

**Fitness hybrider Genotypen in sekundären Kontaktzonen
des Rheinsystems bei Groppen (*Cottus*, Pisces)**



Diplomarbeit

vorgelegt von Jendrik Schroeder

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

erstellt am Max-Planck-Institut für Evolutionsbiologie

Plön

Oktober 2009

Betreuender Gutachter: Prof. Diethard Tautz
Max Planck Institut für Evolutionsbiologie
August-Thienemann-Str. 2

Zweiter Gutachter: Prof. Günther Hartl
Institut für Haustierkunde
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Am Botanischen Garten 1-9

Widmung

... meinem Vater, meiner Mutter

und Julia

Titelbild aus www.vol.be.ch/site/fischerei_angelfischerei_gewaesser_fischarten_groppe.jpg

Inhalt

1. Einleitung	6
1.1 Untersuchungsorganismus: Evolution, Genetik und Ökologie	6
1.2 Untersuchungssystem: Entstehung, Dynamik und Schicksal	10
1.3 Fragestellung: Introgression, reproduktive Isolation und Fitness	12
2. Material & Methoden	16
2.1 Single Nucleotide Polymorphisms SNPs	16
2.2 Probennahme	19
2.2.1 Probennahmekonzept	19
2.2.2 Gebiet der Probennahme	19
2.2.3 Orte der Probennahme	20
2.3 Laborarbeiten	21
2.3.1 DNA Salzextraktion	21
2.3.2 DNA Messung	21
2.3.3 Aufreinigung der Proben und DNA Fällung	22
2.3.4 SNaPshot Methode	22
2.4.1 GENEPOP	25
2.4.2 STRUCTURE	25
2.4.3 INTROGRESS	26
3. Ergebnisse	30
3.1 GENEPOP	30
3.2 STRUCTURE	30
3.3 INTROGRESS	33
4. Diskussion	36
5. Zusammenfassung	41
6. Literaturverzeichnis	42
7. Danksagung	48
8. Anhang	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1 Untersuchungsorganismus: Evolution, Genetik und Ökologie

Bei denen in dieser Arbeit untersuchten Organismen handelt es sich um Süßwasserfische der Gattung *Cottus*. In Europa sind auf Basis von morphologischen und molekularen Daten 15 Spezies beschrieben worden (Freyhof *et al.* 2005), von denen einige in einem zuvor unaufgelösten „*C.gobio* Komplex“ (Kottelat, 1997) zusammengefasst waren. Erste Anzeichen dafür, dass eine hohe genetische Differenzierung innerhalb dieses Komplexes besteht, lieferten Allozym Daten (Riffel & Schreiber 1995, Hänfling & Brandl 1998). Später zeigten Studien mit mitochondrialen Haplotypen (Engelbrecht *et al.* 2000) und Mikrosatelliten (Hänfling *et al.* 2002, Knapen *et al.* 2003) übereinstimmend das Bestehen mehrerer genetisch distinkter Linien, von denen die ältesten seit 3 Millionen Jahren voneinander getrennt sind.

Die Besiedlung Europas durch Süßwasserfische der Gattung *Cottus* erfolgte wahrscheinlich im späten Pliozän (5,33 – 2,58 Mio. J.) durch Populationen der Art *C. gobio*. Die Gründerpopulation entstammte vermutlich dem Paratethys, dem europäischen Teil des erdgeschichtlichen Ozeans Tethys, auf den das heutige Kaspische und das Schwarze Meer zurückgehen. Die Besiedlung Zentral-Europas erfolgte anscheinend über die damalige niedere Donau. Während des späten Pliozäns muss eine der zentraleuropäischen Populationen die Nordsee erreicht haben. Von dort war die Kolonisierung der in den Atlantik mündenden Flüsse über die Küsten möglich (Engelbrecht *et al.* 2000).

Die Vergletscherungen während des Pleistozäns (2,58 Mio. J. – 10.000 v.Chr.) sind im Allgemeinen als evolutionsgeschichtliche Ereignisse anerkannt, welche in vielen Fällen zur Diversifikation von Taxa geführt haben (Avice 2000, Hewitt 2000). Thienemann (1950) stellte die Hypothese auf, dass Groppen in Zentraleuropa während der Eiszeiten existiert haben und sogar in Permafrostregionen überlebt haben. Er klassifizierte *Cottus gobio* als eine der Spezies, die sich in Interglazialen in Bergrefugien zurückziehen und während der Eiszeit bis an den Rand der Gletscher ausdehnen. Es wird davon ausgegangen, dass mehrere eiszeitliche Refugien in Zentral- und Westeuropa bestanden haben. Im Speziellen werden der niedere Rhein, das Scheldt System und Cornwall in Südengland diskutiert (Hänfling *et al.* 2002).

Aufgrund molekularer Daten besteht weitestgehend Einigkeit darin, dass die *Cottus* Linien schon vor der letzten Eiszeit (Würm) bestanden haben müssen (Engelbrecht *et al.* 2000, Hänfling *et al.* 2002, Volckaert 2002).

Bei einer systematischen Studie von Nukleotid Diversitäten unterschiedlicher Fischpopulationen in vergletscherten und nicht vergletscherten Regionen konnte gezeigt werden, dass Populationen in vergletscherten Regionen deutlich geringere Nukleotid Diversitäten aufweisen (Bernatchez & Wilson 1998). Die Logik dahinter ist, dass die Besiedlung von wieder eisfrei gewordenen Habitaten durch Gründerpopulationen stattfindet, die im Vergleich zur Ursprungspopulation aus einer deutlich geringeren Anzahl von Individuen bestehen und deshalb eine verringerte Nukleotid Diversität zeigen. Die von Engelbrecht *et al.* 2000 für die unterschiedlichen Linien gefundenen Daten stehen mit diesem Befund im Einklang. Die Verwendung der Nukleotid Diversität als Schätzer für eine Reduktion der Populationsgröße und zum Auffinden von neu besiedelten Habitaten ist jedoch nicht ohne Widersprüche (Widmer & Lexer, 2001), denn in Populationen von *Fagus sylvatica* konnte für wiederbesiedelte Regionen zwar eine Reduktion des Allelreichtums aber keine Reduktion der Nukleotid Diversität festgestellt werden. Die Autoren plädieren deshalb dafür, stets verschiedene Schätzer zu wählen, um die genetische Diversität zu ermitteln und die eventuell entstehenden Widersprüche sorgfältig zu diskutieren.

Gründe für die starke genetische Differenzierung der Groppen sind neben der Paleoklimatologie im Wesentlichen in der Ökologie zu finden. Groppen bewohnen kleinere Bäche und Flüsse, die kaltes sauerstoffreiches Wasser führen und einen Untergrund aus Kies und Stein aufweisen. Diese ökologischen Ansprüche machen es ihnen in der Regel unmöglich, größere Flüsse zu besiedeln. Innerhalb ihres Habitats treten Sie oft in einer sehr geklumpten Verteilung auf. Nicht nur im europäischen Vergleich, sondern auch innerhalb von Systemen mit kleineren Flüssen und Bächen wie der Scheldt, zeigen Populationen eine starke genetische Differenzierung (Knapen *et al.* 2002). Es gibt bisher keine Studien, die eine Verbreitung von Larven über längere Distanz belegen würden. Diese Gegebenheiten erklären, warum die Verbreitung von Groppen innerhalb und zwischen Fluss-Bach-Systemen gering ist und warum eine starke genetische Differenzierung zwischen Populationen vorhanden ist. Auch innerhalb des Rheins konnte sich trotz Vereinigung des oberen und unteren Flusslaufs durch eine Flussanzapfung vor 1 Million Jahren kein homogenisierter Genpool ausbilden (Engelbrecht *et al.* 2000). Eine Ausnahme zur im Allgemeinen geringen Verbreitungsfähigkeit der Groppen ist eine invasive *Cottus* Linie, die innerhalb der letzten 20 Jahre den niederen Rhein und die in ihn mündenden Flüsse besiedelt hat. Auf Basis von mitochondrialen Haplotypen und Einzel-nukleotidpolymorphismen wurde festgestellt, dass es sich bei den Individuen dieser Linie um Hybriden zwischen *C. perifretum* aus dem Scheldt- und *C. rhenanus* aus dem Rhein System handelt (Nolte *et al.* 2005b).

Einleitung



Abb. 1 *C. perifretum* aus Nolte *et al.* 2005c

Bei *C. perifretum* handelt es sich um eine kompaktere Spezies, deren Haut eine Stachelbeschuppung aufweist (Abb.1). Die Art *C. rhenanus* ist im Gegensatz dazu deutlich schlanker und ihre Haut zeigt keine Stachelschuppen (Abb.2).



Abb. 2 *C. rhenanus* aus Nolte *et al.* 2005c.

Die invasive Linie unterscheidet sich von *C. rhenanus* durch einen höheren Rumpf, einen längeren Schwanzstiel, einen kürzeren Körper und einen relativ großen Kopf und von *C. perifretum* durch einen weniger stark ausgebildeten hinteren Rumpf. Eine Gemeinsamkeit mit *C. perifretum* ist das Vorhandensein von Stachelschuppen. Die Merkmale der invasiven Linie bleiben auch bei der Aufzucht im Aquarium bestehen, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei der Unterschiedlichkeit der Merkmale nicht um phänotypische Plastizität handelt. Insgesamt betrachtet ähnelt die invasive Linie in der Morphologie stark *C. perifretum*, weshalb Sie formal auch unter diesem Namen geführt wird. Anscheinend verfügt die invasive Linie über Anpassungen, die es ihr ermöglichen, große Flüsse zu besiedeln. Köhler *et al.* (1993) schlug zwei verschiedene Möglichkeiten zu Ursprung und Weg der Invasion vor. Die erste Möglichkeit besteht darin, dass Groppen im unteren Rhein fortbestanden haben und mit der Verbesserung der Wasserqualität in den 80er Jahren den Rhein stromaufwärts erneut besiedelt haben. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass sich die Groppen stromabwärts ausgehend von ihren Ursprungspopulationen in den Bächen den niederen Rhein neu erschlossen haben. Eine dritte Möglichkeit, vorgeschlagen von Nolte *et al.* (2005b), ist, dass die Invasion aus dem Scheldt System, das vor ca. 200 Jahren durch Kanalbauten mit dem Rhein System verbunden wurde, erfolgte.

Durch die Verbindung dieser zwei Systeme war es möglich geworden, dass *C. perifretum* und *C. rhenanus*, die zuvor für 1-2 Millionen Jahre als distinkte evolutionäre Linien bestanden haben, wieder aufeinander treffen konnten. In diesem Fall kam es offensichtlich zur Hybridisierung dieser Linien, was klar aus dem Aufbau des Genoms der invasiven Linie hervorgeht, das ein Mosaik der beiden Spezies darstellt (Stemshorn *et al.* 2005b).

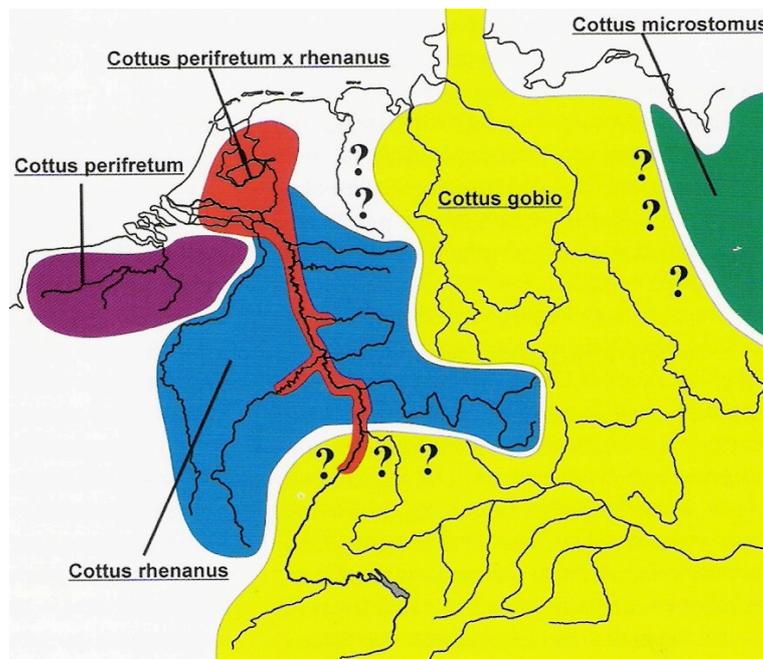


Abb. 3 Verbreitung verschiedener Cottus Spezies über Mitteleuropa: *C. rhenanus* (blau), *C. perifretum* (violett), invasive Linie (rot), *C. gobio* (gelb), *C. microstomus* (grün). Aus Nolte *et al.* 2005c.

Im Scheldt System konnten bisher keine Populationen der invasiven Linie gefunden werden, was dafür spricht, dass Populationen von *C. perifretum* aus dem Scheldt System über die Kanäle in das Rhein System migriert sind und es dort zur Hybridisierung kam. Andererseits kann es auch sein, dass sich Populationen von *C. perifretum* aus dem Scheldt System entlang des Rheins ausgebreitet haben und an der Invasionsfront mit Populationen von *C. rhenanus* vermischt haben und sich auf diese Art ein für die invasive Linie charakteristischer Genpool geformt hat. Allerdings ist dieses Szenario in Anbetracht der evolutionär gesehen kleinen Zeitspanne von nur 20 Jahren nicht sehr wahrscheinlich (Nolte *et al.* 2005b). Auch wenn der Genpool der invasiven Linie wahrscheinlich nicht hauptsächlich während der Invasion des Rheins durch Hybridisierung mit *C. rhenanus* Populationen geformt wurde, kommt es doch zu einem sekundären Kontakt mit *C. rhenanus* Populationen an den Mündungen von Bächen in kleinere Flüsse. Nolte *et al.* (2006) dokumentierte mehrere solcher sekundärer Kontaktzonen innerhalb des Rhein Systems und stellte fest, dass es sich dabei um Hybridzonen handelt. In der vorliegenden Arbeit werden zwei dieser Hybridzonen weiter untersucht.

