen bestimmt. Reife Weibchen waren durch einen sehr runden, durch die Eier angeschwollenen Rumpf und eine leicht geöffnete rosafarbene Kloake erkennbar. Daraufhin habe ich nach einem der beiden Unterexperimente dazu passende Männchenpaare ermittelt. Es wurden nur Männchen verwendet, die Nester gebaut hatten und diese zur Zeit des Versuchs unterhielten. Die Männchen eines Paares waren ungefähr gleich rot. Die Männchen wurden dann folgendermaßen stimuliert: Direkt vor das Aquarium jedes Männchens wurde ein reifes Weib-



Abb. 8: Strömungskanal. Fließrichtung des Wassers von links nach rechts. Videokamera oberhalb des Testbereichs nimmt das Verhalten des Weibchens auf.

chen in einem wassergefüllten 2,5 l-Plastikbehälter gestellt. Es blieb dort so lange, bis ich beobachten konnte, dass das Männchen das klebende Nierensekret auf das Nest abgeben hatte („geklebt“ hatte, s. Einleitung). Nur Männchen, die an einem bestimmten Versuchstag oder höchstens einen Tag zuvor geklebt hatten, wurden für die Versuche an diesem Tag benutzt. Das stimulierende Wasser aus den Aquarien der beiden Männchen habe ich nacheinander



immer an der gleichen Stelle ungefähr 2 cm über den Nestern entnommen und in zwei saubere Glasflaschen gefüllt.

Das Versuchswelbchen wurde mit Hilfe einer Glaspfeife (Eydam) von ihrem Becken zum Strömungskanal (s. Abb. 8) transportiert, wo es in die Mitte des Testbereichs gesetzt wurde. Über den Monitor konnte ich das Verhalten des Welbchens beobachten. Der Versuch wurde, zwei Minuten nachdem das Welbchen die auf dem Monitor zu sehende imaginäre Mittellinie gekreuzt hatte, gestartet (Akklimationsphase). Der genaue Versuchsablauf war folgender: Dem Welbchen wurde für fünf Minuten das stimulierende Wasser aus den Becken der beiden Männchen angeboten. Es folgte eine zweiminütige Pause, in der neutrales Wasser in den Kanal gepumpt wurde. Daraufhin wurde wieder für fünf Minuten stimulierendes Wasser in den Kanal geleitet, diesmal mit vertauschten Seiten, wodurch für einen möglichen Effekt der beiden Seiten des Kanals kontrolliert werden sollte. Die Seite des Kanals, in die in den ersten fünf Minuten das Wasser des Männchens mit Ursprungs-MHC-Genotyp geleitet wurde, wechselte von Versuch zu Versuch (AESCHLIMANN *et al.* 2003). Der Versuch wurde mit Hilfe der Videokamera aufgenommen. Er wurde gewertet, wenn zwei Kriterien erfüllt waren. Erstens musste sich das Welbchen mindestens fünf Minuten in der, in Fließrichtung, vorderen Hälfte des Testbereichs aufgehalten haben. Zweitens musste es spätestens 48 Stunden nach dem Versuch abgelaicht haben. Beide Kriterien dienten dazu, Versuche mit Welbchen, die noch nicht ablaichbereit waren, auszuschließen.

#### *Auswertung der Videos und Datenanalyse*

Die Auswertung der Daten wurde blind durchgeführt. Das bedeutet, dass für mich bei der Analyse der Videos nicht zu sehen war, auf welcher Seite des Kanals das Wasser des Männchens mit Heimat-MHC-Genotyp, bzw. des

Männchens mit fremdem MHC-Genotyp, floss. Gemessen wurde die Zeit in Sekunden, die das Versuchswelbchen während der zehnminütigen Zufuhr des stimulierenden Wassers auf jeder Seite des Kanals verbrachte. Als Wechsel der Seite wurde betrachtet, wenn das Welbchen mit seiner „Nase“ die imaginäre Mittellinie auf dem Monitor überquerte.

Bei der weiteren Auswertung dieser Daten wurde die Zeit (in Sekunden) verwertet, die das Welbchen auf der Seite des Männchens mit dem Ursprungs-MHC-Genotyp verbracht hatte. Außerdem wurde für jeden Versuch die halbe Versuchsdauer bestimmt (rund 300 Sekunden). Von der Verweildauer des Welbchens auf der Seite des Männchens mit Ursprungs-MHC-Genotyp wurde dann die halbe Versuchsdauer subtrahiert (zeitliche Präferenz Ursprungs-MHC, siehe Ergebnisse). Demnach zeigte ein positiver Wert eine Präferenz für das Männchen mit dem Ursprungs-MHC-Genotyp, ein negativer Wert eine Präferenz für das Männchen mit dem fremden MHC-Genotyp an.

### 2.1.3 Genotypisierung

#### *DNA-Extraktion*

Die DNA habe ich aus einem circa 2 mm langen Stück des ersten Dorsalstachels der Versuchsfische gewonnen. Dazu wurden die Stachelstücke nach Standardprotokoll in Chelex/Proteinase K-Lösung inkubiert (Chelex 100, Bio-rad, in wässriger Lösung; 14 mg/ml Proteinase K, Sigma Aldrich, in Tris-HCl, pH 7,5). Anschließend wurden sie sofort in den Gefrierschrank (- 20°C) gestellt und dort gelagert.

### *Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Aufgrund der Ähnlichkeit der duplizierten MHC Klasse II-Loci (s. Einleitung) ist die Verwendung von Primern, die gezielt einzelne Loci amplifizieren, schwierig (REUSCH *et al.* 2004). Daher wurde eine motivspezifische PCR-Strategie angewendet, die nicht zwischen einzelnen Loci unterscheidet (WEGNER 2004). Dabei wurde ein 175-211 Basenpaare langes Stück der Antigen präsentierenden Region (APR) des MHC Klasse IIB-Gens (das Exon 2 der schweren  $\beta$ -Kette des MHC IIB-Komplexes) amplifiziert. Es wurden acht verschiedene fluoreszenzmarkierte Reverse-Primer (StichSSCP\_R01 - R08, Metabion) verwendet (WEGNER 2004). Dadurch konnte innerhalb aller vorkommenden Sequenzen eine erste Sortierung in acht verschiedene Sequenzgruppen getroffen werden, innerhalb derer wiederum die unterschiedlichen Allele durch Single-strand Conformation Polymorphism-Analyse (SSCP) (s.u.) aufgetrennt werden konnten. Der Forward-Primer (GA11 F, (SATO *et al.* 1998); Metabion) war unmarkiert und immer identisch. Zu weiteren Details siehe (WEGNER 2004).

### *Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse*

Mit Hilfe einer Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse können Sequenzpolymorphismen mittels einer Fragmentanalyse detektiert werden. Nur so ist es möglich, in den relativ großen Stichproben zu einer zügigen Genotypisierung ohne Sequenzierung zu kommen. Die SSCP-Analyse macht sich zunutze, dass einzelsträngige DNA-Fragmente sequenzabhängig in nativen, nicht-denaturierenden Polymeren aufgrund sequenzspezifischer Sekundärstrukturen eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität aufweisen (BINZ *et al.* 2001). Die Analyse wurde in einem Kapillarsequenzierer

(3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems) durchgeführt. Zu weiteren Details siehe (WEGNER 2004).

Die detektierten Peaks wurden mit Hilfe der Genescan- und Genotypersoftware ausgewertet. Obwohl die einzelnen Sequenzen von bis zu sechs verschiedenen Loci stammen, werden sie der Einfachheit halber als Allele bezeichnet.

### **2.1.4 Statistische Analyse**

Die Analysen wurden mit Hilfe ungepaarter und gepaarter t-Tests durchgeführt. Waren die Daten nicht normalverteilt oder die Varianzen nicht homogen, wurden sie log-transformiert. Vergleiche zwischen zwei Stichproben, bei denen eine Stichprobe nicht normalverteilt war, wurden mit dem Wilcoxon 2-Sample Test durchgeführt.

Falls See- und Flussfische getrennt analysiert wurden, erniedrigte sich das geforderte Signifikanzniveau für den einzelnen Vergleich nach Bonferroni-Korrektur auf  $P = 0,025$ , um für den Gesamttest einen nominalen Fehler von  $\alpha = 0,05$  nicht zu überschreiten.

## **2.2 Experiment 2: Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl**

### **2.2.1 Herkunft und Hälterung der Fische**

Die in Experiment 2 verwendeten Stichlinge waren F1-Labornachzuchten. Sie stammten von insgesamt vier Populationen aus zwei Seen (Westensee und Dieksee) und zwei Flüssen (Eider und Söhren) ab. Je ein See und ein Fluss sind natürlich miteinander verbunden, die Eider fließt in den Westensee, der Söhren in den Dieksee (s. Abb. 4). Für die Nachzucht waren die Fische nur

innerhalb der einzelnen Habitate verpaart (reine Linien) und die F1-Nachkommen einzelner Paare als eine Familie bezeichnet worden. Es standen pro Habitat vier bis sieben verschiedene Familien mit einem bis 20 Individuen zu Verfügung. Ich habe die Fische vor Versuchsbeginn vier Wochen unter Herbst-, sieben Wochen unter Winter-, sechs Wochen unter Frühlings- und sechs Wochen unter Sommerbedingungen gehältert (Temperatur- und Lichtbedingungen s. Experiment 1). In allen Klimakammern befanden sie sich in Gruppen von einem bis 20 Fischen in 10 l-Plastikaquarien. Unter Sommerbedingungen habe ich sie nach und nach einzeln gesetzt und jedem Männchen Nestmaterial mit in sein Becken gegeben (s. Experiment 1). Die Becken wurden so aufgestellt, dass jedes Männchen immer neben mindestens einem Weibchen stand. Die Fütterungsbedingungen entsprachen denen aus Experiment 1.

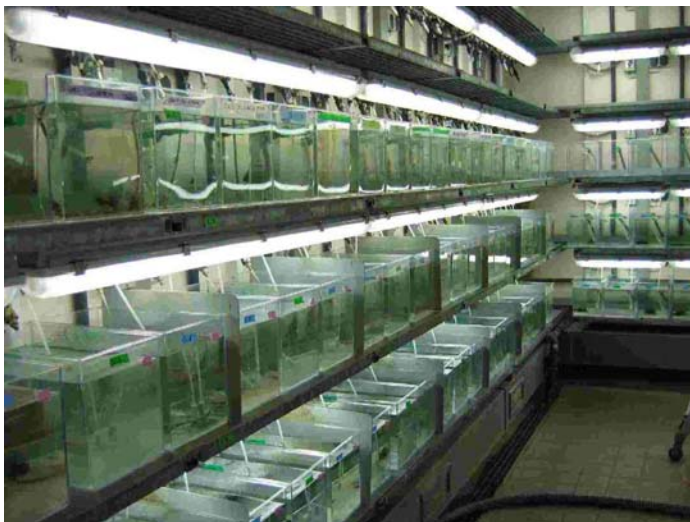


Abb. 9: Klimakammer mit Sommerbedingungen, in der die Versuche zur Partnerwahl durchgeführt wurden.

### **2.2.2 Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl**

Als experimenteller Aufbau wurde entsprechend Experiment 1 der Strömungskanal benutzt. Wie in Experiment 1 habe ich nur ablaichbereite reife

Weibchen und Männchen, die ein Nest unterhielten, verwendet. Die beiden Männchen, die getestet werden sollten, waren ungefähr gleich rot. Die pro Habitat vorhandenen Familien und Individuen reichten nicht für ein gleichmäßiges Versuchsdesign, mit dem man für Familieneffekte hätte kontrollieren können, aus. Die Versuchstriplets aus einem Weibchen und zwei Männchen habe ich daher folgendermaßen zusammengestellt: Weibchen aus dem Westensee wurden mit je einem Männchen aus dem Westensee und der Eider kombiniert, genauso wie Weibchen aus der Eider. Weibchen aus Dieksee und Söhren wurden entsprechend mit je einem Dieksee- und einem Söhrenmännchen getestet. Das Weibchen gehörte immer zu einer anderen Familie als die Männchen, das heißt, dass pro Versuch drei verschiedene Familien miteinander kombiniert wurden. Es wurden Fische aus möglichst vielen Familien pro Habitat verwendet, um zu verhindern, dass die Ergebnisse nur von einer Familie beeinflusst wurden. Außerdem wurden die Familien in möglichst vielen Kombinationen zusammengestellt. Eine für einen Versuch gebildete Kombination aus drei Familien wurde nicht wieder verwendet. Alle Fische wurden nur einmal benutzt.

Das Versuchsprotokoll entsprach dem unter Experiment 1 (siehe Punkt 2.1.2) beschriebenen.

### **2.2.3 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung der Daten entsprach der unter Punkt 2.1.4 beschriebenen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Experiment 1: Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl

##### 3.1.1 Genetische Differenzierung und Diversität der MHC Klasse IIB-Gene der Versuchsfische

Die Details zur genetischen Analyse des MHC Klasse IIB der verwendeten Weibchen finden sich in Tabelle 1. Es zeigte sich, dass acht aller detektierten Allele in beiden Habitaten vorkamen (entspricht 27,12%). Die Überlappung war also wie erwartet gering. Die Individuen aus dem Vierer See besaßen eine signifikant niedrigere durchschnittliche Anzahl an Allelen des MHC Klasse IIB (Wilcoxon 2-sample Test:  $Z = -2,41$ ,  $n = 19$  (Schwale),  $n = 15$  (Vierer See),  $P = 0,0159$ . Wilcoxon-Test, da Vierer See-Daten nicht normalverteilt). Dies entspricht nicht der Erwartung, dass Seefische eine höhere Diversität an MHC Klasse IIB-Genen aufweisen.

Tab. 1: Diversität der MHC Klasse IIB-Allele der Versuchswelbchen.

Habitat	Anzahl Allele /Habitat	Durchschnittl. Anzahl Allele/Individuum ( $\pm$ SE)
Schwale	31	7,05 $\pm$ 0,39
Vierer See	28	5,67 $\pm$ 0,23
Total	51	6,44 $\pm$ 0,26

Die Genotypisierung der F2-Männchen (siehe dazu Tabelle 2) zeigte, dass alle detektierten Allele entweder nur in Fischen mit Fluss-Genotyp (RR) oder nur in Fischen mit See-Genotyp (LL) vorkamen. Die Anzahl an Allelen, die die

Familien des RR-Genotyps im Schnitt trugen, war nicht verschieden von der, die die Familien des LL-Genotyps im Schnitt aufwiesen ( $t = 0,56$ ,  $n = 8$ ,  $P=0,5945$ ).

Tab. 2: Diversität der MHC Klasse IIB-Allele der Versuchsmännchen.

Genotyp	Anzahl Allele /Genotyp	durchschnittl. Anzahl Allele/Familie ( $\pm$ SE)
Fluss (RR)	11	6,25 $\pm$ 0,8
See (LL)	15	6,75 $\pm$ 0,5
Total	26	6,5 $\pm$ 0,4

Der Vergleich der F2-Männchen mit den Weibchen zeigte Folgendes: Von den elf verschiedenen Allelen des MHC Klasse IIB des RR-Genotyps waren acht sowohl in Weibchen aus dem See als auch in Weibchen aus dem Fluss vorhanden, sie wurden also in beiden Habitaten gefunden (entspricht 72,73%). Dies ist ein überraschend hoher Anteil. Von den 15 Allelen des LL-Genotyps wurde eines in Weibchen aus beiden Habitaten detektiert (entspricht 6,67%).

In Unterexperiment B ergab die Kombination mit einem Männchen zufällig eine andere Anzahl an Allelen des MHC Klasse IIB als mit dem anderen Männchen. In 17 von 18 Versuchen ergab die Kombination mit dem Männchen mit dem fremden MHC-Genotyp eine höhere Anzahl als die Kombination mit dem Männchen mit dem Ursprungs-MHC-Genotyp.