1.2 Untersuchungssystem: Entstehung, Dynamik und Schicksal

Eine Konsensdefinition für Hybridzonen lautet folgendermaßen: „Hybridzonen sind Regionen, in denen genetisch distinkte Populationen aufeinander treffen, sich verpaaren und Hybride erzeugen“ (Barton & Hewitt 1985). Hybridzonen sind oft im Verhältnis zur Verbreitung der elterlichen Spezies relativ schmal. Zwei Faktoren, die die Breite einer Hybridzone bestimmen, sind die Ausbreitungsrate und die Populationsdichte der beteiligten Arten. Die in Barton und Hewitt (1985) resümierten Hybridzonen reichen in der Breite von ca. 20 m für den Grashüpfer *Warramaba viatica* bis zu 150 km für die Hirschmaus *Peromyscus californicus*. Hybridzonen werden oft über das Vorhandensein von parallelen Klinen erkannt (Harrison 1993). Klinen sind Merkmalsgradienten (Huxley 1938). Klinen und Hybridzonen sind jedoch keine synonymen Begriffe (Endler 1977), denn es kann durchaus sein, dass sich Populationen einer oder mehrerer Spezies in Bezug auf ein oder mehrere Merkmale graduell entlang einer Kline unterscheiden, ohne dass es zur Hybridisierung unter ihnen kommt.

Nach Moore (1977) sind Hybridzonen oft sehr schmal, da Übergänge zwischen zwei Habitaten oft relativ abrupt verlaufen können. Innerhalb der Übergangszonen kommt es aufgrund eines steilen ökologischen Gradienten zu starker Selektion gegen elterliche Phäno- und Genotypen, während Hybride in diesem Bereich eine erhöhte Fitness zeigen. Diese Erklärung für das Bestehen von Hybridzonen wird als Ökotonen Modell oder auch „Begrenzte Hybriden Überlegenheit“ bezeichnet. Eine andere Erklärung für die Existenz einer Hybridzone liefert das Spannungszonen Modell nach Barton (1979), bei dem die Hybridzone durch ein Zusammenspiel zwischen Ausbreitung elterlicher Genotypen und Selektion gegen Hybride geformt wird. In diesem Fall handelt es sich um endogene Selektion aufgrund von genetischen Unverträglichkeiten in den Genotypen der Hybriden. Während im ersten Modell die Lage der Hybridzone an einen Umweltgradienten gekoppelt ist, ist letzteres davon unabhängig. Im Spannungszonen Modell unterliegt die Dynamik der Hybridzone hingegen weiteren Faktoren wie der ungleichen Selektion auf elterliche Genotypen und verschiedenen Effekten der Populationsdichte. Je nachdem wie stark sich die bestimmenden Faktoren ändern, kommt es zur Bewegung der Hybridzone. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass sich ein Gleichgewicht an einer lokalen Barriere einstellt, d.h. unter Umständen kann auch hier, wenn auch in anderer Weise, die Umwelt von Bedeutung sein.

Für die Entstehung von Hybridzonen sind zwei Szenarien denkbar. Zum einen kann es sein, dass Populationen, welche sich in Allopatrie differenziert haben, sekundär wieder in Kontakt gekommen sind (Mayr 1942). Zum anderen ist es möglich, dass sich Populationen durch räumlich variierende Selektionsdrücke *in situ* differenzieren können. Ein weiterer Faktor, der zur Differenzierung *in situ* führen kann, ist die assortative Verpaarung, die für Modelle der sympatrischen Speziation essentiell ist (Dieckmann *et al.* 2004). Es wird davon ausgegangen, dass die Mehrzahl der heute existierenden Hybridzonen auf die Vereisungszyklen und anschließende Populationsexpansion während des Pleistozäns zurückzuführen sind (Hewitt 1999). Regionen, in denen Kontaktzonen postglazialen Ursprungs auftreten, sind für die Groppen neben dem niederen Rhein auch in Finnland und im nördlichen Schweden zu finden. Kontula und Väinölä (2004) beschreiben derartige Kontaktzonen zwischen *C. gobio* und *C. kosshewnikowi* im Zusammenhang der geologischen Entwicklung der Ostsee.

Hybridzonen sind dynamische Systeme, deren „Schicksal“ verschieden verlaufen kann. Eine erste Möglichkeit besteht darin, dass die zuvor differenzierten Populationen wieder zu einer, dann eventuell für einige Merkmale polymorphen Spezies, verschmelzen. Dies kann nur unter der Bedingung funktionieren, dass sich nicht bereits eine starke Selektion gegen Hybride herausgebildet hat. Bei der zweiten Möglichkeit kann es zum Aussterben von einer der elterlichen Spezies kommen, da beide die gleiche ökologische Nische beanspruchen und die eine der anderen überlegen ist. Eine dritte Möglichkeit, die unter dem Begriff Reinforcement bekannt geworden ist, besteht darin, dass zwei Spezies sekundär zusammentreffen, sich ihre Genome allerdings als zu differenziert herausstellen, um einen harmonischen Genotyp zu formen. Es kommt durch Selektion gegen Hybride zur Entwicklung von effektiveren prezygotischen Fortpflanzungsbarrieren und eventuell zur Bildung von zwei „guten“ Spezies, d.h. solchen, die hinreichend gut reproduktiv voneinander isoliert sind. Der Prozess kann als adaptive Speziation bezeichnet werden, da prezygotische Isolation durch Anpassung als Folge von Selektion gegen Hybride entsteht (Moore 1984). Eine vierte Möglichkeit ist, dass durch Hybridisierung zuerst ein „Hybridswarm“ entsteht, der sich dann aber weiter zu einer völlig neuen Spezies differenziert. Während unter Botanikern Hybridisierung als Mechanismus für die Artbildung weitestgehend anerkannt ist, betrachten Zoologen Hybridzonen eher als „Fenster auf den evolutionären Prozess“ oder als „Natürliche Laboratorien“, in denen Artbildung und Anpassung untersucht werden können.

1.3 Fragestellung: Introgression, reproduktive Isolation und Fitness

Unter Introgression versteht man das Wandern von Genen von einer Spezies in eine andere Spezies durch Hybridisierung und Rückkreuzung. Gene, die sich in dem genetischen Hintergrund einer Spezies und/oder einem Habitat als vorteilhaft erweisen, d.h. die Fitness des Trägers erhöhen, können sich in dem genetischen Hintergrund einer anderen Spezies und/oder einem anderen Habitat als nachteilig erweisen, d.h. die Fitness des Trägers verringern. Solche Gene tragen zur reproduktiven Isolation bei, und ihre Introgression sollte mit der Zeit durch die natürliche Selektion verhindert werden. Gene, die der Anpassung in beiden genetischen Hintergründen und Habitaten dienen, sollten frei über die Hybridzone wandern können, da Sie von der natürlichen Selektion begünstigt werden.

Die Erforschung der genetischen Basis für reproduktive Isolation erfolgte bislang über die Erstellung von geographischen Klinien (Teeter *et al.* 2008). Bei diesen werden Allelfrequenzen entlang einer die Hybridzone umfassenden Distanz aufgetragen. Je schmaler eine Kline, desto stärker ist die auf einen Marker wirkende Selektion und desto wahrscheinlicher trägt die entsprechende Region zur reproduktiven Isolation bei.

In einer Vorstudie zu der vorliegenden Arbeit untersuchten Nolte *et al.* (2006) zwei in den frühen 90er Jahren entstandenen Cottus Hybridzonen mit 45 Mikrosatelliten. Für beide Zonen ergaben sich steile multilokus Klinien und es stellte sich heraus, dass die Hybridzonen an den Übergang von einem Fluss- in ein Bachhabitat gekoppelt sind. Die Breite dieser Zonen erwies sich als deutlich schmaler, als ausgehend von jährlichen Ausbreitungsraten zu erwarten wäre. Innerhalb der Zonen konnten verschiedene Hybridklassen, d.h. elterliche Rückkreuzungen, F1-Hybride und andere Paarungskombinationen Fx detektiert werden. Die Allgemeine Schlussfolgerung aufgrund dieser Befunde war, dass die Hybridzonen durch starke exogene Selektion geformt werden und weitestgehend einem ökotonen Modell entsprechen. Innerhalb dieser Studie ging aus einer Clusteranalyse mit dem Programm STRUCTURE für die Anzahl vermeintlicher Populationen ein Wert von drei hervor. Als Cluster wurden zwei *C. rhenanus* Populationen aus dem Bach Bröl und dem Bach Naaf und eine Population der invasiven Linie aus dem Fluss Sieg detektiert. In einer Folgestudie untersuchten Nolte *et al.* (2009) Muster der Introgression mit genomischen Klinien. Während bei geographischen Klinien Allelfrequenzen gegen geographische Distanzen aufgetragen werden, werden bei genomischen Klinien Wahrscheinlichkeiten für heterozygote und homozygote Genotypen an einem Locus für ein neutrales Modell genomweiter Hybridisierung berechnet und entlang eines multilokus Hybridindex aufgetragen (Gompert & Burkle 2009).

Anhand von genotypisierten Individuen lässt sich feststellen, ob Genotypen im Vergleich zu einem neutralen Modell genomweiter Hybridisierung an einem Locus über- oder unterrepräsentiert sind. Abweichungen von einem neutralen Modell werden als verschiedene Muster der Introgression wie z.B. positive Selektion oder Unterdominanz klassifiziert. Durchgeführt wurde die Studie mit 480 Individuen und 168 Mikrosatelliten. Ungefähr 50 % der Loci zeigten signifikante Abweichungen von einem neutralen Modell genomweiter Hybridisierung. Das Muster mit der größten Prävalenz war die Unterdominanz, die einem Defizit von interspezifischen heterozygoten Genotypen entspricht. Diesem Muster folgten 21 % der Loci in der Naaf und 26 % der Loci in der Bröl Zone. Nach diesem Ergebnis scheint Unterdominanz wesentlich zur reproduktiven Isolation der beiden *Cottus* Linien beizutragen. Es muss sich dabei nicht unbedingt um intrinsische genetische Inkompatibilitäten, z.B. verursacht durch die Fixierung unterschiedlicher Chromosomenaberrationen in den beteiligten Linien, handeln. Heterozygote Genotypen können innerhalb der Hybridzone durchaus lebensfähig und fruchtbar sein, aber in einem anderen Habitat können Allele aus einem anderen genetischen Hintergrund zu einer verminderten Fitness führen. Eine Erklärung für den scheinbaren Widerspruch, dass Hybride lebensfähig sind, aber trotzdem Unterdominanz wesentlich zur reproduktiven Isolation beiträgt, ist, dass die Unterdominanz nur habitatspezifisch zur Ausprägung kommt. Eine andere Erklärung für ein Heterozygotendefizit besteht in der Existenz von Nullallelen, welche durch fehlerhafte Amplifikation verursacht werden.

Ein weiterer wichtiger Befund der Studie war, dass wenig Übereinstimmung zwischen den Hybridzonen hinsichtlich der Introgressionsmuster besteht. Zum einen sind es für beide Zonen nicht immer die gleichen Loci, die sich in einer Musterkategorie wieder finden und zum anderen, selbst wenn es sich dabei um die gleichen Loci handelt, ist dies in den meisten Fällen auch durch reinen Zufall möglich. Eine Ausnahme stellen Allele der invasiven Population dar, welche für 11 % der Loci in der Bröl und 6 % der Loci in der Naaf mehr als per Zufall erwartet in den genetischen Hintergrund der *C. rhenanus* Populationen introgressieren. Ein wesentliches Ergebnis dieser Studie war, dass neben exogener auch endogene Selektion für die Formierung der *Cottus* Hybridzonen von Bedeutung ist. Während in der ersten Studie eine Multilocus-Analyse zur Beschreibung der Hybridzonen durchgeführt wurde, ging es in der Folgestudie darum, einzelne Loci hinsichtlich ihrer genotypspezifischen Introgressionsmuster zu untersuchen, um die Basis reproduktiver Isolation und adaptiver Introgression besser zu verstehen.

Einleitung

Da es in der vorliegenden Arbeit um die Fitness hybrider Genotypen geht, soll in diesem Abschnitt der Begriff Fitness kurz rekapituliert werden. Fitness ist „die Fähigkeit eines Individuums relativ zu anderen Individuen derselben Spezies lebensfähigen Nachwuchs zu produzieren, welcher selbst überlebt und lebensfähigen Nachwuchs erzeugt. Fitness Komponenten sind die Fruchtbarkeit, d.h. die Anzahl an Nachkommen und die Überlebensrate, d.h. der Anteil an Nachkommen, der bis zum Reproduktionsalter überlebt“ (Lowe, Harris & Asthon 2004). Diese Definition entspricht der klassischen darwinschen Sicht nach der das Individuum das Objekt der Selektion ist. Außerdem ist in ihr enthalten, dass Fitness mehrere Komponenten beinhaltet und verschieden formuliert werden kann. Unter absoluter Fitness versteht man die Anzahl von Nachkommen eines Individuums multipliziert mit deren Überlebensrate.

Eine weitere Form der Fitness ist die relative Fitness, unter der man „den Beitrag eines Genotyps oder Phänotyps zur genetischen Ausstattung nachfolgender Generationen im Verhältnis zum Beitrag anderer Genotypen oder Phänotypen“ versteht (Futuyma 2007). Diese Definition verdeutlicht, dass Fitness auf den Phänotyp oder den Genotyp eines Individuums bezogen werden kann. Dabei ist der Phänotyp das Objekt der Selektion und entsteht aus einem Zusammenspiel von Genotyp und verschiedenen Umwelteinflüssen. In der Populationsgenetik ist der Genotyp jedoch tendenziell von größerer Bedeutung. Im Gegensatz zur absoluten Fitness bezieht sich die relative Fitness auf einen Referenzgenotyp, der per Definition 1 gesetzt wird. Es handelt sich dabei meistens um den Genotyp mit der höchsten absoluten Fitness. Die Reduktion der Fitness eines Genotyps relativ zum Referenzgenotyp wird als Selektionskoeffizient s bezeichnet. Dieser ist ein Maß für die innerhalb einer Population wirkende Selektion. Während Veränderungen in der absoluten Fitness eines Genotyps für den Anstieg oder die Abnahme der Populationsgröße verantwortlich sind, führt die unterschiedliche relative Fitness verschiedener Genotypen zur Verschiebung der Allelfrequenzen innerhalb von Populationen und dadurch zur Evolution.

Für die Bestimmung der Fitness von Hybriden werden in klassischer Weise verschiedene Maße verwendet. An erster Stelle stehen die Lebensfähigkeit und die Fruchtbarkeit von F1 Hybriden. Es gibt viele Fälle, in denen F1 Hybride eine herabgesetzte Fruchtbarkeit zeigen (Arnold 1995). Es ist jedoch falsch, daraus zu folgern, dass die Hybridisierung aufgrund dessen ein evolutiv unwichtiger Prozess sein muss. Es braucht lediglich erneute Hybridisierungseignisse, um eine geringe Fruchtbarkeitswahrscheinlichkeit zu überwinden und eine F2 Generation zu erzeugen. Aus Studien an den Sonnenblumenarten *Helianthus annuus* und *H. petiolaris* ging hervor, dass trotz niedriger Fruchtbarkeit durch Hybridisierung dieser zwei Arten wahrscheinlich mindestens drei weitere Arten entstanden sind.