### 3.1.2 Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl

Die in Abbildung 10 und den weiteren Abbildungen gezeigten Mittelwerte (zeitliche Präferenz Ursprungs-MHC bzw. Ursprungshabitat) ergaben sich wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Weibchen verbrachten in beiden Unterexperimenten mehr Zeit auf der Seite des Männchens mit MHC Klasse IIB-Genotyp aus der Ursprungspopulation (s. Abb. 10). Beide Werte waren jedoch nicht signifikant verschieden von Null. Daher ist die Präferenz für das Männchen mit MHC aus der Ursprungspopulation, entgegen unseren Erwartungen, statistisch nicht abgesichert (für A:  $t = 1,21$ ,  $n = 19$ ,  $P = 0,2422$ ; für B:  $t = 0,96$ ,  $n = 15$ ,  $P = 0,4993$ ).

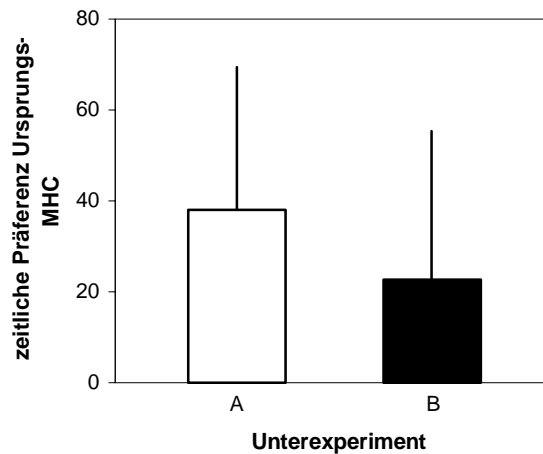


Abb. 10: Olfaktorische Präferenz von Stichlingsweibchen für Männchen mit MHC Klasse IIB der Ursprungspopulation. Gezeigt sind die gemittelten Werte (+ Standardfehler) der Dauer (in sec), die die Weibchen in beiden Unterexperimenten auf der Seite des Männchens mit Ursprungs-MHC-Genotyp verbrachten. Stichprobenumfang siehe Text.

Einige der Männchen wurden nur in einem der beiden Unterexperimente eingesetzt. Um zu testen, ob sich die Mittelwerte der beiden Unterexperimente

unterscheiden, können aber nur Versuche mit solchen Männchenpaaren betrachtet werden, die auch tatsächlich in beiden Unterexperimenten verwendet wurden. Die beiden Unterexperimente stellen in diesem Fall verbundene Stichproben dar. Bezieht man also nur die Versuche mit den Männchen ein, die zweimal eingesetzt wurden, blieben die Weibchen ebenfalls in beiden Unterexperimenten länger auf der Seite des Männchens mit Ursprungs-MHC-Genotyp (A:  $59,23 \pm 35,48$  sec und B:  $16,96 \pm 36,79$  sec; keine Abbildung). Beide Werte waren nicht verschieden von Null (A:  $t = 1,67$ ,  $n = 13$ ,  $P = 0,1209$ ; B:  $t = 0,64$ ,  $n = 13$ ,  $P = 0,653$ ). Bezogen auf diese Werte zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Unterexperimenten (paired  $t$ -test:  $t = 1,08$ ,  $n = 13$ ,  $P = 0,3002$ ).

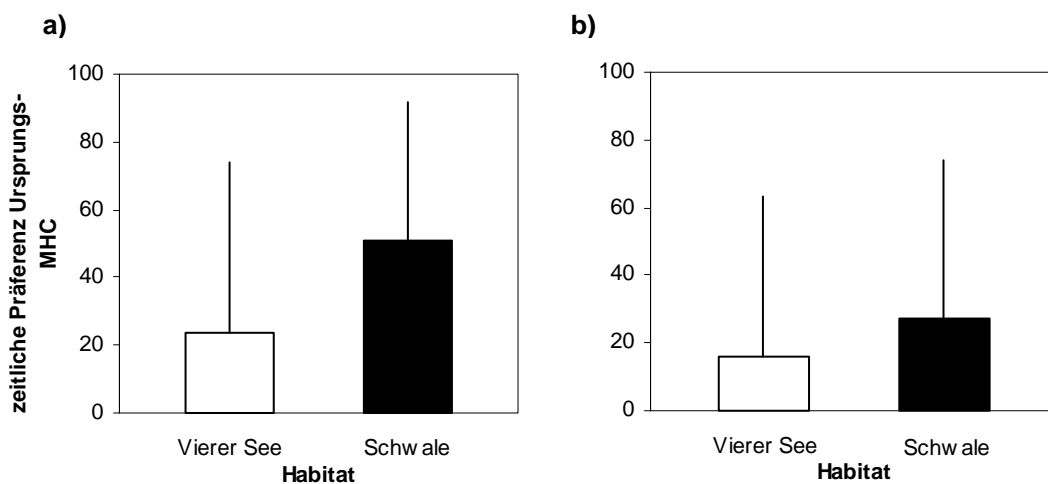


Abb. 11: Olfaktorische Präferenz von Stichlingsweibchen für Männchen mit MHC Klasse IIB aus der Ursprungspopulation. Gezeigt sind die gemittelten Werte (+ Standardfehler) der Dauer (in sec), die die Weibchen getrennt nach Habitat auf der Seite des Männchens mit Ursprungs-MHC-Genotyp verbrachten. **a)**, Unterexperiment A. **b)**, Unterexperiment B. Stichprobenumfang siehe Text.

In Unterexperiment A (Abb. 11 a) verbrachten sowohl die Weibchen aus dem Vierer See als auch die Weibchen aus der Schwale mehr Zeit auf der Seite des Männchens mit MHC Klasse IIB aus der Ursprungspopulation. Allerdings zeigten sie in beiden Fällen keine signifikante Präferenz (Vierer See:  $t = 0,48$ ,  $n = 9$ ,  $P = 0,6453$ , Schwale:  $t = 1,23$ ,  $n = 10$ ,  $P = 0,2513$ ).

In Unterexperiment B (Abb. 11 b) verbrachten die Weibchen aus beiden Habitaten ebenfalls mehr Zeit auf der Seite des Männchens mit UrsprungsmHC-Genotyp. Auch hier waren beide Werte nicht von Null verschieden (Vierer See:  $t = 0,34$ ,  $n = 6$ ,  $P = 0,7481$ ; Schwale:  $t = 0,58$ ,  $n = 9$ ,  $P = 0,5777$ ). In beiden Unterexperimenten bestand zwischen den zwei Habitaten kein Unterschied im Wahlverhalten der Weibchen (*A*:  $t = 0,41$ ,  $n = 9$  (Vierer See),  $n = 10$  (Schwale),  $DF = 17$ ,  $P = 0,684$ ; *B*:  $t = 0,17$ ,  $n = 6$  (Vierer See),  $n = 9$  (Schwale),  $DF = 13$ ,  $P = 0,8748$ ).

### 3.2 Experiment 2: Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl

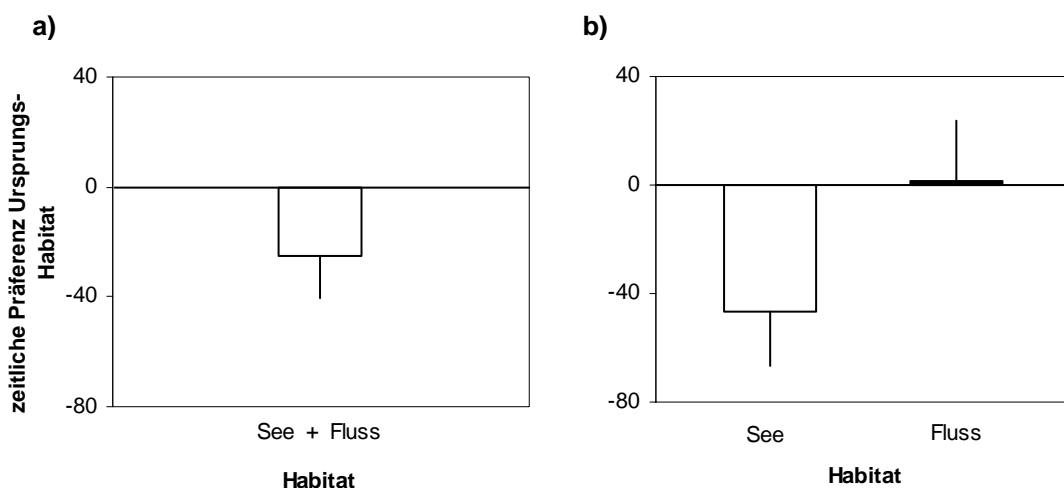


Abb. 12: Olfaktorische Präferenz von Stichlingsweibchen für Männchen aus ihrem Ursprungshabitat. Gezeigt sind die gemittelten Werte ( $\pm$  Standardfehler) der Dauer (in sec), die die Weibchen auf der Seite des Ursprungsmännchens verbrachten. **a)**, Mittelwert aller Versuche. **b)**, Mittelwerte der Versuche getrennt nach Habitattyp. (See = Westensee und Dieksee, Fluss = Eider und Söhren). Stichprobenumfang siehe Text.

In Experiment 2 verbrachten die Weibchen insgesamt weniger Zeit auf der Seite des Männchens aus der Ursprungspopulation als unter einer reinen Zufallspräferenz (s. Abb. 12 a). Dieser Wert war nicht verschieden von Null, weswegen wir nicht von einer echten Ablehnung des Männchens aus dem Ursprungshabitat bzw. einer echten Präferenz für das Männchen aus dem fremden Habitat sprechen können ( $t = -1.66$ ,  $n = 38$ ,  $P = 0.1061$ ). Die Seeweibchen (aus Westensee und Dieksee) verbrachten fast 50 Sekunden weniger auf der Seite des Männchens aus der Ursprungspopulation, die Flussweibchen (aus Eider und Söhren) blieben fast gleich lang auf beiden Seiten des Kanals (s. Abb. 12 b). Es zeigte sich aber in beiden Fällen keine echte Ablehnung bzw. Präferenz (See:  $t = -2,32$ ,  $n = 21$ ,  $P = 0.0311$ ; Fluss  $t = -0,77$ ,  $n = 17$ ,  $P = 0,4553$ . Daten log-transformiert). Das Ausbleiben von Resultaten in diesem Experiment bestätigt die ausbleibenden Resultate aus Experiment 1 (Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl). Es trat kein Unterschied zwischen dem Wahlverhalten der See- und Fluss-Weibchen auf (Wilcoxon 2-sample Test:  $Z = 1,54$ ,  $n = 38$ ,  $P = 0,1243$ . Wilcoxon-Test, da Fluss nicht normalverteilt).

## 4 Diskussion

Die genetische Divergenz zwischen Fluss- und Seepopulationen des Dreistachligen Stichlings ist auffällig und deutet auf eine Paarungsbarriere hin (REUSCH *et al.* 2001b). Diese Paarungsbarriere könnte durch olfaktorische Partnerwahl der Weibchen bewirkt werden, indem die Weibchen Paarungspartner aus ihrer Ursprungspopulation, also assortativ, wählen. In dieser Studie konnte ich einen solchen Mechanismus allerdings nicht zeigen. Entgegen unseren Erwartungen zeigten die Versuchswelibchen in beiden Experimenten kein signifikantes Wahlverhalten. Es konnte keine assortative Wahl, also eine Präferenz des Männchens mit Ursprungs-MHC-Genotyp oder des Männchens aus dem Ursprungshabitat, allerdings auch keine dissortative Wahl beobachtet werden.

### 4.1 Experiment 1: Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl

Bei der Genotypisierung der Weibchen zeigte sich, dass sich Fluss- und Seefische in der Kombination der Allele des MHC Klasse IIB unterscheiden. Nur gut ein Viertel der vorhandenen Allele war in beiden Habitaten vorhanden. Die reinen Fluss- und See-Genotypen der Männchen wiesen jeweils vollständig verschiedene Allele des MHC Klasse IIB auf. Diese Tatsachen bestätigen eine der Grundannahmen dieser Studie: MHC Klasse IIB-Genotypen unterscheiden sich zwischen Fluss- und Seepopulationen (WEGNER *et al.* 2003b; WEGNER 2004). Dies eröffnet die Möglichkeit der Partnerwahl basierend auf diesen Unterschieden. Der Vergleich der MHC-Genotypen der Versuchsmännchen mit denen der Versuchswelibchen zeigte allerdings Folgendes: Gut 70 Prozent der MHC Klasse IIB-Allele, die in den Männchen mit reinem Fluss-Genotyp vorhanden waren, wurden sowohl in Weibchen aus der Schwale als

auch in Weibchen aus dem Vierer See gefunden. Dieser hohe Prozentsatz an Allelen, die in beiden Habitattypen vorkommen, war überraschend, da die Familien der Männchen so ausgewählt worden waren, dass jedes Allel als eindeutig aus dem Fluss oder aus dem See stammend identifiziert werden konnte.

Der bei dem Vergleich der natürlichen Populationen der Weibchen gefundene moderate Prozentsatz an Allelen, die in beiden Habitaten vorliegen, ist gut erklärbar. Es gibt verschiedene Parasitenarten, die sowohl im See als auch im Fluss vorkommen (KALBE *et al.* 2002), und daher sollte es auch Allele geben, die in beiden Habitaten vorteilhaft und damit selektionsbegünstigt sind. Den mit 70 Prozent erhöhte Anteil solcher Allele, der in den Männchen mit reinem Fluss-Genotyp gefunden wurde, kann man sich folgendermaßen erklären: Die Männchen stellen eine sehr kleine Stichprobe dar, da insgesamt nur vier verschiedene Familien, also vier Genotypen, in den Versuchen verwendet wurden. Eine zufällige Erhöhung des Prozentsatzes an Allelen, die in beiden Habitattypen verbreitet sind, kann man sich also leicht vorstellen. Der hohe Anteil dieser Allele in den Männchen mit reinem Flussgenotyp sollte also unserer Annahme nicht widersprechen.

Erstaunlicherweise wiesen die einzelnen Weibchen aus dem Fluss im Schnitt signifikant mehr Allele des MHC Klasse IIB auf als die Weibchen aus dem See. Das ist überraschend, da es im See eine höhere Parasitendiversität gibt und oft auch eine höhere Intensität des Befalls (KALBE *et al.* 2002). Man sollte also annehmen, dass es im See von Vorteil für die einzelnen Fische wäre, eine höhere MHC-Diversität aufzuweisen, um mehr Parasiten detektieren zu können. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden.

In den Versuchen zur MHC-abhängigen Partnerwahl konnte ich keine signifikante Bevorzugung der Männchen mit Ursprungs-MHC-Genotyp über Männchen mit fremdem MHC-Genotyp durch die Weibchen feststellen.

Allerdings kann das Vorhandensein assortativer Wahl aufgrund von MHC-Unterschieden von mir auch nicht sicher abgelehnt werden. Um formal die Nullhypothese (keine Bevorzugung eines der beiden Männchens, also keine assortative Partnerwahl) anzunehmen, müsste zunächst eine Teststärken (= Power)-Analyse durchgeführt werden. Für die Analyse wiederum müsste eine Effektgröße definiert werden, die noch biologisch relevant ist. Diese kann von den vorhandenen Daten allerdings nur schwer abgeleitet werden.

Um die Möglichkeit zu betrachten, dass der untersuchte Mechanismus in der Natur vorhanden ist, von mir aber nicht detektiert wurde, müssen mögliche Fehler bedacht werden. Erstens sind experimentelle Fehler sowohl bei den molekulargenetischen Methoden als auch bei den Methoden für die Versuche zur Partnerwahl nicht auszuschließen. Allerdings handelt es sich in beiden Fällen um erprobte Methoden, und es wurde nach bewährten Protokollen vorgegangen (u.a. REUSCH *et al.* 2001a; HABERLI und AESCHLIMANN 2004; WEGNER 2004). Des Weiteren wurde die Auswertung der Versuche zur Partnerwahl blind vorgenommen, um Beeinflussung und mögliche Fehler zu minimieren. Zweitens ist es möglich, dass Fehler bei der Bestimmung der Anzahl der Allele pro Individuum gemacht wurden. Allerdings wurden Individuen, in denen weniger als drei Allele detektiert wurden, nicht für die Versuche verwendet. Dadurch wurde die Gefahr vermindert, Fehler durch eine schlechte DNA-Extraktion und folgende Typisierung zu machen. Drittens muss man die Möglichkeit bedenken, dass die Weibchen während der Partnerwahlversuche nicht gewählt haben, weil sie nicht an einer Partnerfindung interessiert waren. Allerdings wurde dieses Risiko durch zwei Kriterien verkleinert: Es wurden nur Versuche gewertet, bei denen die Weibchen erstens mindestens die Hälfte der Versuchszeit im vorderen Teil des Strömungskanals verbrachten und zweitens nach spätestens 48 Stunden abgelaicht hatten. Zusammenfassend

sollte man es daher als relativ unwahrscheinlich betrachten, dass assortative Wahl aufgrund von MHC-Unterschieden bei den untersuchten Populationen von *G. aculeatus* in der Natur zu finden ist. Dennoch kann ich nicht sicher sagen, dass dieser Mechanismus tatsächlich nicht vorkommt. Allerdings wurden in anderen Studien zu MHC-abhängiger Partnerwahl bei *G. aculeatus* mit vergleichbarem Stichprobenumfang wie in dieser Arbeit signifikante Ergebnisse erzielt (REUSCH *et al.* 2001a; AESCHLIMANN *et al.* 2003; MILINSKI *et al.* 2005). Wenn assortative Wahl die genetische Divergenz zwischen Fluss- und Seeklade aufrechterhält, sollte dieser Effekt eine entsprechende Stärke haben und mit dem in dieser Studie verwendeten Stichprobenumfang zu detektieren sein.