In der Literatur finden sich immer mehr Hinweise, dass Hybridisierung innerhalb der Evolution einen nicht unwichtigen Beitrag zur Speziation geleistet hat (Mallet 2007). Auch die invasive *Cottus* Linie ist nachweislich auf Hybridisierung zurückzuführen (Nolte *et al.* 2005a). Andere Maße für Fitness, die in verschiedenen Studien verwendet worden sind, sind bei Pflanzen z.B. Schattentoleranz, Anzahl herbivorer Attacken, Fruchtreifung und bei Tieren z.B. Fortpflanzungserfolg, Stabilität der Entwicklung, Effizienz bei der Nahrungssuche (Arnold 1995).

Im Gegensatz zu den klassischen Fitness Maßen wird in der vorliegenden Arbeit die genomische Kline Methode (Gompert & Burkle 2009) verwendet, um die Fitness hybrider Genotypen innerhalb von zwei *Cottus* Hybridzonen an einzelnen Loci zu untersuchen. Unter der Fitness von Genotypen wird in diesem Fall einfach deren Häufigkeit an einzelnen Loci im genomischen Hintergrund von Hybriden verstanden. Ziel ist es, genomische Regionen zu identifizieren, welche möglicherweise mit einer gesteigerten oder verminderten Fitness von Hybriden in Verbindung stehen. Zusätzlich soll der Hybridgenpool auf den Einfluss parental Allele aus den Populationen der Elternarten untersucht werden. Sind Allele einer Elternart an einem Locus stärker repräsentiert als nach einem neutralen Modell genomweiter Hybridisierung zu erwarten wäre, ist es möglich, dass diese Region zur adaptiven Introgression beiträgt. Im Speziellen soll mit Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) überprüft werden, ob es sich bei dem in der Vorstudie (Nolte *et al.* 2009) mit Mikrosatelliten gefundenen Muster der Unterdominanz um ein Artefakt aufgrund von Nullallelen handelt.

2. Material & Methoden

2.1 Single Nucleotide Polymorphisms SNPs

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) sind Variationen von einzelnen Basenpaaren in einer DNA Sequenz. Theoretisch können SNP Loci bis zu vier verschiedene Allele aufweisen. Dies sind die vier Grundbausteine der DNA Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T). Die Mehrzahl der im menschlichen Genom vorkommenden SNPs ist jedoch biallelisch. SNPs unterscheiden sich von seltenen Variationen dadurch, dass die Frequenz des seltensten Allels in einer Population über 1% liegen sollte (Brookes *et al.* 1999). Der größte Teil der im menschlichen Genom vorhandenen SNPs ist nach der Speziation, d.h. der Aufspaltung von *Homo* (Mensch) und *Pan* (Chimpanze), aber vor der Aufspaltung in unterschiedliche Populationen entstanden (Mountain *et al.* 1992). SNPs machen ca. 90 % der Variationen innerhalb des menschlichen Genoms aus, in dem sich alle 100 – 300 bp ein SNP befindet. Je nachdem wo sich ein SNP im Genom befindet, ergeben sich unterschiedliche Effekte. Das SNP Konsortium, ein Zusammenschluss verschiedener Firmen, beendete 2001 die Erstellung einer SNP Karte des menschlichen Genoms mit insgesamt 1,4 Millionen SNPs. Die Karte ist frei zugänglich und sehr wichtig für die Erforschung menschlicher Erkrankungen, die im Zusammenhang mit SNPs stehen. Außerdem werden SNPs in der Forensik zur Erstellung des sogenannten DNA Fingerabdruckes verwendet (Sanchez *et al.* 2008). SNPs können in vier Kategorien eingeteilt werden. rSNPs (random SNPs) sind zufällig über das Genom verteilt und befinden sich nicht in der Nähe von Genen. Sie dienen vor allem der Kartierung des Genoms. gSNPs (Gen-assoziierte SNPs) befinden sich in der Nähe von Genen oder auch in Introns, den nicht codierenden Bereichen eines Gens. Sie können unter Umständen die Regulation von Genen beeinflussen. cSNPs (codierende SNPs) liegen in Exons, den codierenden Bereichen eines Gens und wirken sich oft auf die Proteinstruktur aus. pSNPs sind SNPs, die sich auf den Phänotyp auswirken. Sie können sich in der Nähe oder innerhalb von Genen befinden. Befinden sich SNPs in codierenden Regionen, können sie entweder synonym, d.h. die Aminosäurefrequenz des codierten Proteins nicht verändernd, oder nicht synonym, d.h. die Aminosäurefrequenz des codierten Proteins verändernd, sein. Diese Muster werden verwendet, um DNA Sequenzen hinsichtlich verschiedener Selektionstypen zu untersuchen. Ein Abschnitt, in dem sich mehr nicht synonyme als synonyme SNPs befinden, steht potentiell unter positiver Selektion. Ein umgekehrtes Muster deutet daraufhin, dass ein Abschnitt unter balancierender Selektion steht.

Nach der neutralen Theorie (Kimura 1983) wird davon ausgegangen, dass SNPs häufiger in nicht codierenden als in codierenden Abschnitten auftreten, da sie innerhalb von codierenden Abschnitten vermutlich die Struktur eines Proteins eher verschlechtern als verbessern und deshalb von der natürlichen Selektion beseitigt werden. Tatsächlich findet sich im menschlichen Genom in Exons eine vierfach niedrigere Nukleotid Diversität, wobei mehr als die Hälfte nicht synonyme Veränderungen darstellen (Li and Sadler 1991). Die Nukleotid Diversität ist ein Maß für die Unterschiedlichkeit zwischen zwei Sequenzen oder die genetische Vielfalt innerhalb einer Population. Die während des Human Genome Projekt (HGP) gefundenen SNPs waren zu 75 % in intergenischen Regionen lokalisiert (Venter *et al.* 2001). Die während des HPG detektierte SNP Rate (SNPs / bp) war am geringsten in Exons und am größten in Introns. Erstaunlicherweise war die SNP Rate in intergenischen Regionen geringer als in Introns. Die kleinen Sequenzänderungen nicht synonyme SNPs können eine große Wirkung haben. Im menschlichen Genom führte eine Punktmutation zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Hämoglobin Moleküls, das bei einem für dieses Allel homozygoten Individuum zum Tod führt, denn bei Sauerstoffmangel verformen sich die Erythrocyten zu sichelförmigen Gebilden, die kleinere Blutgefäße verstopfen können. In heterozygotem Zustand ist ein Individuum jedoch mit einer gewissen Resistenz gegen Malaria versehen. Die so genannte Sichelzellenanämie ist ein klassisches Beispiel für einen Heterosis Effekt und einen balancierten Polymorphismus. Ein anderes Beispiel betrifft die MHC (Major Histocompatibility Complex) Genfamilie, die eine wesentliche Rolle bei der Immunabwehr spielt. Es handelt sich dabei um sehr polymorphe Loci, deren unterschiedliche Allele dafür sorgen, dass verschiedene Antigene von den T-Zellen des Immunsystems gebunden werden können und letztendlich eine Immunabwehr eingeleitet werden kann. In diesem Fall sorgen unterschiedliche SNPs für eine Konformationsänderung der Peptidbindungsregion (PBR) und ermöglichen dadurch die Anpassung an verschiedene Antigene. Dies ist für die Wechselbeziehungen von Parasit und Wirt von großer Bedeutung. Die Sequenz, die für die PBR codiert, zeigt eine größere Zahl von nicht synonymen gegenüber synonymen SNPs, was in diesem biologischen Zusammenhang dafür spricht, dass diese Region unter positiver Selektion steht (Hughes 2007).

Da der größte Teil der SNP Loci nicht unter Selektion steht, werden sie im Allgemeinen auch als neutrale Marker bezeichnet. SNPs werden nach den Mendelschen Gesetzen vererbt. Sie eignen sich für QTL (Quantitative Trait Loci) Analysen, die ein quantitatives phänotypisches Merkmal in Relation zur Variation von genetischen Markern untersuchen.

Ziel solcher Studien ist es, genomische Regionen zu finden, die mit der Ausprägung des untersuchten Merkmals in Verbindung stehen. Man unterscheidet Assoziations- und Kopplungsstudien. Für Assoziationsstudien wird im Gegensatz zu Kopplungsstudien eine deutlich höhere Zahl von Individuen benötigt. Erstere untersuchen die Variation bestimmter Marker entlang eines Merkmalsgradienten oder vergleichen zwei Gruppen mit extremer Ausprägung des Merkmals in Bezug auf Markervariationen. Letztere detektieren eine von den Mendelschen Regeln abweichende Vererbung bestimmter Marker. Ein Beispiel für eine erfolgreiche QTL Analyse ist die Kartierung der Pitx – 1 Region, die bei dem Stichling *Gasterosteus aculeatus* an der Reduzierung eines Skelettelementes des Hüftstachels beteiligt ist (Shapiro *et al.* 2005). Nolte fand während seiner Dissertation (Nolte 2005b) durch ein Admixture Mapping, welches einen weiteren Ansatz zur Identifikation von QTL Regionen darstellt, mehrere Loci, die mit der Stachelbeschuppung von *Cottus perifretum* und der invasiven Linie in Verbindung stehen könnten. Zum einen ist die Stachelbeschuppung ein wesentliches morphologisches Merkmal, das zur Unterscheidung dieser Linien von *C. rhenanus* herangezogen wird. Zum anderen stellt die starke Ausprägung dieses Merkmals bei der invasiven Linie eine mögliche Adaptation an das neu besiedelte Fluss Habitat dar. Der adaptive Wert der Stachelbeschuppung könnte in einer besseren Stabilität beim Schwimmen in Gewässern mit stärkerer Strömung liegen. Stemshorn erstellte während ihrer Dissertation (Stemshorn 2007) eine Kopplungskarte für das *Cottus* Genom mit Hilfe von Mikrosatelliten, die auch zu den neutralen Markern gehören. Außerdem untersuchte sie das Hybridgenom der invasiven Linie, mit dem Ziel zu erfahren, welche Abschnitte die beiden Elternarten *C. perifretum* und *C. rhenanus* zum Genom beigetragen haben. Sie durchsuchte die parental Genome nach abstammungsinformativen SNPs. Abstammungsinformative SNPs sind SNPs, die in *C. perifretum* und in *C. rhenanus* für unterschiedliche Allele fixiert sind. Als Außengruppe wurde die Spezies *C. reicei* verwendet. Sie fand insgesamt 101 abstammungsinformative SNP Loci, die in der vorliegenden Arbeit weiter verwendet werden.

2.2 Probennahme

2.2.1 Probennahmekonzept

Das Ziel der Probennahme war es, die Hybridzonen und insbesondere die Bereiche der Bachmündungen möglichst eng zu beproben. Dies geschah speziell für die von Nolte *et al.* 2006 erstellte Studie jedes Jahr zwischen 2000 und 2005 in Frühling, Sommer und Herbst. Morphologische Daten, im Speziellen die Stachelbeschuppung hybrider Individuen, wiesen daraufhin, dass die Hybridzonen während dieses Zeitraums ungefähr an der gleichen Stelle geblieben sind. Bei den beprobten Gebieten handelt es sich um Übergangszonen, in denen sich die ökologischen Faktoren wie Fließgeschwindigkeit des Wassers, Temperatur und Lichtverhältnisse verändern. Sie stellen ideale Gebiete zur Überprüfung der Faktoren für ein ökotonen Modell der Hybridzonenbildung dar. Nach einem ökotonen Modell befindet sich das Zentrum der Hybridzone innerhalb des steilsten Teils eines ökologischen Gradienten. In diesem Fall handelt es sich um einen Gradienten, der das Potamal, ein Bach Habitat, mit dem Rithral, einem Fluss Habitat, verbindet. In einem solchen „Mischhabitat“ könnte man erwarten, dass Hybride einen im Vergleich zu den Elternarten intermediären Phänotyp zeigen. In einer CVA (Canonical Variance Analysis) konnte gezeigt werden, dass Hybriden in der Tat einen intermediären Phänotyp zeigen (Nolte 2005a). Für eine *Cottus* Hybridzone in Nordamerika, die zwischen *C. hubbsi* und *C. bendirei* gebildet wird, konnte für die Hybriden ebenfalls ein intermediärer Phänotyp nachgewiesen werden (Markle & Hill 2005).

2.2.2 Gebiet der Probennahme

Sämtliche Proben für diese Arbeit wurden im Jahr 2005 in Nordrhein-Westfalen innerhalb des Rhein Systems genommen. Genauer gesagt wurden zwei Bach-Fluss-Systeme, entlang derer sich Hybridzonen der erwähnten *Cottus* Spezies befinden, intensiv beprobt. Die eine Hybridzone erstreckt sich um den Mündungsbereich des Baches Naaf und die andere um den Mündungsbereich des Baches Bröl. Ersterer mündet in den Fluss Sieg und letzterer in den Fluss Agger (Abb.4).

Beide Hybridzonen wurden über eine Entfernung von ca. 20 km beprobt.

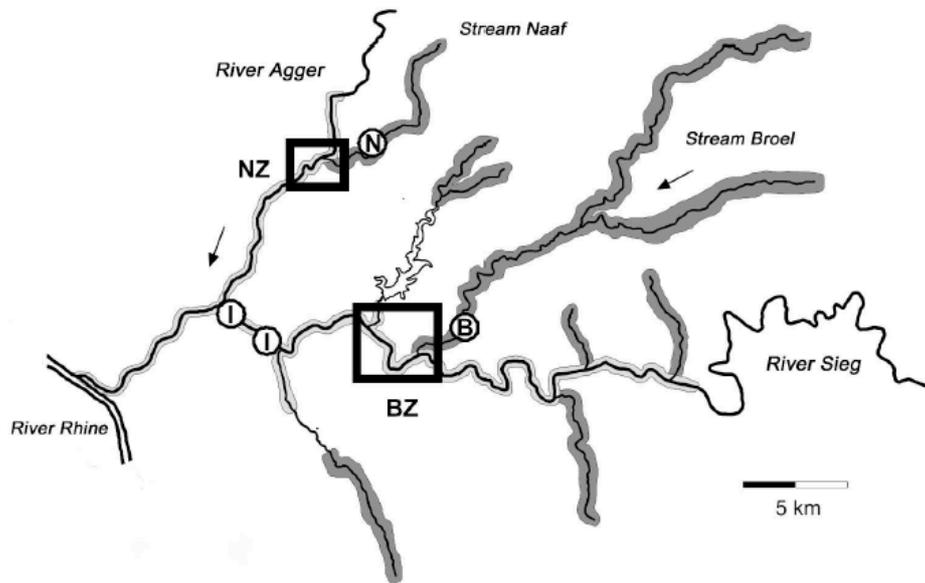


Abb. 4 Bröl BZ und Naaf NZ Hybridzone innerhalb des Rheinsystems. Aus Nolte *et al.* 2006

2.2.3 Orte der Probennahme

An jedem der in Tab.1 aufgeführten Orte wurden mit einem tragbaren Elektrofischgerät Groppen betäubt. Den Fischen wurde von der rechten Flosse ein Stück Gewebe abgeschnitten, das dann in ein Eppendorfgefäß mit HOM-Puffer überführt wurde.