Die Versuche zur MHC-abhängigen Partnerwahl basierten auf der Annahme, dass die Weibchen in der Lage sind, zwischen Ursprungs- und fremdem MHC-Genotyp zu unterscheiden, und es bleibt zu diskutieren, wie realistisch diese Annahme war. In Unterexperiment A gingen wir davon aus, dass die Unterscheidung über die Herkunft, also den MHC- oder Alleltyp, läuft. Eine Unterscheidung zwischen seltenem Genotyp (wahrscheinlich vorteilhaft) und fremdem Genotyp (wahrscheinlich nachteilig) ist denkbar, wenn man sich das Vorhandensein eines habitatspezifischen Markers innerhalb der Kopplungsgruppe des MHC Klasse IIB vorstellt. Die Evolution eines solchen Markers ist denkbar, da ein Weibchen gemäß den Ausführungen in der Einleitung einen Vorteil erfahren sollte, wenn es sich MHC-assortativ paart. Der Selektionsdruck auf assortative Paarung könnte folglich auch die Evolution eines habitatspezifischen Markers bewirken. In Unterexperiment B gingen wir davon aus, dass die kombinierte Anzahl an MHC-Allelen mit dem Männchen mit fremdem MHC-Genotyp häufig oberhalb des Optimums liegt und die unterschiedliche kombinierte Anzahl mit fremdem und Ursprungs-MHC-Genotyp die Ursache für die assortative Wahl ist. Tatsächlich ergab die Kombination mit dem



Männchen mit fremdem MHC-Genotyp in 17 von 18 Versuchen eine höhere Anzahl an MHC-Allelen als die Kombination mit dem Männchen mit Ursprungs-MHC-Genotyp. Demnach waren beide Mechanismen denkbar und ein guter Ausgangspunkt für die durchgeführten Experimente.

#### **4.2 Experiment 2: Versuche zur habitatabhängigen Partnerwahl**

Wenn die Weibchen nicht anhand der Unterschiede zwischen Ursprungs- und fremdem MHC-Genotyp assortative Partnerwahl zeigen, ist es dennoch gut vorstellbar, dass sie assortative olfaktorische Wahl anhand genereller Signale erkennen lassen. Denn assortative Partnerwahl kann durch divergierende Selektion in verschiedenen Habitattypen entstehen (VINES und SCHLUTER 2005) und kann vorhandene Divergenz aufrechterhalten (SEEHAUSEN *et al.* 1997), und olfaktorische Partnerwahl bei Stichlingen wurde beobachtet (u. a. REUSCH *et al.* 2001a; HABERLI und AESCHLIMANN 2004). Entgegen unseren Erwartungen zeigten die Weibchen allerdings auch in diesem Experiment keine Präferenz für das Männchen aus der Ursprungspopulation.

Die Weibchen aus den Seen zeigten überraschenderweise einen Trend in die Richtung, dass sie im Schnitt länger auf der Seite des fremden Männchens blieben. Allerdings ist auch dieses Ergebnis statistisch nicht abgesichert, daher ist bei der Interpretation Vorsicht angebracht. Denkbar wäre, dass die verwendeten F1-Familien zufällig nah verwandt waren und die Weibchen daher versuchten, dissortativ zu paaren, um eine suboptimale Kombination von MHC-Allelen zu verhindern. Da keine MHC-Typisierungen durchgeführt wurden und die Präferenz nicht signifikant war, bleibt diese Annahme allerdings spekulativ.

### 4.3 Allgemeine Betrachtung

Das Ausbleiben von Ergebnissen in Experiment 2 bestätigt dasjenige aus Experiment 1, da ich auch im zweiten Experiment keine Präferenz für das Männchen aus dem Ursprungshabitat, das auch einen Ursprungs-MHC-Genotyp trägt, finden konnte. Das zweimalige Ausbleiben von Ergebnissen deutet darauf hin, dass die weiblichen Stichlinge keine olfaktorische assortative Partnerwahl zeigen, weder aufgrund der Unterschiede am MHC Klasse IIB noch aufgrund allgemeiner olfaktorischer Signale. Die beobachtete genetische Divergenz zwischen See- und Flusspopulationen des Dreistachligen Stichlings in Schleswig-Holstein scheint demnach nicht auf der beschriebenen olfaktorischen Partnerwahl der Weibchen zu basieren.

Allerdings ist aufgrund des genetischen Musters offensichtlich, dass kein oder nur ein geringes Maß an Genfluss zwischen See- und Flusspopulationen herrscht (REUSCH *et al.* 2001b). Es sollte demnach andere Mechanismen geben, die die postulierte Paarungsbarriere verursachen. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass in Schleswig-Holstein zwei Kolonisationswellen stattgefunden haben. Daher ist die genetische Divergenz zwischen See- und Flussklade wahrscheinlich durch schnelle adaptive Anpassung an verschiedene ökologische Nischen entstanden (REUSCH *et al.* 2001b). Laborexperimente haben direkt gezeigt, dass Adaptation an verschiedene Umwelten sowohl in Allopatrie (RICE und HOSTERT 1993) als auch in Sympatrie (RICE und SALT 1990) ein gewisses Maß an reproduktiver Isolation erzeugen kann. Außerdem scheinen ökologische Unterschiede oft eine Quelle divergierender Selektion in der Natur zu sein (RUNDLE und NOSIL 2005). Die Habitate Fluss und See unterscheiden sich ökologisch in vielen Punkten. Deshalb ist auch divergierende Selektion auf verschiedene Merkmale vorstellbar. Denkbar sind zum Beispiel morphologische

oder ethologische Anpassungen an die unterschiedlichen Strömungsverhältnisse, Anpassungen an verschiedene Prädatoren oder Anpassungen an den Erwerb unterschiedlicher Nahrung. Das zeigt, dass es eine Menge vorstellbarer divergierender Anpassungen gibt, die letztendlich auch zu reproduktiver Isolation zwischen den See- und Flusspopulationen geführt haben bzw. diese aufrechterhalten können.

Diese Vielfalt der Mechanismen zeigt sich auch in der Literatur. Wie oben schon erwähnt, gibt es mehrere Systeme, in denen zwei morphologisch und ökologisch divergierende Populationen (Ökotypen) von *G. aculeatus* sym- oder parapatratisch koexistieren, bei denen man verschiedene Formen reproduktiver Isolation gefunden hat (MCKINNON und RUNDLE 2002). Einige dieser Populationen werden als distinkte Arten beschrieben, da sie sich morphologisch, ökologisch und genetisch unterscheiden und starke reproduktive Isolation erkennen lassen (SCHLUTER und MCPHAIL 1992; MCPHAIL 1994). Assortative Paarung wurde zum Beispiel im Zusammenhang mit morphologischen ökologisch selektierten Merkmalen gezeigt. In einem der untersuchten Systeme scheinen Unterschiede in der Körpergröße adaptiv für den Nahrungserwerb in verschiedenen ökologischen Nischen zu sein (SCHLUTER 2001). Zusätzlich findet man hier, dass assortative Paarungen innerhalb der beiden Ökotypen vor allem mit Körpergröße, also einem unter divergierender Selektion stehenden Merkmal, korreliert (MCPHAIL 1994; NAGEL und SCHLUTER 1998).