Tab.1 Orte der Probennahme, die ihnen zugewiesene Nummer sowie Abkürzung, Anzahl und zugehöriger Koordinaten.

Nr.	Probenort	Abkürzung	Anzahl	Nördliche Breite	Östliche Länge
0	Sieg Meindorf	SM	30	50°46'55.50"N	7° 7'47.78"E
1	Sieg zwischen den Brücken Allner	SZA	46	50°46'40.32"N	7°17'56.65"E
2	Sieg Brücke Allner	SBA	41	50°46'49.56"N	7°18'17.39"E
3	Sieg Brücke	SB	134	50°46'50.07"N	7°18'19.69"E
4	Bröl Mündung	BM	44	50°46'53.50"N	7°18'27.09"E
5	Bröl Müschmühle zwischen den Brücken	BMB	38	50°47'3.74"N	7°18'30.55"E
6	Bröl oberhalb Brücke	BOB	53	50°47'5.18"N	7°18'39.98"E
7	Bröl Schafswiese	BS	100	50°47'10.27"N	7°18'53.09"E
8	Bröl südlich Bröl	BSB	41	50°47'13.37"N	7°19'46.73"E
9	Bröl Winterscheid	BW	30	50°47'45.97"N	7°20'23.24"E
10	Agger Campingplatz Lohmar	ACL	81	50°49'57.79"N	7°11'54.21"E
11	Agger Donrath Fußgängerbrücke	ADF	30	50°51'40.36"N	7°13'46.95"E
12	Naafbach Mündung	NM	43	50°51'54.47"N	7°14'20.82"E
13	Naafbach Hausdorf	NH	50	50°52'5.03"N	7°16'30.20"E

2.3 Laborarbeiten

Ziel der Laborarbeiten war es, 768 Individuen für 101 der von Stemshorn (2007) gefundenen informativen Loci zu genotypisieren. Für einige Proben war bereits eine DNA Extraktion durchgeführt worden. Für diese Proben erfolgte nur noch eine Konzentrationsbestimmung. Noch in HOM-Puffer gelagerte Proben wurden nach folgendem Protokoll DNA extrahiert.

2.3.1 DNA Salzextraktion

- 500 μ l HOM Buffer (80 mM EDTA, 100 mM Tris, and 0.5% SDS) und 5 μ l Proteinase K zum Gewebe geben
- Inkubation für mindestens 3 Stunden bei 55°C
- Zugabe von 500 μ l NaCl Lösung (4.5 Molar)
- Zugabe von 300 μ l Chloroform und 15 min mischen
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min
- Überführung von 850 μ l der oberen Phase in neues Eppi
- Zugabe von 595 μ l Isopropanol (0,7 Volumen) und gut mischen
- Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min
- Überstand mittels Pumpe absaugen
- Zugabe von 500 μ l 70 % Ethanol und Inkubation für 5 min im Kühlschrank
- Wiederholung der beiden letzten Schritte
- Trocknung des Pellets bei Raumtemperatur
- Lösung in 50 μ l TE-Puffer (10 mM Tris / 1mM EDTA)

2.3.2 DNA Messung

Zur Bestimmung der DNA Konzentration der Proben wurde der Nano Drop 1000, ein Spektralphotometer der Firma Thermo Scientific, verwendet. Prinzipiell ermittelt das Gerät die von einem Standard und der Probe absorbierten Lichtmengen, bestimmt ihr Verhältnis und berechnet mit Hilfe des Lambert Beerschen Gesetzes die Konzentration der Probe. Für die Messung einer Probe wird lediglich ein Volumen von 1-2 μ l benötigt. Das Vorgehen bei der Messung ist folgendes (1) Initialisierung des Instruments mit 1 μ l H₂O (2) Blindprobenmessung mit 1 μ l TE-Puffer (3) Probenmessung mit 1-2 μ l in TE-Puffer gelöster DNA.

2.3.3 Aufreinigung der Proben und DNA Fällung

Aufgrund von im Agarose Gel nicht wandernden Banden wurden die Proben mit dem Enzym RNase behandelt, um die Proben von möglichen RNA Rückständen zu befreien. Zusätzlich wurde bei der Messung derselben Proben mit dem Nano Drop eine erhöhte 260/280 Ratios festgestellt, was nach der Anleitung des Geräts auf Verunreinigungen schließen lässt.

- Zugabe von 1 μ l RNase
- Zugabe von 5 μ l Natriumacetat
- Zugabe von 100 μ l Ethanol
- 30 min warten
- Zentrifugation bei 13.000 rpm
- Zugabe von 500 μ l 70% Ethanol
- Zentrifugation bei 13.000 rpm
- Absaugen des Überstandes mittels Pumpe
- Wiederholung des letzten Schrittes
- Lösung in 50 μ l TE-Puffer

2.3.4 SNaPshot Methode

Mit der SNaPshot Methode können Primer für mehrere SNP Loci in einem so genannten Multiplex zusammengefasst werden. Die Zielsequenzen werden gemeinsam in einer Multiplex PCR Reaktion bis zu den zu untersuchenden SNPs amplifiziert (Vallone *et al.* 2004). An der Stelle, wo sich der SNP befindet, wird ein fluoreszenz-markiertes Nukleotid eingebaut (3), das im Sequenzer detektiert werden kann. Die bereits erwähnten 101 Loci wurden zu 14 Multiplexen zusammengefasst und nach folgendem Protokoll genotypisiert.

(1) Multiplex-PCR

Für einen 5 μ l Ansatz wurden 2.5 μ l Qiagen-Multiplex-PCR-Kit, 0.2 μ l Primer-Mix (100 μ M), 1.3 μ l H₂O und 1 μ l DNA verwendet. Die Bedingungen für das Cycling Programm wurden wie folgt eingestellt: 1 Zyklus bei 95°C für 15 min, 40 Zyklen bei 94°C für 30 s, 40 Zyklen bei 60°C für 1 min 30 s, 40 Zyklen bei 72°C für 1 min 30 s, 1 Zyklus bei 72° für 10 min, Abkühlung auf 12°C.

(2) PCR Produkt Aufreinigung

Für einen 3 μl Ansatz wurden 0.12 μl Exonuklease 1, 0.45 μl Shrimp Alkaline Phosphatase und 2.43 μl H₂O verwendet. Die Bedingungen für das Cycling Programm wurden wie folgt eingestellt: 1 Zyklus bei 37°C für 45 min, 1 Zyklus bei 80°C für 20 min und Abkühlung bei 12°C.

(3) Extension Primer Reaktion

Für einen 10 μl Ansatz wurden 2 μl aufgereinigtes PCR Produkt, 1 μl Extension Primer Mix, 0.5 μl Snapshot Multiplex Kit und 6.5 μl H₂O verwendet. Die Bedingungen für das Cycling Programm wurden wie folgt eingestellt: 40 Zyklen bei 95°C für 10 s, 40 Zyklen bei 50°C für 5 s, 40 Zyklen bei 60°C für 30 s und Abkühlung auf 12°C.

(4) Beseitigung nicht eingebauter ddNTPs

Zugabe von 1 μl Shrimp Alkaline Phosphatase zu den Reaktionen. Es wurde folgendes Cycling Programm benutzt: 1 Zyklus bei 37°C für 60 min, 1 Zyklus bei 75°C für 1 min und Abkühlung auf 12°C

(5) Vorbereitungen für die Genotypisierung

Verdünnung der Snapshot Produkte mit 100 μl H₂O und anschließende Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Für eine 96er Platte wurde 1 ml HiDi mit 10 μl LIZ Größenstandard vermischt. Für einen 10 μl Ansatz wurden 9 μl des Standardgemischs und 1 μl verdünntes Snapshot Produkt verwendet. Anschließend erfolgte eine Denaturierung bei 95°C für 5 min und sofortige Abkühlung in Eiswasser.

(6) Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte einem Sequenzierer der Firma ABI und des Typs 3730.

(7) Editierung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Applied Biosystems Software Gene Mapper. Mit diesem Programm kann bestimmt werden, ob ein Individuum an einem bestimmten Locus homozygot oder heterozygot ist. Ist ein Individuum homozygot wird nur ein Peak, ist ein Individuum heterozygot werden zwei Peaks detektiert. Da manche Allele von der Software nicht als solche erkannt werden, müssen diese manuell nacheditiert werden.

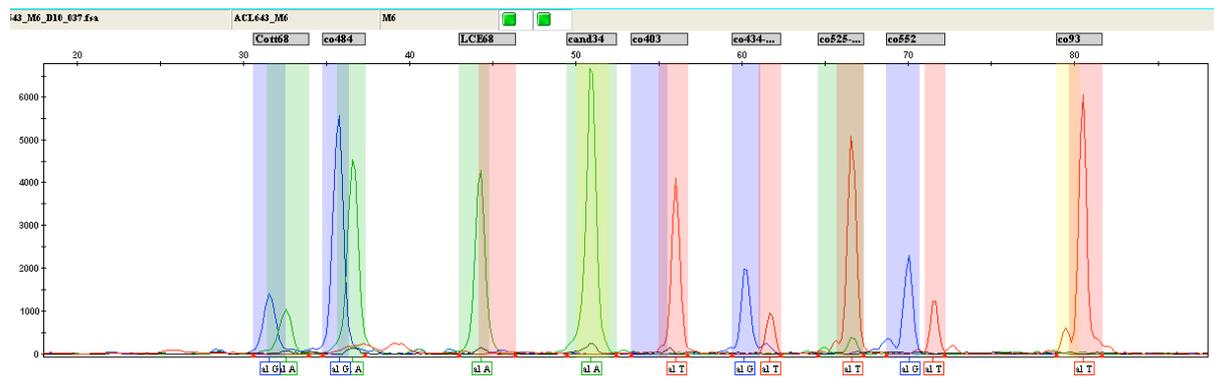


Abb. 5 Ausschnitt der Genemapperoberfläche. Grau markiert sind verschiedene Loci eines Individuums. Die Farben rot, grün, blau und schwarz beziehen sich auf unterschiedliche Allele. Heterozygote Genotypen zeigen zwei homozygote einen Peak.

Während der Auswertung stellte sich heraus, dass unter den 101 Loci acht monomorphe Loci waren. Diese und drei weitere Loci, für die über 40 % der Individuen nicht genotypisiert werden konnten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Außerdem wurden 75 Individuen, bei denen über 50 % der Loci nicht amplifiziert werden konnten, dem Datensatz entnommen. Außerdem wurden 7 Individuen die Vertreter verschiedener *Cottus* Spezies sind aus dem Datensatz entfernt. Diese werden unter Umständen später für phylogenetische Untersuchungen verwendet.

2.4 Datenanalyse

2.4.1 GENEPOP

Das Programm GENEPOP ist eine Software zur Bestimmung von populationsgenetischen Parametern wie z.B. F_{st} für den Grad genetischer Differenzierung zwischen Populationen oder LD das Kopplungsgleichgewicht zwischen Loci innerhalb von Populationen (Raymond & Rousset 1995). In dieser Arbeit wurde die Internetversion von GENEPOP verwendet, um die parental Populationen (*C. perfretum* im Fluss Sieg und *C. rhenanus* in den Bächen Bröl und Naaf) für die genotypisierten Loci auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu untersuchen. Hierfür wurde der von Haldane (1954) entworfene Test (Option 1- Suboption 3) mit der H_0 -Hypothese zufälliger Verpaarung verwendet. Ziel war es, solche Loci zu identifizieren, bei denen es eventuell zu Nullallelen gekommen ist. Nullallele sind nicht amplifizierte Allele. Sie entstehen z.B. durch Mutationen in der Primerbindungssequenz (Callen *et al.* 1993) und führen zu einem Defizit von heterozygoten Genotypen. Außerdem wurde der Grad genetischer Differenzierung F_{st} zwischen den parental Populationen bestimmt.

2.4.2 STRUCTURE

Bei STRUCTURE handelt es sich um eine Populationsgenetische Software, die anhand von multilokus Genotyp Daten mit verschiedenen Markertypen z.B. SNPs, Mikrosatelliten oder RLFPs die Anzahl vermeintlicher Populationen K berechnen (Pritchard *et al.* 2000) kann. Jedem Individuum wird dabei ein Abstammungskoeffizient zugewiesen, der angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Individuum einer vermeintlichen Population zugeordnet werden kann. Die Methode nimmt an, dass Loci nicht gekoppelt sind, sich also innerhalb von Populationen im Kopplungsgleichgewicht befinden. Außerdem wird angenommen, dass sich Populationen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden. STRUCTURE ordnet also die Populationen so, dass Hardy-Weinberg-Abweichungen minimiert werden. Eine der ersten Anwendungen von STRUCTURE auf einen SNP Datensatz mit 1056 Individuen von 52 menschlichen Populationen ergab, dass zwischen 93 – 95 % der genetischen Variation auf individuelle Unterschiede innerhalb von Populationen und nur 3 – 4 % der genetischen Variation auf Unterschiede zwischen Populationen zurückzuführen ist (Rosenberg *et al.* 2002). Die Bestimmung der Populationsstruktur ist für ein effektives Management und den Erhalt von Wildtierbeständen sehr wichtig (Halbert & Derr 2008). Über ein gezieltes Umsiedeln von Individuen kann eine eventuelle Inzuchtdepression, d.h. eine Verarmung genetischer Diversität verhindert werden, die zur Gefährdung oder zum Aussterben einer Population führen kann.

In dieser Arbeit wird STRUCTURE als Werkzeug benutzt, um den Verlauf der untersuchten Hybridzonen zu kartieren. Die Anzahl der innerhalb des Sieg Systems vorhandenen und zu erwartenden Populationen ist aus der Studie von Nolte *et al.* 2006 bekannt. Es handelt sich dabei für jede Hybridzone um jeweils zwei Populationen d.h. die invasive Linie im Fluss- und *C. rhenanus* im Bachhabitat.

Die STRUCTURE Analyse erfolgte für jede Hybridzone einzeln. Der Datensatz für die Bröl Zone enthielt 497 Individuen und der für die Naaf Zone 218 Individuen. Die Simulationen für beide Datensätze wurden mit 85 Loci durchgeführt. Die Simulationsparameter Burnin und Run Length wurden beide auf 50.000 eingestellt. Ein Burnin zwischen 10.000 – 100.000 wird in der STRUCTURE Anleitung für die meisten Fälle als adäquat beschrieben. Die Run Length wurde versuchsweise auf 50.000 eingestellt. Für jedes K wurden fünf Wiederholungen durchgeführt.

2.4.3 INTROGRESS

INTROGRESS (Gompert & Burkle 2009) ist ein Software Paket für die Statistik Software R. Es verwendet wie STRUCTURE multilokus Genotypen Daten. Gompert und Buerkle entwickelten die implementierte Methode, die sich der natürlichen Hybridisierung zweier differenzierter Linien bedient, um die genetischen Grundlagen für reproduktive Isolation und adaptive Introgression zu erforschen. Die Methode verwendet eine multinomiale Regression zur Erstellung genomischer Klinen für einzelne Loci. Genomische Klinen sind Genotypfrequenzen aufgetragen entlang eines Hybridindex, welcher den genetischen Beitrag der parentalen Spezies zum Genotyp eines Individuums quantifiziert (Gompert & Buerkle 2008). Loci, die signifikant von einem neutralen Modell genomweiter Hybridisierung abweichen, sind potentiell unter Selektion und tragen entweder zur reproduktiven Isolation oder zur adaptiven Introgression bei. Zu Abweichungen von einem neutralen Modell kommt es im Speziellen, wenn bestimmte Genotypen an einem Locus über oder unterrepräsentiert sind. Es werden insgesamt 6 verschiedene Muster von Abweichungen unterschieden. Dabei werden an einem Locus homozygote und heterozygote Genotypen getrennt voneinander betrachtet. Für homozygote Genotypen können positive und negative Selektion sowie Epistasie und erhöhte Hybridisierung als Muster detektiert werden. Für heterozygote Genotypen sind es die Muster der Über- und Unterdominanz.

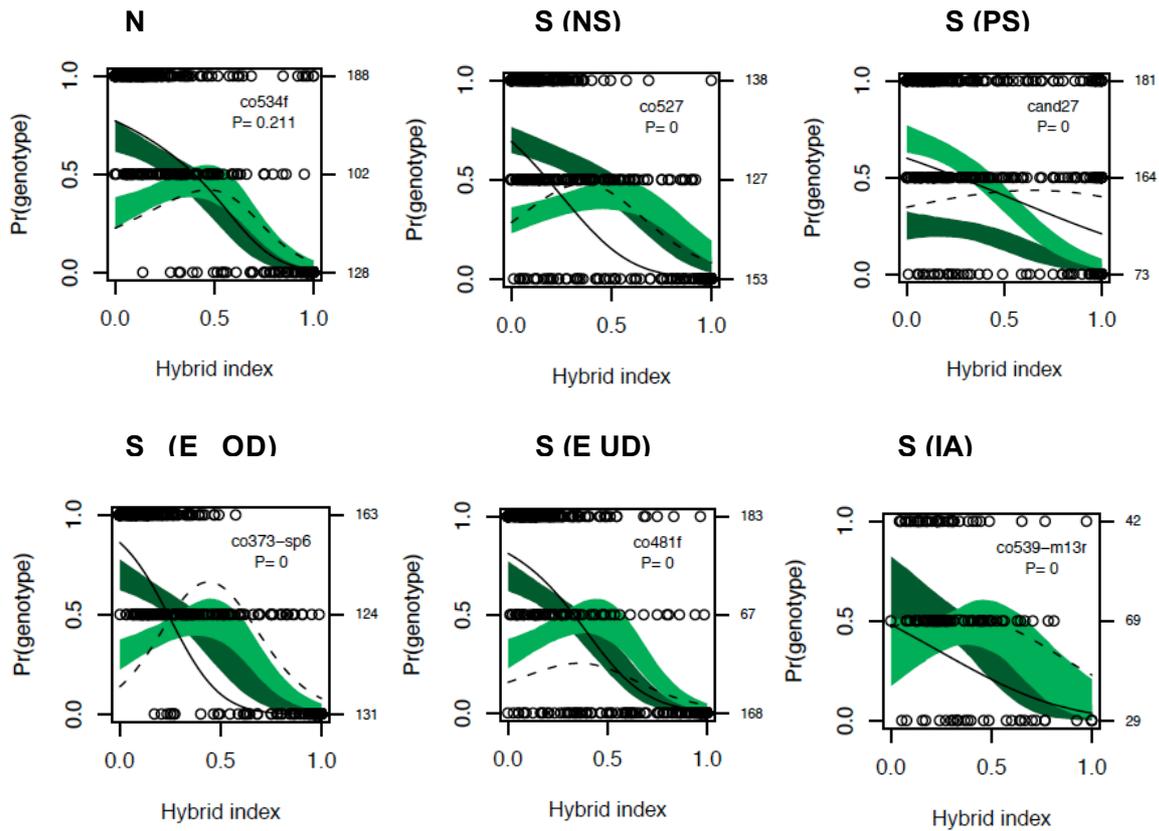


Abb.6 Genomische Klinien als Beispiel für die vorgenommene Bewertung unterschiedlicher Introgressionsmuster : N = neutral, S = nicht neutral, PS = positive Selektion, NS = negative Selektion, OD = Überdominanz, UD = Unterdominanz, E = Epistasie, IA = erhöhte Hybridisierung. Die Plots lesen sich wie folgt: In der rechten oberen Ecke finden sich Locus Name und P-Wert. Entlang der x – Achse findet sich der Hybridindex, welcher den Anteil von Allelen der invasiven Linie angibt. Ein Hybridindex von Null zeigt an, dass der multilokus Genotyp eines Individuums nur aus Allelen der invasiven Linie besteht. Entlang der y – Achse findet sich die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Genotyp an einem Locus zu finden. Die grünen Bänder bzw. Klinien sind die 95 % Konfidenzintervalle für 1000 Simulationen eines neutralen Modells genomweiter Hybridisierung. Die dunkelgrünen Bänder beziehen sich auf homozygote, die hellgrünen auf heterozygote Genotypen. Die offenen Kreise stellen die Genotypen Daten einzelner Individuen an diesem Locus dar. Die oberste Zeile zeigt die Individuen an, die an diesem Locus homozygot für das invasive Allel sind, die mittlere die für diesen Locus heterozygoten Individuen und die untere die an diesem Locus für das *C. rhenanus* Allel homozygoten Individuen. Die schwarze durchgezogene Linie bzw. Kline wurde berechnet auf Basis der beobachteten Daten und wird bewertet in Bezug auf das dunkelgrüne Band. Die gestrichelte Linie bzw. Kline beruht ebenfalls auf beobachteten Daten und wird bewertet in Bezug auf das hellgrüne Band.

Zur Interpretation der Muster ist eine genauere Betrachtung des Hybridindex notwendig. Der Hybridindex reicht von 0, dem genomischen Hintergrund der Referenzspezies, bis 1 in den genomischen Hintergrund der Alternativspezies. Er basiert auf multilokus Daten (Buerkle 2005). Die Auswahl der Referenzspezies ist willkürlich. Die Abweichungsmuster beziehen sich allerdings auf die Allele der Referenzspezies. In dieser Studie wurde die invasive Linie als Referenzspezies gewählt.

Detektiert die Methode an einem Locus positive Selektion, finden sich mehr homozygote Genotypen und damit mehr Allele der invasiven Spezies im Genpool der Hybriden als nach einem neutralen Modell genomweiter Hybridisierung zu erwarten wäre. Dies bedeutet aber gleichzeitig, dass sich an diesem Locus weniger homozygote Genotypen und damit weniger Allele von *C. rhenanus* im Genpool der Hybriden wieder finden, als nach einem neutralen Modell zu erwarten wäre. Für das Muster der negativen Selektion verhält es sich mit Genotypen und Spezies genau gegenteilig.

Zum besseren Verständnis des methodischen Musters der Epistasie sollen hier einige Grundlagen rekapituliert werden. Unter Epistasie versteht man die Wechselwirkung einzelner Genloci. Bei der Hybridisierung von zwei genetisch unterschiedlichen Spezies kann es passieren, dass es zu negativen Wechselwirkungen zwischen Loci der beteiligten Spezies kommt, die die Fitness von Hybriden vermindern. Bateson, Dobzhansky und Müller arbeiteten alle an der Entwicklung eines Modells zur Beschreibung der Grundlagen solcher genetischer Inkompatibilitäten. Aus diesem Grunde werden negative epistatische Wechselwirkungen auch als BDM Inkompatibilitäten bezeichnet (Arnold 2001). Diese spielen eine entscheidende Rolle für die Formierung von Hybridzonen innerhalb des Spannungszonen Modells. Das in INTROGRESS verwendete Modell der Epistasie integriert die Vorstellung, dass der Genotyp einer Spezies optimiert ist, d.h. die den Genotyp konstituierenden Loci sind in ihren Wechselwirkungen aufeinander abgestimmt (Mayr 2005). Es untersucht im Gegensatz zu klassischen BDM Inkompatibilitäten die Wechselwirkung eines einzelnen Locus mit dem genetischen Hintergrund. Das Modell geht von Folgendem aus: Ist ein Locus unter Selektion in der Referenzspezies für ein bestimmtes Allel fixiert, sollten sich für diesen Locus homozygote Genotypen auch häufiger im genetischen Hintergrund der Referenzspezies als im genetischen Hintergrund der Alternativspezies wieder finden, da Allele der Referenzspezies im genetischen Hintergrund der Alternativspezies wahrscheinlich vermehrt zu negativen epistatischen Wechselwirkungen führen. Die Methode detektiert mit dem Muster der Epistasie demnach Allele, die integraler Bestandteil eines bestimmten genomischen Hintergrundes sind, und deshalb vermehrt in diesem auftreten. Für das Muster der erhöhten Hybridisierung wird angenommen, dass Allele aus der Referenzspezies im genetischen Hintergrund der Alternativspezies zu positiven epistatischen Wechselwirkungen führen.

Die Muster der Über- oder Unterdominanz stehen biologisch in folgendem Kontext. Findet sich an einem Locus das Muster der Überdominanz, so bedeutet dies, dass mehr heterozygote Genotypen vorhanden sind, als nach einem neutralen Modell zu erwarten wären. Für das Muster der Unterdominanz ist das Gegenteil der Fall. Beide Muster sind wesentlich für die Bestimmung der Fitness hybrider Genotypen, denn sind bestimmte parentale Allelkombinationen an einem Locus häufiger oder weniger häufig zu finden als erwartet, steht die entsprechende Region möglicherweise mit einer gesteigerten oder verminderten Hybridenfitness in Verbindung. Zur konkreten Identifizierung von überdominanten Loci werden häufig Inzuchtlinien verwendet (Semel 2005). Es sei in diesem Zusammenhang erneut daraufhin gewiesen, dass mit der Fitness eines Genotyps dessen Häufigkeit an einem Locus gemeint ist. Es handelt sich dabei nicht um die Fitness eines Gesamtgenotyps für ein hybrides Individuum. Die Methode bestimmt demnach keine klassische absolute oder relative Fitness, sondern Abweichungen der Häufigkeiten von Genotypen von einem neutralen Modell genomweiter Hybridisierung, die auf Regionen innerhalb des Hybridgenoms hinweisen, welche mit reproduktiver Isolation oder adaptiver Introgression zu tun haben und dadurch indirekt einen Einfluss auf die Fitness von Hybriden haben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Unterdominanz und Epistasis die Muster sind, die sich zum Auffinden von genomischen Regionen, die mit reproduktiver Isolation in Verbindung stehen, besonders eignen. Überdominanz, positive und negative Selektion sind die Muster, die sich zum Auffinden von genomischen Regionen besonders eignen, die mit erhöhter Hybridenfitness und adaptiver Introgression in Verbindung stehen könnten. Signifikante Abweichungen von einem neutralen Modell werden von der Methode in Form eines P-Wertes registriert. Die Beurteilung der Muster erfolgt visuell entsprechend (Abb.6). Obwohl für einige Loci signifikante Abweichungen registriert wurden, waren für diese grafisch keine Abweichungen zu erkennen. Für diese Loci wurde die Entscheidung, ob sich ein Locus neutral oder abweichend verhält, visuell vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 GENEPOP

Von den anfangs 101 Markern wurden 11 Loci, die sich für die weitere Analyse nicht eigneten, dem Datensatz entnommen. Die verbleibenden 90 wurden auf Abweichungen vom Hardy Weinberg Gleichgewicht (HWG) in den parental Populationen (*C. perifretum* im Fluss Sieg und *C. rhenanus* in den Bächen Bröl und Naaf) überprüft. Loci, die signifikante Abweichungen vom HWG zeigten, wurden hinsichtlich ihrer korrekten Genotypisierung überprüft. Von den 13 Loci, die signifikante HWG Abweichungen (Anhang 1) zeigten, wurden 5 aufgrund von Unsicherheiten bei der Genotypisierung aus dem Datensatz entfernt. Die restlichen 8 Loci (cott68, co577, co449, co391-m13, co434-m13, cand54, co78, co539) wurden im Datensatz belassen, da Abweichungen vom Hardy Weinberg Gleichgewicht nicht nur durch Nullallele verursacht werden können. Für die genetische Differenzierung ergaben sich folgende Werte *C. rhenanus* Bröl versus *C. perifretum* $F_{st} = 0,61$, *C. rhenanus* Naaf versus *C. perifretum* $F_{st} = 0,66$ und *C. rhenanus* Bröl versus *C. rhenanus* Naaf $F_{st} = 0,33$.

3.2 STRUCTURE

Für beide Hybridzonen ergab sich für die vermeintliche Anzahl von Populationen K ein Wert von 2. Der richtige K -Wert ist meistens der kleinste der Plateauwerte, d.h. der Werte, bei denen ein höheres K nicht zu einer Erhöhung in $\ln P(D)$ führt. Ein weiterer Indikator für das Vorhandensein von Populationsstruktur ist ein während eines Laufs kaum schwankender Alpha-Wert, was für beide Hybridzonen bei $K = 2$ der Fall war.