Prädation kommt in jeder natürlichen Umgebung vor, und Anpassungen daran könnten wichtige Konsequenzen für reproduktive Isolation haben (RUNDLE und NOSIL 2005). Doucette *et al.* (2004) zeigten, dass das Risiko der Prädation zur Evolution separater sympatrischer Formen kleiner Fische, wie *G. aculeatus*, beitragen kann. Das Prädationsrisiko beeinflusst u.a., welche Plätze für den Nestbau bevorzugt werden (CANDOLIN 1998). Einige der

sympatrisch vorkommenden Ökotypen ziehen verschiedene Plätze für den Nestbau vor (MCPHAIL 1994), was zu sexueller Selektion gegen Hybridenmännchen führen kann (VAMOSI und SCHLUTER 1999). Reduzierte Hybridenfitness durch ökologische Bedingungen wurde in einigen Studien gezeigt (SCHLUTER 1995; HATFIELD und SCHLUTER 1999; RUNDLE 2002), was die Möglichkeit für die Entstehung assortativer Paarung durch Verstärkung eröffnet (SCHLUTER 2001).

Unterschiede in der Umgebung können auch zu divergierender sexueller Selektion auf Merkmale der Männchen führen, wenn z.B. verschiedene Balzfärbungen unter wechselnden Lichtbedingungen unterschiedlich auffällig sind (BOUGHMAN 2001). Präzygote Isolation kann auch entstehen, wenn Migranten zwischen Habitaten eine reduzierte Fitness erfahren, da sie schlecht an das fremde Habitat angepasst sind (RUNDLE und NOSIL 2005). Studien an anderen Organismen als *G. aculeatus* zeigen, dass eine solche reduzierte Fitness der Immigranten Genfluss direkt reduzieren kann. Denn dadurch ist die Rate, mit der sich potentielle Paarungspartner aus verschiedenen Populationen treffen, erniedrigt (FUNK 1998; VIA *et al.* 2000; NOSIL 2004; NOSIL *et al.* 2005). Es ist auffällig, dass sich die zwei Ökotypen in vielen dieser Stichlings-Systeme in mehreren Merkmalen unterscheiden (MCKINNON und RUNDLE 2002). Dieses Muster stimmt mit der Annahme überein, dass Artbildung am wahrscheinlichsten ist und sich am schnellsten abspielt, wenn verschiedene Merkmale unter divergierender Selektion stehen (RICE und HOSTERT 1993).

Vermutlich basiert daher auch die Divergenz zwischen den See- und Flusspopulationen von *G. aculeatus* in Schleswig-Holstein auf der Divergenz verschiedener Merkmale und auf mehreren Mechanismen. Es ist beispielsweise gut vorstellbar, dass Unterschiede in der Prädatorenfauna zu Selektion gegen Migranten führen und daher Paarungen zwischen den Populationen nicht

stattfinden. Genauso gut können Unterschiede im Nahrungserwerb zu divergierender Selektion auf bestimmte morphologische Merkmale führen. Diese Divergenz kann dann ebenfalls zu Selektion gegen Migranten oder gegen Hybriden und damit auf assortative Partnerwahl anhand morphologischer, visueller Merkmale führen. In einem anderen System von See- und Flusspopulationen von *G. aculeatus* werden Unterschiede im Nahrungserwerb angenommen: Zooplanktonfresser im offenen Wasser des Sees versus benthische Makroinvertebratenfresser im Fluss. Dieser unterschiedliche Nahrungserwerb wird wahrscheinlich durch Unterschiede im Körperbau erleichtert (HENDRY *et al.* 2002).

Mit Hilfe meiner Arbeit kann ein möglicher Faktor für das Vorhandensein der genetischen Divergenz, nämlich assortative Partnerwahl der Weibchen aufgrund olfaktorischer Signale, zwar nicht sicher ausgeschlossen, aber zumindest als unwahrscheinlich betrachtet werden. Ein nächster Schritt sollte daher darin bestehen, andere mögliche Faktoren zu betrachten. Eine denkbare erste Vorgehensweise wäre, Versuche zur Partnerwahl unter seminaturalen Bedingungen in beiden Habitaten oder in künstlichen Becken durchzuführen, um zu untersuchen, ob überhaupt assortative Partnerwahl auftritt. Eine andere Möglichkeit wäre, die Fitness der Hybriden, die im Labor keine Fitnessverluste zu erfahren scheinen, im Labor und im Freiland zu testen. Dabei könnte man sowohl die Überlebensrate als auch den Paarungserfolg betrachten. Des Weiteren wäre es wünschenswert, potentielle morphologische Unterschiede zwischen den Populationen zu bestimmen. Erste Untersuchungen lassen vermuten, dass es solche Unterschiede gibt (M. KALBE, persönliche Mitteilung). Diese Unterschiede könnte man dann im Zusammenhang mit Anpassungen an u.a. unterschiedliche Prädatoren oder Unterschiede im Nahrungserwerb näher beleuchten.

Wie genetische Divergenz, die zu Artbildung führen kann, entsteht, ist eine der zentralen Fragen der Evolutionsbiologie. Mechanismen, die zu genetischer Divergenz führen, spielen aber nicht nur eine wichtige Rolle für die Theorie der Artbildung, sondern auch für die Arterhaltung. Ein als zwei Arten beschriebenes Paar sympatrischer Populationen von *G. aculeatus* weist in den letzten Jahren ein erhöhtes Maß an Hybridisierung auf. Die beiden distinkten Arten scheinen durch Aufheben der reproduktiven Isolation in einen Hybridschwarm zu kollabieren (GOW *et al.* 2006; TAYLOR *et al.* 2006). Obwohl kein direkter Zusammenhang gezeigt werden konnte, erfolgte der Zusammenbruch des Artenpaares zeitgleich mit dem Einführen einer fremden Fischart in den frühen 1990er Jahren. Die sym- oder parapatrisch koexistierenden Ökotypen von *G. aculeatus* in allen gefunden Systemen sind vor relativ kurzer Zeit entstanden (BELL und FOSTER 1994). Situationen wie die oben beschriebene beleuchten das empfindliche Gleichgewicht zwischen Überdauern und Zusammenbruch von reproduktiven Barrieren zwischen stammesgeschichtlich jungen Arten.

## 5 Zusammenfassung

Zwischen See- und Flusspopulationen von *G. aculeatus* in Schleswig-Holstein findet kein oder kaum Genfluss statt. Da prinzipielle geografische Barrieren fehlen, müssen ökologische oder ethologische Paarungsbarrieren vorhanden sein. Eine Möglichkeit wäre assortative Partnerwahl anhand olfaktorischer Signale durch die Weibchen. Weibliche Stichlinge wählen Paarungspartner u.a. anhand von Signalen über die Kombination der MHC Klasse IIB-Allele der potentiellen Partner. Da sich See- und Flusspopulationen am MHC Klasse IIB unterscheiden, ist es denkbar, dass die Weibchen anhand dieser Unterschiede assortativ paaren.

In dieser Arbeit habe ich das Vorhandensein eines solchen Mechanismus in zwei Experimenten untersucht. In Versuchen zur MHC-abhängigen Partnerwahl zeigten die Weibchen allerdings keine Bevorzugung eines Männchens mit MHC-Genotyp aus dem Ursprungshabitat gegenüber einem Männchen mit MHC-Genotyp aus dem fremden Habitat. Entsprechend zeigten die Weibchen in Versuchen zur habitatabhängigen Partnerwahl keine Präferenz für ein Männchen aus dem Ursprungshabitat gegenüber einem fremden Männchen anhand allgemeiner olfaktorischer Signale. Meine Arbeit lässt daher vermuten, dass die Paarungsbarriere zwischen See- und Flusspopulationen von *G. aculeatus* nicht auf assortativer Partnerwahl der Weibchen aufgrund olfaktorischer Signale basiert. Allerdings kann ich eine olfaktorische Paarungsbarriere auch nicht sicher ausschließen.