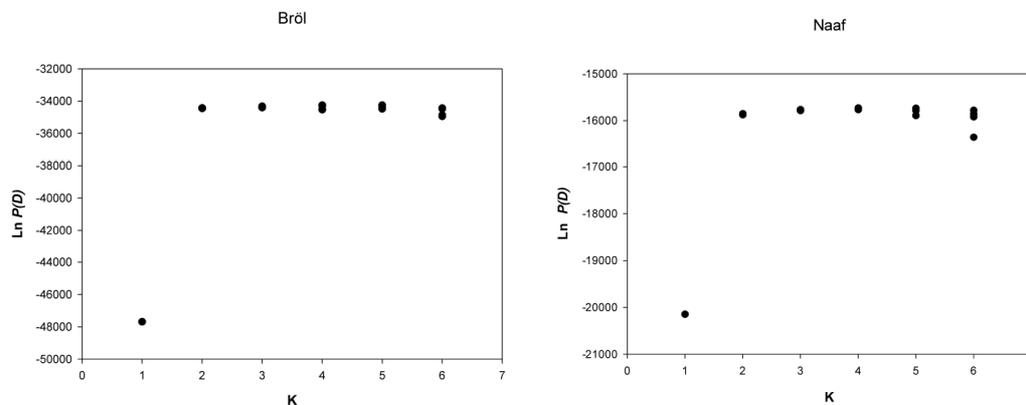


Abb.7 Schätzung $\ln P(D)$ für die Anzahl vermeintlicher Populationen K mittels des Admixture Modells in STRUCTURE. Für jedes K wurden 5 Wiederholungen der Simulation durchgeführt.

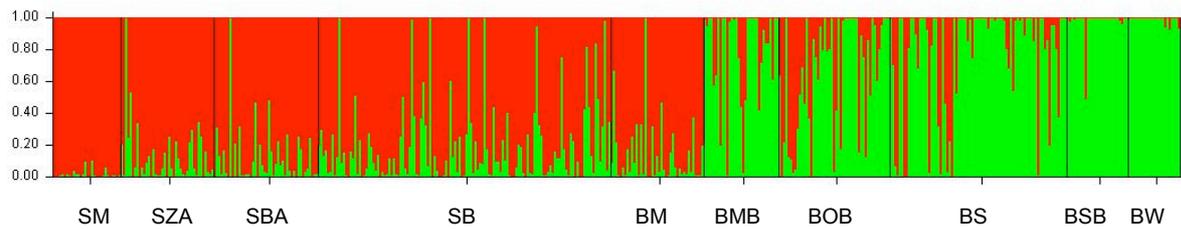


Abb.8 Populationsstruktur für die Bröl Hybridzone. Genotypisierte Individuen entsprechen horizontalen Linien aufgeteilt in $K = 2$ Segmente, die dem Anteil an einem genetischen Cluster entsprechen. Rot = invasive Linie und grün = *C. rhenanus*. Schwarze vertikale Linien trennen die Orte der Probennahme SM (Sieg Meindorf), SBA (Sieg Brücke Allner), SZA (Sieg zwischen den Brücken Allner), SB (Sieg Brücke), BM (Bröl Mündung), BMB (Bröl Müschmühle zwischen den Brücken), BOB (Bröl oberhalb Brücke), BS (Bröl Schafswiese), BSB (Bröl südlich Bröl), BW (Bröl Winterscheid). Für Koordinaten siehe Tab.1

Aus den Bar Plots für die Bröl (Abb.8) und die Naaf (Abb.9) Hybridzone wird ersichtlich, dass die Individuen innerhalb der Hybridzone zum Teil sehr unterschiedliche Anteile an genetischem Material von den Elternarten enthalten. Vergleicht man die beiden Hybridzonen um den Mündungsbereich, scheint es, als ob in der Bröl oberhalb der Mündung der genetische Anteil der invasiven Linie höher ist als oberhalb der Mündung in der Naaf. Innerhalb der Bröl Hybridzone scheinen weit unterhalb der Mündung noch genetisch hundertprozentige *C. rhenanus* Individuen und oberhalb der Mündung noch genetisch hundertprozentige Individuen der invasiven Linie vorzukommen (Abb.9) Während der Oberlauf des Naaf Baches (NH) einen genetisch homogenen *C. rhenanus* Cluster bildet, finden sich im Bröl Oberlauf (BW) noch Individuen mit einem geringen Anteil genetischen Materials der invasiven Linie. Auch in der parental Population (SM) der invasiven Linie findet sich anscheinend bei einigen Individuen genetisches Material aus *C. rhenanus*.

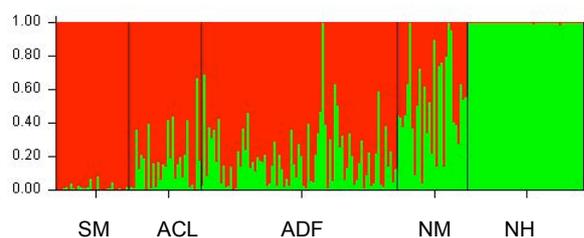


Abb.9 Populationsstruktur für die Naaf Hybridzone. Genotypisierte Individuen entsprechen horizontalen Linien aufgeteilt in $K = 2$ Segmente, die dem Anteil an einem genetischen Cluster entsprechen. Rot = *invasive Linie* und grün = *C. rhenanus*. Schwarze vertikale Linien trennen die Orte der Probennahme SM (Sieg Meindorf), ACL (Agger Campingplatz Lohmar), ADF (Agger Donrath Fußgängerbrücke), NM (Naafbach Mündung), NH (Naafbach Hausdorf)

Ergebnisse

Mittels der in STRUCTURE für jedes Individuum berechneten Abstammungskoeffizienten wurde für jede Hybridzone eine geographische Kline erstellt. Für jeden Datensatz wurde eine logistische Regression durchgeführt und eine sigmoidale Kurve gefittet (Abb.10).

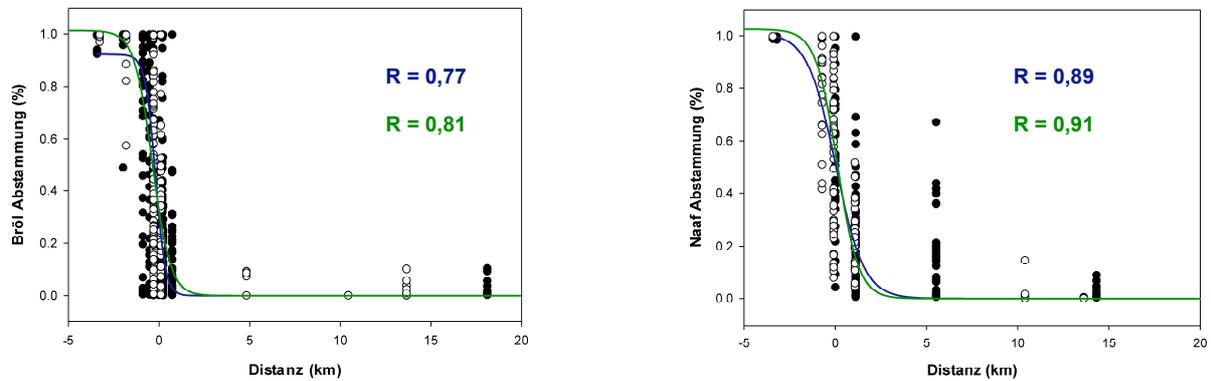


Abb.10 Abstammungskoeffizienten genotypisierter Individuen entlang eines ökologischen Gradienten von einem Bach- in ein Flusshabitat aufgetragen von links nach rechts. Der Mündungsbereich befindet sich bei Kilometer Null. Die schwarzen Punkte und die blauen Kurven beziehen sich auf SNP Daten des Jahres 2005. Die weißen Punkte und grünen Kurven beziehen sich auf STR Daten des Jahres 2003. Anteil genetischen Materials bezieht sich auf die Spezies *C. rhenanus*.

Um einen Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Jahren anstellen zu können, wurden die von Nolte *et al.* 2006 erhobenen Mikrosatelliten Daten mit Genehmigung integriert. Die Klinien zeigen für beide Markertypen und beide Hybridzonen einen ähnlich steilen Verlauf. Für die Naaf Zone werden die Daten mittels der Regression ein wenig besser beschrieben, was aus den für diese Zone größeren Korrelationskoeffizienten hervorgeht. Außerdem wurde die Klinienbreite, definiert als der Kehrwert der maximalen Steigung (Harrison 1993, p.16), für beide Datensätze und Hybridzonen berechnet. Die Breite der Kline beträgt für die Bröl Zone berechnet anhand von SNP Daten 1,2 km und berechnet anhand von STR Daten 1,96 km. Für die Naaf Zone ergab sich für SNP Daten ein Wert von 3,12 km und für STR Daten ein Wert von 2,3 km für die Breite der Kline. Innerhalb der Naaf Zone wurden noch 5 Kilometer unterhalb der Mündung Hybride gefunden.

3.3 INTROGRESS

Wählt man allein den P-Wert als Entscheidung, ob ein Locus einem neutralen oder einem nicht neutralen Muster folgt, ergibt sich für beide Hybridzonen für 85 genotypisierte Loci nur ein neutraler Locus, was einem prozentualen Anteil von 1 % entspricht. Mit der visuellen Bestimmung wurden für die Bröl 3 und für die Naaf Zone 6 Loci als neutral klassifiziert (Tab.2). Im folgenden Abschnitt erfolgt sowohl die Darstellung der Ergebnisse der INTROGRESS Analyse für die genotypisierten SNPs, als auch ein Vergleich zum Mikrosatelliten Datensatz des Jahres 2003. Die Bewertung der Muster für die einzelnen Loci und die dazugehörigen genomischen Klinalen finden sich im Anhang 4-6.

Tab.2 Verteilung der Loci auf Modell Kategorien des Programms INTROGRESS in absoluten Zahlen. Rot markiert ist der SNP (Einzelnukleotidpolymorphismen) Datensatz mit 85 Loci des Jahres 2005 und blau markiert ist der STR (Mikrosatellitendatensatz) mit 168 Loci des Jahres 2003 für die Hybridzonen Bröl und Naaf. Loci, die in beiden Hybridzonen das gleiche Muster zeigen, werden unter der Kategorie „Beide“ aufgeführt.

Absolut	SNPs			STRs		
	Bröl	Naaf	Beide	Bröl	Naaf	Beide
Hybridzone						
Nicht-Neutral	76	72	69	85	85	48
Neutral	3	6	0	83	83	46
positive Selektion	12	8	6	19	10	2
negative Selektion	57	58	52	28	39	9
Unterdominanz	6	4	3	43	36	14
Überdominanz	4	6	2	4	6	0
Epistasie	6	3	1	1	0	0
erhöhte Vermischung	0	0	0	2	2	2
Ausfälle	6	7	6	0	0	0

Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl Marker für den SNP und den STR Datensatz wurde die obige Tabelle in Prozentwerte transformiert (Tab.3). Die Analyse des SNP Datensatzes ergab, dass sowohl in der Bröl als auch in der Naaf Hybridzone über 80 % der Loci von dem neutralen Modell genomweiter Hybridisierung abweichen. Dem neutralen Modell entsprechen 4 % der Marker in der Bröl, d.h. 3 von 85 und 7 % der Marker in der Naaf Zone, d.h. 6 von 85.

Tab.3 Verteilung der Loci auf Modell Kategorien des Programms INTROGRESS in Prozent. Rot markiert ist der SNP Datensatz des Jahres 2005 und blau markiert ist der Mikrosatellitendatensatz des Jahres 2003 für die Hybridzonen Bröl und Naaf. Loci die in beiden Hybridzonen das gleiche Muster zeigen werden unter der Kategorie „Beide“ aufgeführt.

Prozent	SNPs			STRs		
	Bröl	Naaf	Both	Broel	Naaf	Both
Hybridzone						
Nicht-Neutral	89	85	81	51	51	29
Neutral	4	7	0	49	49	27
positive selektion	14	9	7	11	6	1
negative selektion	67	68	61	17	23	5
Unterdominanz	7	5	4	26	21	8
Überdominanz	5	7	2	2	4	0
Epistasie	7	4	1	1	0	0
erhöhte Hybridisierung	0	0	0	1	1	1
Ausfälle	7	8	7	0	0	0

Sehr große Übereinstimmung zeigen beide Zonen hinsichtlich der Anzahl von Loci mit einem Muster negativer Selektion, die sowohl für die Bröl als auch für die Naaf Zone ca. 70 % ausmachen. Auch stimmen die Zonen hinsichtlich der Größenordnung von Markern, die Muster der Über- und Unterdominanz zeigen, mit 5 – 7 % gut miteinander überein. Es ist wichtig zu bemerken, dass die gleichen Loci in unterschiedlichen Hybridzonen verschiedene Muster zeigen können. In der Bröl Zone zeigen 12 (14%) und in der Naaf Zone 8 (9%) der Loci ein Muster von positiver Selektion. Es gibt 6 Loci, die bezüglich dieses Musters zwischen den Zonen übereinstimmen.

Der größte Unterschied zwischen dem Mikrosatelliten STR und dem SNP Datensatz besteht in dem Prozentsatz neutraler Loci. Während bei dem STR Datensatz lediglich ca. 50 % der Loci einem neutralen Muster folgten, waren es bei dem SNP Datensatz ca. 80 %. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zeigte sich für das Muster der Unterdominanz. Während bei dem STR Datensatz je nach Zone 21 % (Naaf) oder 26 % (Bröl) der Loci ein solches Muster zeigten, lag der Anteil bei dem SNP Datensatz bei 7 % (Naaf) oder 14 % (Bröl).

Neben den Unterschieden gibt es aber auch Gemeinsamkeiten. Der Anteil der Loci, welche ein Muster der positiven Selektion zeigen, liegt für beide Datensätze und Zonen zwischen 6 –14 %, d.h. ungefähr in der gleichen Größenordnung. Für beide Datensätze und Hybridzonen zeigen relativ wenige Loci die Muster Überdominanz (5 – 6 %), Epistasie (0 – 7%) und erhöhte Hybridisierung (0 – 2 %).

Tab.4 SNP Loci, die in der Bröl und der Naaf Hybridzone gleiche Muster aufweisen (oliv markiert). Aufgrund der großen Übereinstimmung von Loci mit einem Muster negativer Selektion zwischen den Zonen werden diese nicht alle einzeln aufgeführt.