Die Habitate See und Fluss unterscheiden sich ökologisch in verschiedenen Punkten. Divergierende Selektion kann daher zu Unterschieden in vielen morphologischen oder ethologischen Merkmalen führen, auf denen die reproduktive Isolation zwischen See- und Flusspopulationen beruhen kann. Ein weiterer Schritt sollte demnach darin bestehen, andere mögliche Faktoren für

das Vorhandensein der genetischen Divergenz zwischen See- und Flusspopulationen von *G. aculeatus* zu betrachten.



## 6 Literatur

- AESCHLIMANN, P. B., M. A. HABERLI, T. B. H. REUSCH, T. BOEHM und M. MILINSKI, 2003 Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **54**: 119-126.
- AMADOU, C., A. KUMANOVICS, E. P. JONES, D. LAMBRACHT-WASHINGTON, M. YOSHINO *et al.*, 1999 The mouse major histocompatibility complex: some assembly required. *Immunological Reviews* **167**: 211-221.
- APANUS, V., D. PENN, P. R. SLEV, L. R. RUFF und W. K. POTTS, 1997 The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology* **17**: 179-224.
- BAKKER, T. C. M., und B. MUNDWILER, 1994 Female mate choice and male red coloration in a natural threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) population. *Behavioral Ecology* **5**: 74-80.
- BEAUCHAMP, G. K., K. YAMAZAKI, J. BARD und E. A. BOYSE, 1988 Prewaning experience in the control of mating preferences by genes in the major histocompatibility complex of the mouse. *Behavior Genetics* **18**: 537-547.
- BECK, S., D. GERAGHTY, H. INOKO, L. ROWEN, B. AGUADO *et al.*, 1999 Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* **401**: 921-923.
- BELL, M. A., und S. A. FOSTER, 1994 *The Evolutionary Ecology of the Threespine Stickleback*. Oxford University Press, Oxford.
- BINZ, T., T. B. H. REUSCH, C. WEDEKIND und M. MILINSKI, 2001 SSCP analysis of MHC class IIB genes in the threespine stickleback. *Journal of Fish Biology* **58**: 887-890.

- BODMER, W. F., 1972 Evolutionary significance of Hl-A system. *Nature* **237**: 139-&.
- BOUGHMAN, J. W., 2001 Divergent sexual selection enhances reproductive isolation in sticklebacks. *Nature* **411**: 944-948.
- BUSH, G. L., 1969 Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of genus *Rhagoletis* (Diptera, Tephritidae). *Evolution* **23**: 237-&.
- CANDOLIN, U., 1998 Reproduction under predation risk and the trade-off between current and future reproduction in the threespine stickleback. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **265**: 1171-1175.
- DEBOER, R. J., und A. S. PERELSON, 1993 How diverse should the immune system be. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **252**: 171-175.
- DOBZHANSKY, T., 1940 Speciation as a stage in evolutionary divergence. *American Naturalist* **74**: 312-321.
- DOBZHANSKY, T., 1970 *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York.
- DOHERTY, P. C., und R. M. ZINKERNAGEL, 1975 Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at H-2 gene complex. *Nature* **256**: 50-52.
- DOUCETTE, L. I., S. SKULASON und S. S. SNORRASON, 2004 Risk of predation as a promoting factor of species divergence in threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 189-203.
- EDWARDS, S. V., und P. W. HEDRICK, 1998 Evolution and ecology of MHC molecules: from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 305-311.

- EGGERT, F., W. MÜLLER-RUCHHOLTZ und R. FERSTL, 1998 Olfactory cues associated with the major histocompatibility complex. *Genetica* **104**: 191-197.
- FLAJNIK, M. F., und M. KASAHARA, 2001 Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity* **15**: 351-362.
- FOSTER, S. A., 1995 Understanding the evolution of behavior in threespine stickleback: the value of geographic variation. *Behaviour* **132**: 1107-1129.
- FUNK, D. J., 1998 Isolating a role for natural selection in speciation: host adaptation and sexual isolation in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution* **52**: 1744-1759.
- GOW, J. L., C. L. PEICHEL und E. B. TAYLOR, 2006 Contrasting hybridization rates between sympatric threespine sticklebacks highlight the fragility of reproductive barriers between evolutionary young species. *Molecular Ecology* **15**: 739-752.
- GUNTHER, E., und L. WALTER, 2001 The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics* **53**: 520-542.
- HABERLI, M. A., und P. B. AESCHLIMANN, 2004 Male traits influence odour-based mate choice in the threespine stickleback. *Journal of Fish Biology* **64**: 702-710.
- HAGEN, D. W., und G. E. E. MOODIE, 1979 Polymorphism for breeding colors in *Gasterosteus aculeatus* .1. Their genetics and geographic distribution. *Evolution* **33**: 641-648.
- HATFIELD, T., und D. SCHLUTER, 1999 Ecological speciation in sticklebacks: environment-dependent hybrid fitness. *Evolution* **53**: 866-873.

- HENDRY, A. P., E. B. TAYLOR und J. D. MCPHAIL, 2002 Adaptive divergence and the balance between selection and gene flow: lake and stream stickleback in the misty system. *Evolution* **56**: 1199-1216.
- HUGHES, A. L., und M. NEI, 1988 Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class-I loci reveals overdominant selection. *Nature* **335**: 167-170.
- JAKOBSSON, S., B. BORG, C. HAUX und S. J. HYLLNER, 1999 An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein: the nest building glue from male threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**: 79-85.
- JANEWAY, C., TRAVERS P, 1997 *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- KALBE, M., K. M. WEGNER und T. B. H. REUSCH, 2002 Dispersion patterns of parasites in 0+ year threespine sticklebacks: a cross population comparison. *Journal of Fish Biology* **60**: 1529-1542.
- KAUFMAN, J., H. VOLK und H. J. WALLNY, 1995 A minimal-essential-MHC and an unrecognized-MHC - 2 extremes in selection for polymorphism. *Immunological Reviews* **143**: 63-88.
- KURTZ, J., M. KALBE, P. B. AESCHLIMANN, M. A. HABERLI, K. M. WEGNER *et al.*, 2004 Major histocompatibility complex diversity influences parasite resistance and innate immunity in sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 197-204.
- LAVIN, P. A., und J. D. MCPHAIL, 1993 Parapatric lake and stream sticklebacks on northern Vancouver Island - disjunct distribution or parallel evolution. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **71**: 11-17.

- MANNING, C. J., E. K. WAKELAND und W. K. POTTS, 1992 Communal nesting patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* **360**: 581-583.
- MAYNARD SMITH, J., 1966 Sympatric speciation. *American Naturalist* **100**: 637-650.
- MAYR, E., 1942 *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- MAYR, E., 1963 *Animal Species and Evolution*. Belknap Press.
- MCKINNON, J. S., und H. D. RUNDLE, 2002 Speciation in nature: the threespine stickleback model systems. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 480-488.
- MCPHAIL, J. D., 1992 Ecology and evolution of sympatric sticklebacks (*Gasterosteus*) - evidence for a species-pair in Paxton Lake, Texada Island, British-Columbia. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **70**: 361-369.
- MCPHAIL, J. D., 1994 Speciation and the evolution of reproductive isolation in the sticklebacks (*Gasterosteus*) of south-western British Columbia, pp. 399-437 in *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*, edited by M. P. BELL and S. A. FOSTER. Oxford University Press, Oxford.
- MILINSKI, M., 2003 The function of mate choice in sticklebacks: optimizing MHC genetics. *Journal of Fish Biology* **63**: 1-16.
- MILINSKI, M., und T. C. M. BAKKER, 1990 Female sticklebacks use male coloration in mate choice and hence avoid parasitized males. *Nature* **344**: 330-333.
- MILINSKI, M., S. GRIFFITHS, K. M. WEGNER, T. B. H. REUSCH, A. HAAS-ASSENBAUM *et al.*, 2005 Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America **102**: 4414-4418.
- NAGEL, L., und D. SCHLUTER, 1998 Body size, natural selection, and speciation in sticklebacks. *Evolution* **52**: 209-218.
- NOSIL, P., 2004 Reproductive isolation caused by visual predation on migrants between divergent environments. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 1521-1528.
- NOSIL, P., T. H. VINES und D. J. FUNK, 2005 Perspective: reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution* **59**: 705-719.
- NOSSAL, G. J. V., 1994 Negative selection of lymphocytes. *Cell* **76**: 229-239.
- NOWAK, M. A., K. TARCZYHORNOCH und J. M. AUSTYN, 1992 The optimal number of major histocompatibility complex-molecules in an individual. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 10896-10899.
- OLSEN, K. H., M. GRAHN, J. LOHM und A. LANGEFORS, 1998 MHC and kin discrimination in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Animal Behaviour* **56**: 319-327.
- PEICHEL, C. L., K. S. NERENG, K. A. OHGI, B. L. E. COLE, P. F. COLOSIMO *et al.*, 2001 The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species. *Nature* **414**: 901-905.
- PENN, D., und W. POTTS, 1998 How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences? *Advances in Immunology*, Vol 69 **69**: 411-436.
- PENN, D. J., und W. K. POTTS, 1999 The evolution of mating preferences and major histocompatibility complex genes. *American Naturalist* **153**: 145-164.