	Bröl	Naaf		Bröl	Naaf
Neutral	cand 64	co373-sp6	Epistasie	co349-m13	co349-m13
	co376	co492		co407	co414
	co534	co311		co373-sp6	co434-sp6
		co577		co434-sp6	
		co346sp6		co311	
		co481		co539-m13	
Gesamt	3	6	Gesamt	6	3
Überdominanz	co407	cand64	Unterdominanz	co434-sp6	co434-sp6
	co373-sp6	co449		co572-m13	co572-m13
	co444	co444		co349-m13	co349-m13
	co470	co470		co577-m13	co40
		cott153		co481	
		co303		cand26	
Gesamt	4	6	Gesamt	6	4
Positive Selektion	co413	co413	Negative Selektion	cand24	cand24
	cand27	cand27		co425	co425
	cand34	cand34		co476-sp6	co476-sp6
	co547-m13	co547-m13		cott197	cott197
	co391-m13	co391-m13		cotte9	cotte9
	co340	co340		co804	co804
	co325	co830		LCE21	LCE21
	co577	co534		co527	co527
	cott43			co306	co306
	co414			co421	co421
	co481			co445	co445
	cand26		
Gesamt	12	8	Gesamt	57	58

Von den 6 Loci, die ein Muster von positiver Selektion zeigen und zwischen den Hybridzonen Naaf und Bröl übereinstimmen, sind 4 mit der Stachelbeschuppung assoziiert (Anhang 2). Die Loci, die ein Muster negativer Selektion zeigen, sind oft in Blocks von 3-5 Loci auf einer Kopplungsgruppe der genetischen Karte des *Cottus* Genoms zu finden (Anhang 3). Kopplungsgruppen mit Blocks von Loci, die ein Muster negativer Selektion aufweisen, sind die Gruppen 2, 3, 5, 10, 18 und 20.

4. Diskussion

Anscheinend sind Nullallele in diesem Datensatz nicht prevalent. Lediglich fünf von 13 vom HWG abweichende Loci ließen bei genauerer Untersuchung auf technische Schwierigkeiten bei der Genotypisierung schließen. Allerdings ist nicht sicher, dass für die 90 untersuchten Loci tatsächlich alle vom HWG abweichenden Loci detektiert wurden, denn es ist zwischen Abweichungen vom HWG und statistisch signifikanten Abweichungen vom HWG zu unterscheiden (Rodriguez *et al.* 2009). Generell steigt mit einer größeren Stichprobe die Wahrscheinlichkeit, statistisch signifikante Abweichungen zu detektieren, denn der Fehler 2. Art, d.h. Beibehaltung der Nullhypothese (zufällige Verpaarung), obwohl sie falsch ist, wird verringert. Allerdings können auch noch bei Stichproben von $N = 1000$ je nach Häufigkeit des weniger häufigen Allels Fehler 1. Art, d.h. Ablehnung der Nullhypothese, obwohl sie richtig ist, auftreten (Wigginton *et al.* 2005). Der Stichprobenumfang betrug für die parental Populationen zwischen 30 und 50 Individuen. Alle drei Stichproben befinden sich in der gleichen Größenordnung, weshalb für keine der Stichproben mit einer überproportional höheren Detektion von Loci zu rechnen war, welche vom HWG abweichen. Tatsächlich lag die Anzahl von Loci mit HWG Abweichungen für die parental Populationen mit 3 – 5 Loci in der gleichen Größenordnung. In dieser Arbeit wurden Abweichungen vom HWG verwendet, um Loci zu finden, die eventuell eine fehlerhafte Genotypisierung zeigen. Diese Loci wurden hinsichtlich der Fehler bei der Auswertung überprüft. Verschiedene Modelle für die methodische Detektion von Genotypisierungsfehlern mittels Abweichungen vom HWG und deren Verbindung zur Stichprobengröße finden sich bei Leal (2005).

Abweichungen vom HWG können nicht nur durch fehlerhafte Amplifikation von Allelen erzeugt werden, sondern vor allem durch die wesentlichen Faktoren der Evolution d.h. Selektion, Mutation, Migration, genetische Drift und assortative oder nicht zufällige Verpaarung. Es ist allerdings durchaus möglich, dass die Effekte dieser Faktoren sich gegenseitig aufheben, so dass sich ein Locus formal im HWG befindet, obwohl Evolutionsfaktoren wirken (Guo & Thompson 1992). Nicht zufällige Stichproben sind eine weitere Möglichkeit für Abweichungen vom HWG (Rodriguez *et al.* 2009). Außerdem können Abweichungen vom HWG unter Umständen auch mit biologischen Mechanismen wie der Überlebensfähigkeit des Embryos in Verbindung stehen (Vine & Curtis 2009).

Aus der Clusteranalyse ging für die Anzahl vermeintlicher Populationen für jede Hybridzone ein K-Wert von 2 hervor. Ein Wert von $K = 2$ ist im Allgemeinen für Hybridzonen zu erwarten, denn innerhalb von Hybridzonen kommt es zur Vermischung der Genome zweier unterschiedlicher Spezies. In diesem Fall sind es die Genome von *C. rhenanus* und der invasiven Linie. Dass innerhalb der Bröl Hybridzone weit unterhalb der Mündung noch Individuen vorkommen, die zu 100 % dem *C. rhenanus* Cluster zugeordnet werden, und weit oberhalb der Bröl Mündung noch Individuen vorkommen, die zu 100 % der invasiven Linie zugeordnet werden, ist entweder auf eine fehlerhafte Genotypisierung oder auf Migration einzelner Individuen zurückzuführen (Abb.8). Es scheint der invasiven Linie nicht gelungen zu sein, die Bäche bis in den Oberlauf zu kolonialisieren. Ausgehend von der durchschnittlichen Besiedlungsgeschwindigkeit des Sieg Systems durch die invasive Linie von 4 – 8 km pro Jahr innerhalb der Jahre 1991 bis 2001 (Nolte et. al 2005b), ist dies erstaunlich. Dass die invasive Linie das Potential besitzt, Bachhabitats zu besiedeln, beweisen der Pleisbach und der Wahnbach, die zum Teil von der invasiven Linie kolonisiert werden konnten (Nolte et. al 2006). Die steilen geographischen Klinen weisen daraufhin, dass starke Selektion gegen parentale Genotypen in alternativen Habitats und gegen Hybride außerhalb des Mündungsbereichs den Hybridzonen ihre Form gibt (Moore 1977, Barton 1983). Hybridzonen sind dynamische Systeme, deren Lage und Stabilität von einer Vielzahl von Faktoren, z.B. der Populationsdichte und Ausbreitung der beteiligten Spezies, abhängt (Barton & Hewitt 1985). Stabile Hybridzonen können durch ein Gleichgewicht von Migration und Selektion oder durch eine gesteigerte Fitness von Hybriden, gekoppelt an ein spezielles Habitat, entstehen (Moore 1984). Da sich die hier untersuchten Hybridzonen erst vor ca. 20 Jahren durch sekundären Kontakt formiert haben, ist nicht davon auszugehen, dass sich bereits ein Gleichgewicht von Ausbreitung und Selektion eingestellt hat und die Zonen insofern, was Lage und Breite angeht, durchaus jährliche Variationen zeigen können. Vergleicht man SNP gegenüber STR Daten ergab sich für die Bröl Zone eine Verschmälerung und für die Naaf Zone eine Verbreiterung der Klinenbreite um ca. 800 m. Allerdings sind diese Ergebnisse kritisch zu beurteilen, denn es wurden für beide Zonen und Jahre nicht die exakt gleichen Orte beprobt. Die Tatsache, dass innerhalb der Naaf Zone noch 5 Kilometer unterhalb der Mündung Hybride gefunden wurden, lässt nur auf eine mögliche Verbreiterung der Hybridzone schließen, da im Jahr 2003 dieser Ort nicht beprobt wurde. Die „Verschmälerung“ der Bröl Hybridzone hängt wahrscheinlich eher mit der engeren Beprobung des Mündungsbereichs und einer geringen Beprobung des Flussbereichs im Jahr 2005 zusammen.

Diskussion

Auch wenn die verschiedenen Jahre aufgrund der unterschiedlichen Beprobung nicht exakt miteinander vergleichbar sind, so stimmen die bestimmten Breiten der Klinen zumindest in der Größenordnung miteinander überein.

Aus der INTROGRESS Analyse ging hervor, dass es starke Selektion gegen invasive Allele im Genpool der Hybriden gibt, denn in beiden Hybridzonen zeigten ca. 70% der Marker ein Muster von negativer Selektion, d.h. invasive Allele sind im Genpool der Hybriden unterrepräsentiert. Werden invasive Allele negativ selektiert, bedeutet dies gleichzeitig, dass *C. rhenanus* Allele an den entsprechenden Loci positiv selektiert sind. Es kam im Jahr 2005 demnach zu einem stärkeren Genfluss von Allelen aus der *C. rhenanus* Population in den Genpool der Hybriden. Ein solcher asymmetrischer Genfluss kann temporär z.B. durch ein Hochwasser verursacht werden, bei dem Individuen vermehrt stromabwärts transportiert werden (Crespin & Berrebi 1998). Da solche Hochwasserereignisse im Sieg System jährlich vorkommen (Nolte persönliche Kommunikation), stellen sie eine mögliche Erklärung für den asymmetrischen Genfluss dar. Eine andere mögliche Ursache für asymmetrischen Genfluss ist, dass die *C. rhenanus* Populationen in den Bächen bereits die Tragfähigkeit des Habitats erreicht haben und dadurch im Bereich der Hybridzone in größerer Dichte vorkommen als die Eindringlinge der invasiven Linie. Durch die unterschiedlichen Populationsdichten würden Paarungen zwischen Individuen der invasiven Linie und *C. rhenanus* Individuen wahrscheinlicher als zwischen Individuen der invasiven Linie. Currat *et al.* 2000 simulierten verschiedene Szenarien für die Invasion einer Spezies in das Habitat einer lokalen Spezies und stellten fest, dass der Genfluss von der lokalen in die invasive Spezies fast immer stärker ist als von der invasiven in die lokale Spezies. Der Genfluss von invasiven Allelen in den genetischen Hintergrund der lokalen Spezies erfolgt lediglich, wenn diese Allele unter starker positiver Selektion im genetischen Hintergrund der lokalen Spezies sind. Von den 6 Loci, die in beiden Hybridzonen ein Muster positiver Selektion zeigen, d.h. bei denen die Allele der invasiven Linie im Genpool der Hybriden überrepräsentiert sind, sind 4 (co340, co547-m13, co413) mit der Stachelbeschuppung assoziiert (Anhang 2). Die Stachelbeschuppung ist ein für die invasive Linie charakteristisches Merkmal und könnte in Verbindung stehen mit der Besiedlung größerer Flüsse, da sie eventuell eine bessere Stabilität beim Schwimmen in stärkerer Strömung ermöglicht (siehe 2.1). Die Stachelbeschuppung könnte sich auch in den Hybriden als adaptiv erweisen, da diese im Mündungsbereich, der ein Habitat mit wahrscheinlich im Vergleich zu einem Bach stärkeren Strömungen darstellt, leben. Hybride zeigen durchschnittlich eine intermediäre Stachelbeschuppung (Nolte 2005a). Es bleibt zu überprüfen, wie stark sich die Strömungsgeschwindigkeit entlang der Hybridzonen verändert.

Zwei der Loci (cott197, cotte9), die mit dem Flusshabitat assoziiert sind, zeigten hingegen ein Muster negativer Selektion d.h. invasive Allele dieser Loci sind in den Hybriden unterrepräsentiert. Neben der Strömungsgeschwindigkeit ist die Wassertemperatur ein weiterer ökologischer Faktor, der das Rhithral vom Potamal unterscheidet. Es ist möglich, dass diese Loci mit der Anpassung an höhere Wassertemperaturen im Fluss in Verbindung stehen. Auch für diesen ökologischen Faktor bleibt zu testen, wie stark die Variation entlang der Hybridzonen ist. Gompert und Buerkle beschreiben, dass es prinzipiell möglich sei, ökologische Faktoren in INTROGRESS zu integrieren (Gompert & Buerkle 2008). Es ist abzuwarten, ob dies in einer neueren Version möglich sein wird.

Lediglich 5 bis 7 % der untersuchten Loci zeigten je nach Hybridzone das Muster Unterdominanz, das auf genomische Regionen verweist, die mit einer verminderten Hybridenfitness in Verbindung stehen könnten. Im Vergleich dazu zeigten bei der mit Mikrosatelliten durchgeführten Analyse (Nolte *et al.* 2009) je nach Hybridzone 21 bis 26 % der Loci das Muster der Unterdominanz. Zum einen ist es möglich, dass dieses Muster ein technisches Artefakt, entstanden aufgrund fehlerhafter Amplifikation einzelner Allele, ist. Zum anderen kann es sein, dass mit dem SNP Datensatz aufgrund einer geringeren Zahl von untersuchten Loci, d.h. 85 gegenüber 168, das Muster der Unterdominanz schlechter erfasst wurde. Für ein Artefakt spricht die Tatsache, dass Mikrosatelliten gegenüber SNPs deutlich höhere Mutationsraten ($10^{-4} - 10^{-5}$ pro Generation vs. 10^{-8}) aufweisen (Dieckmann *et al.* 2004). Durch höhere Mutationsraten können Primerbindungsstellen schneller mutieren und Nullallele leichter entstehen. Eine dritte Möglichkeit ist, dass es innerhalb der zwei Jahre, die zwischen den Probennahmen lagen, zu einer Verschiebung der Introgressionsmuster gekommen ist. Um von einer solchen Verschiebung sprechen zu können, muss jedoch vorausgesetzt werden, dass beide Datensätze das 1000 Mbp große Cottus Genom ausreichend gut repräsentieren. In dieser Hinsicht erweist sich der Mikrosatellitendatensatz als etwas besser. In Zeiten von SNP Chips, mit denen über 600.000 SNPs für ein Individuum amplifiziert werden können (Yang *et al.* 2009), kann man aber davon sprechen, dass beide Datensätze bezüglich der Anzahl der Loci in einer ähnlichen Größenordnung liegen. Da es sich bei Hybridzonen um dynamische Systeme handelt, sind zeitliche Verschiebungen von Mustern der Introgression sehr wahrscheinlich. Dies gilt besonders für die hier untersuchten Hybridzonen, bei denen es erst vor 20 Jahren zum sekundären Kontakt kam. In Anbetracht dieses relativ kurzen Zeitraums ist nicht zu erwarten, dass sich genomische Regionen für reproduktive Isolation schon fest herausgebildet haben.