- PIERTNEY, S. B., und M. K. OLIVER, 2006 The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* **96**: 7-21.
- POTTS, W. K., C. J. MANNING und E. K. WAKELAND, 1991 Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. *Nature* **352**: 619-621.
- POTTS, W. K., und E. K. WAKELAND, 1993 Evolution of MHC genetic diversity - a tale of incest, pestilence and sexual preference. *Trends in Genetics* **9**: 408-412.
- RAUCH, G., 2006 The role of parasite diversity in the life of threespine sticklebacks. PhD. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel
- REUSCH, T. B. H., M. A. HABERLI, P. B. AESCHLIMANN und M. MILINSKI, 2001a Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature* **414**: 300-302.
- REUSCH, T. B. H., H. SCHASCHL und K. M. WEGNER, 2004 Recent duplication and inter-locus gene conversion in major histocompatibility class II genes in a teleost, the threespine stickleback. *Immunogenetics* **56**: 427-437.
- REUSCH, T. B. H., K. M. WEGNER und M. KALBE, 2001b Rapid genetic divergence in postglacial populations of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): the role of habitat type, drainage and geographical proximity. *Molecular Ecology* **10**: 2435-2445.
- RICE, W. R., und E. E. HOSTERT, 1993 Laboratory experiments on speciation - what have we learned in 40 years. *Evolution* **47**: 1637-1653.
- RICE, W. R., und G. W. SALT, 1990 The evolution of reproductive isolation as a correlated character under sympatric conditions - experimental-evidence. *Evolution* **44**: 1140-1152.

- ROWLAND, J. R., 1994 Proximate determinants of stickleback behaviour: an evolutionary perspective, pp. 297-344 in *The Evolutionary Ecology of the Threespine Stickleback*, edited by M. A. BELL and S. A. FOSTER. Oxford University Press, Oxford.
- RUNDLE, H. D., 2002 A test of ecologically dependent postmating isolation between sympatric sticklebacks. *Evolution* **56**: 322-329.
- RUNDLE, H. D., und P. NOSIL, 2005 Ecological speciation. *Ecology Letters* **8**: 336-352.
- SATO, A., F. FIGUEROA, B. W. MURRAY, E. MALAGA-TRILLO, Z. ZALESKA-RUTCZYNSKA *et al.*, 2000 Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. *Immunogenetics* **51**: 108-116.
- SATO, A., F. FIGUEROA, C. O'HUIGIN, N. STECK und J. KLEIN, 1998 Cloning of major histocompatibility complex (MHC) genes from threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **7**: 221-231.
- SCHLUTER, D., 1995 Adaptive radiation in sticklebacks - trade-offs in feeding performance and growth. *Ecology* **76**: 82-90.
- SCHLUTER, D., 1996 Ecological speciation in postglacial fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **351**: 807-814.
- SCHLUTER, D., 2001 Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 372-380.
- SCHLUTER, D., und J. D. MCPHAIL, 1992 Ecological character displacement and speciation in sticklebacks. *American Naturalist* **140**: 85-108.



- SEEHAUSEN, O., J. J. M. VANALPHEN und F. WITTE, 1997 Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* **277**: 1808-1811.
- TAYLOR, E. B., J. W. BOUGHMAN, M. GROENENBOOM, M. SNIATYNSKI, D. SCHLUTER *et al.*, 2006 Speciation in reverse: morphological and genetic evidence of the collapse of a three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) species pair. *Molecular Ecology* **15**: 343-355.
- THOMPSON, C. E., E. B. TAYLOR und J. D. MCPHAIL, 1997 Parallel evolution of lake-stream pairs of threespine sticklebacks (*Gasterosteus*) inferred from mitochondrial dna variation. *Evolution* **51**: 1955-1965.
- TURELLI, M., N. H. BARTON und J. A. COYNE, 2001 Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 330-343.
- VAMOSI, S. M., und D. SCHLUTER, 1999 Sexual selection against hybrids between sympatric stickleback species: evidence from a field experiment. *Evolution* **53**: 874-879.
- VIA, S., 2001 Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 381-390.
- VIA, S., A. C. BOUCK und S. SKILLMAN, 2000 Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution* **54**: 1626-1637.
- VINES, T. H., und D. SCHLUTER, 2005 Strong assortative mating between allopatric sticklebacks as a by-product of adaptation to different environments. *Proceedings: Biological Sciences*.
- VONBOEHMER, H., 1994 Positive selection of lymphocytes. *Cell* **76**: 219-228.
- WEGNER, K. M., 2004 Major histocompatibility genes, polymorphism and balancing selection - the case of parasites and sticklebacks. PhD.

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Christian-Albrechts-Universität, Kiel

WEGNER, K. M., M. KALBE, J. KURTZ, T. B. H. REUSCH und M. MILINSKI, 2003a Parasite selection for immunogenetic optimality. *Science* **301**: 1343-1343.

WEGNER, K. M., T. B. H. REUSCH und M. KALBE, 2003b Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 224-232.

WOOTTON, R. J., 1976 *The biology of the sticklebacks*. Academic Press, London.

YAMAZAKI, K., G. K. BEAUCHAMP, D. KUPNIEWSKI, J. BARD, L. THOMAS *et al.*, 1988 Familial imprinting determines H-2 selective mating preferences. *Science* **240**: 1331-1332.

---



## 7 Danksagung

In den Zeilen dieser Arbeit stecken Unterstützung und Begleitung von vielen Menschen, und bei einigen von ihnen möchte ich mich hier bedanken:

Mein Dank gilt Gisep Rauch dafür, dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und für seine positive Einstellung und aufbauenden Worte; Thorsten Reusch für die Betreuung, begleitende Unterstützung und das konstruktive (und schnelle) Korrekturlesen; Günther B. Hartl für die Übernahme der offiziellen Betreuung und damit für die akademische Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können; Manfred Milinski dafür, dass ich die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe schreiben konnte, und für geteiltes Know-how; Gerhard Augustin und Daniel Martens für erfolgreiche Jagd auf Stichlinge und Beckenschleppen; ihnen und Monika Wulf dafür, dass sie meinen Fischen das Überleben überhaupt erst möglich machten; Ralf Sommerfeld für ein tolles Programm, Spaß im Büro und dafür, dass ich mit gutem Gewissen in Urlaub fahren konnte. Sybille Liedtke, Anja Hasselmeyer und Silke Carstensen für ihre Hilfe und Geduld im Labor, und Ilka Dankert für die Rettung einer DNA-Extraktion; Derk Wachsmuth für Hilfe beim Umgang mit unberechenbaren Lebewesen wie Computern und Druckern; Martin Kalbe für überlassene Fische und viele beantwortete Fragen; Dietmar Lemcke für alles rund um die Technik; Sascha Hibbeler und Nina Bergmann für das Ertragen von Panikattacken und Ablenkung und Sascha für die harte Korrektur; Katharina Oetjen für ein Überleben der Diplomzeit ohne (hoffentlich) größere Schäden; meiner Familie für zweifelsfreie Unterstützung und offene Ohren; meiner Mutter für die neue Rechtschreibung; Sebastian Schäfer fürs Auffangen, Aufbauen und Immer-für-mich-da-sein.

---

## 8 Stellungnahme

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mit der Einstellung dieser Arbeit in die Fachbibliothek des Biozentrums sowie die Zentralbibliothek der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bin ich einverstanden.

Kiel, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Birte Seiffert