Übereinstimmung zwischen den Datensätzen herrscht hinsichtlich des Anteils von Loci mit einem Muster positiver Selektion, der je nach Hybridzone zwischen 6 – 14 % beträgt. Dies deutet daraufhin, dass nur ein geringer Anteil von Allelen der invasiven Linie vermehrt im Genpool der Hybriden vorhanden ist, dieser aber relativ konstant geblieben ist, weil es sich dabei wahrscheinlich um der Adaption dienliche Allele handelt.

Der größte Unterschied der Datensätze besteht eindeutig im Anteil neutraler Loci. Während im Mikrosatellitendatensatz dieser Anteil für beide Hybridzonen 50 % beträgt, liegt dieser Anteil im SNP Datensatz bei lediglich 5 %. Die Tatsache, dass sich ein so geringer Anteil von Loci neutral verhält, kann nur durch Kopplung dieser Loci an genomische Regionen unter Selektion erklärt werden. Für das *Cottus* Genom bestehen solche Informationen in Form einer genetischen Karte (Stemshorn *et al.* 2005), die auf 171 Mikrosatelliten basiert und von Kathryn Stemshorn während ihrer Dissertation erstellt wurde. Durch die Benutzung des Blast Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) der Ensembl Datenbank konnte sie feststellen, dass zwischen dem *Cottus* und dem *Gasterosteus* Genom einer hoher Grad an Syntänie besteht. Viele der gefundenen Kopplungsgruppen konnten mit einzelnen Chromosomen des *Gasterosteus* Genoms in Verbindung gebracht werden. Außerdem durchsuchte Sie das *Cottus* Genom nach SNP Loci, die informativ für die Abstammung von *C. perifretum* und *C. rhenanus* sind, und in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Diese Loci wurden wiederum gegen das *Gasterosteus* Genom „geblastet“ und solche, die einen Treffer auf einem *Gasterosteus* Chromosom ergaben, konnten dadurch rückwirkend in die *Cottus* Kopplungsgruppe integriert werden. Überträgt man die Ergebnisse der INTROGRESS Analyse auf die Kopplungsgruppen (Anhang 3), so kann man feststellen, dass zum Teil ganze Kopplungsgruppen einem Selektionsmuster folgen. Kopplungsgruppen 2, 3, 5, 10, 18 und 20 weisen alle Blocks von Loci (3-5) auf, die ein Muster negativer Selektion zeigen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass größere genomische Regionen des *Cottus* Genoms in der Hybridzone gleiche Introgressionsmuster aufweisen können. Momentan scheint ein größerer Teil der Hybriden homozygot für 6 größere genomische Regionen aus *C. rhenanus* zu sein.

Durch die INTROGRESS Analyse konnten nur zwei Loci mit einem Muster der Überdominanz identifiziert werden, die zwischen den Hybridzonen Bröl und Naaf übereinstimmen. Es gibt allerdings generell wenig Evidenz für überdominante Loci und die Überdominanz, als Erklärung für eine erhöhte Fitness von Hybriden, weicht derzeit der Dominanz Hypothese (Crow 1998). Im Allgemeinen bleibt statistisch zu testen, ob Übereinstimmungen zwischen den Hybridzonen (Tab.4) bezüglich der Anzahl von Loci mit einem gleichen Muster der Introgression auch durch Zufall möglich sind.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte über eine STRUCTURE Analyse mit Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) gezeigt werden, dass die von Nolte et. al 2006 mit Mikrosatelliten (STRs) untersuchten Hybridzonen zwischen der invasiven *Cottus* Linie und *C. rhenanus* weiterhin stabil sind. Variationen in der Breite der Hybridzonen, die an den Übergang von einem Bach- in ein Flusshabitat gekoppelt sind, sind sehr wahrscheinlich auf die zum Teil unterschiedlichen Orte der Probennahme für die Jahre 2003 und 2005 zurückzuführen. Der invasiven Linie ist es bisher nicht gelungen die Bäche Naaf oder Bröl bis in den Oberlauf zu kolonisieren. Vereinzelt konnten jedoch Individuen, die genetisch dem Cluster der invasiven Linie zugeordnet wurden, noch mehrere Kilometer oberhalb der Bröl Mündung gefunden werden. Außerdem konnten Individuen, die genetisch dem *C. rhenanus* Cluster zugeordnet wurden, noch mehrere Kilometer unterhalb der Bröl Mündung gefunden werden. Die Breite der Kline für die Naaf Hybridzone ist mit 2-3 km gegenüber der Bröl Kline mit 1-2 km ein wenig breiter. Mit beiden Markertypen (STRs und SNPs) konnte die Klinienbreite der verschiedenen Hybridzonen in ähnlicher Größenordnung bestimmt werden.

Außerdem konnte mit einer INTROGRESS Analyse mit SNPs Evidenz dafür hergestellt werden, dass es sich bei dem in Nolte *et al.* 2009 mit STRs gefundenen Muster der Unterdominanz, welches ca. 25 % der Loci zeigten, wahrscheinlich um ein Artefakt, aufgrund von Nullallelen, handelt. Allerdings unterscheiden sich die Datensätze auch in Bezug auf andere Muster der Introgression, so dass es ebenso möglich ist, dass beide Datensätze eine zeitliche Verschiebung dieser Muster darstellen. Das im SNP Datensatz vorherrschende Muster war das Muster der negativen Selektion, welches 70 % der untersuchten Loci zeigten. Dies deutet auf einen verstärkten Genfluss von *C. rhenanus* Allelen in den Genpool der Hybriden hin. Außerdem folgten lediglich 5 % der untersuchten Loci einem neutralen Muster d.h. fast alle Loci müssen an genomische Regionen, die unter Selektion stehen, gekoppelt sein. Bei der Übertragung der Ergebnisse auf die Kopplungsgruppen der genetischen Karte des *Cottus* Genoms stellte sich heraus, dass Loci mit einem Muster negativer Selektion in Blocks von 3-5 Loci auf 6 verschiedene Kopplungsgruppen verteilt sind d.h. größere genomische Regionen können einem Introgressionsmuster folgen.

In einer weiterführenden Untersuchung könnte das Kopplungsungleichgewicht LD entlang der Klinien bestimmt werden, um die Ausbreitung parentaler Genotypen in die Hybridzone zu berechnen (Sotka & Palumbi 2006).

6. Literaturverzeichnis

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EM, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Arnold ML (1995) Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 67-71
- Arnold ML (2001) Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* **35**, 31-52.
- Avise JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press.
- Barton NH (1979) Dynamics of hybrid zones. *Heredity* **43**, 341-359.
- Barton NH, Hewitt GM (1985) Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 113-148.
- Bernatchez L, Wilson C (1998) Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* **7**, 431-452.
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177-186.
- Crespin L, Berrebi P (1999) Asymmetrical introgression in a freshwater fish hybrid zone revealed by a morphological index of hybridization. *Biological Journal of the Linnean Society* **67**, 57-72.
- Crow JF (1998) 90 years ago: The beginning of hybrid maize. *Genetics* **148**, 923-928.
- Currat M, Ruedi M, Petit RJ, Exofficier L (2008) The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution* **62**, 1908-1920.
- Dieckmann U, Doebli M, Metz JAJ, Tautz D (2004) Adaptive Speciation. *Cambridge University Press, Cambridge*.

- Endler JA (1977) Geographic Variation, Speciation, and Clines. *Monographs in Population Biology* **10**.
- Englbrecht CC, Freyhof J, Nolte A, *et al.* (2000) Phylogeography of the bullhead *Cottus gobio* (Pisces : Teleostei : Cottidae) suggests a pre-Pleistocene origin of the major central European populations. *Molecular Ecology* **9**, 709-722.
- Gompert Z, Buerkle CA (2008) A powerful regression-based method for admixture mapping of isolation across the genome of hybrids. *Molecular Ecology* **18**, 1207-1224.
- Gompert Z, Buerkle CA (2009) INTROGRESS: a software package for mapping components of isolation in hybrids. *Molecular Ecology Resources*.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Freyhof J, Kottelat M, Nolte A (2005) Taxonomic diversity of European *Cottus* with description of eight new species (Teleostei : Cottidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* **16**, 107-172.
- Futuyma DJ (2007) Evolution. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Halbert DH, Derr JN (2008) Patterns of genetic variation in US federal bison herds. *Molecular Ecology* **17**, 4963-4977.
- Haldane JBS (1954) An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics* **52**, 631-635.
- Hanfling B, Brandl R (1998) Genetic differentiation of the bullhead *Cottus gobio* L. across watersheds in central Europe: evidence for two taxa. *Heredity* **80**, 110-117.

- Hanfling B, Hellemans B, Volckaert FAM, Carvalho GR (2002) Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* **11**, 1717-1729.
- Harrison RG (1993) Hybrid Zones and the Evolutionary Process *Oxford University Press*.
Plus enthaltende Referenzen: Huxley (1938), Mayr (1942)
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hughes AL (2007) Looking for Darwin in all the wrong places: the misguided quest for positive selection at the nucleotide sequence level. *Heredity* **99**, 364-373
- Kimura M (1983) The neutral theory of molecular evolution. *Cambridge University Press*.
- Knapen D, Knaepkens G, Taylor MI, Ens E, Verheyen E (2003) Conservation units based on mitochondrial and nuclear DNA variation among European bullhead populations (*Cottus gobio* L., 1758) from Flanders, Belgium. *Conservation Genetics* **4**, 129-140.
- Kottelat M (1997) European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for non-systematics and comments on nomenclature and conservation. *Biologia, Bratislava, Section Zoology* **52** (Suppl. 5), 1-271.
- Köhler C, Lelek A, Cazemir WG (1993) Die Groppe im Niederrhein - Merkwürdigkeit oder etablierter Bestandteil der Fischartengemeinschaft? *Natur Museum* **123**, 373-386.
- Leal SM (2005) Detection of genotyping errors and pseudo-SNPs via deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetic Epidemiology* **29**, 204-214.
- Li W, Sadler LA (1991) Low nucleotide diversity in man. *Genetics* **129**, 513-523.

- Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) Ecological Genetics. *Blackwell Publishing*.
- Mallet (2007) Hybrid Speciation. *Nature* **446**, 279-283.
- Markle DF, Hill DL (2000) Taxonomy and distribution of the malheur mottled sculpin, *Cottus bendirei*. *Northwest Science* **74**, 202-211.
- Mayr E (2005) Das ist Evolution. *Wilhelm Goldmann Verlag*.
- Moore WS (1977) Evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. *Quarterly Review of Biology* **52**, 263-277.
- Moore WS, Buchanan DB (1984) Stability of the northern flicker hybrid zone in historical times implications for adaptive speciation theory. *Evolution* **39**, 134-151.
- Mountain JL, Lin AA, Bowcock AM, Cavallisforza LL (1992) Evolution of modern humans – evidence from nuclear DNA polymorphisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **337**, 159-165.
- Nolte AW (2005a) Evolutionary genetic analysis of an invasive population of sculpins in the Lower Rhine. PhD Thesis.
- Nolte AW, Freyhof J, Stemshorn KC, Tautz D (2005b) An invasive lineage of sculpins, *Cottus* sp (Pisces, Teleostei) in the Rhine with new habitat adaptations has originated from hybridization between old phylogeographic groups. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 2379-2387.
- Nolte AW, Hartl A, Freyhof J, Belanyecz H (2005c) Fisch des Jahres 2006: Koppe (*Cottus gobio*). *Broschüre des VDSF*.
- Nolte AW, Freyhof J, Tautz D (2006) When invaders meet locally adapted types: rapid moulding of hybrid zones between sculpins (*Cottus*, Pisces) in the Rhine system. *Molecular Ecology* **15**, 1983-1993.

- Nolte AW, Gompert Z, Buerkle CA (2009) Variable patterns of introgression in two sculpin hybrid zones suggest that genomic isolation differs among populations. *Molecular Ecology* **18**, 2615-2627.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Riffel M, Schreiber A (1995) Coarse-grained population structure in Central European sculpin (*Cottus gobio* L): Secondary contact or ongoing genetic drift? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **33**, 173-184.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (VERSION-1.2) – Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM (2009) Hardy-Weinberg Equilibrium testing for biological ascertainment for Medelian Randomization studies. *American Journal of Epidemiology* **169**, 505-514
- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber, JL, *et al.* (2002) Genetic structure of human populations. *Science* **298**, 2381-2384.
- Sanchez JJ, Borsting C, Balogh K, *et al.* (2008) Forensic typing of autosomal SNPs with a 29 SNP-multiplex - Results of a collaborative EDNAP exercise. *Genetics* **2**, 176-183.
- Semel Y, Nissenbaum J, Naama M, *et al.* (2006) Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *PNAS* **103**, 12981-12986.
- Shapiro MD, Marks EM, Peichel CL, *et al.* (2004) Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* **428**, 717-723.
- Sotka EE, Palumbi SR (2006) The use of genetic clines to estimate dispersal distances of marine larvae. *Ecology* **87**, 1094-1103.

- Stemshorn KC (2007) The genomic Make-Up of a Hybrid Species - Analysis of the invasive Lineage (Pisces, Teleostei) in the River Rhine system. PhD Thesis.
- Stemshorn KC, Nolte AW, Tautz D (2005) A genetic map of *Cottus gobio* (Pisces, Teleostei) based on microsatellites can be linked to the physical map of *Tetraodon nigroviridis*. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 1619-1624.
- Thienemann A (1950) Verbreitungsgeschichte der Süßwassertierwelt Europas. Die Binnengewässer. Band XVIII. *Schweitzerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart*.
- Teeter KC, Payseur BA, Harris LW, *et al.* (2008) Genome-wide patterns of gene flow across a house mouse hybrid zone. *Genome Research* **18**, 67-76.
- Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ (2004) A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int. J. Legal Med.*, 147-157.
- Volckaert FAM, Hanfling B, Hellemans B, Carvalho GR (2002) Timing of the population dynamics of bullhead *Cottus gobio* (Teleostei : Cottidae) during the Pleistocene. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 930-944.
- Venter C, Adams MD, Meyers EW, Li PW, *et al.* (2001) The sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-1350.
- Vine AE, Curtis D (2009) Markers typed in genome-wide analysis identify regions showing deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. *BMC Research Notes* **2**:29
- Widmer A, Lexer C (2001) Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 267-269.
- Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR (2005) A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American Journal of Human Genetics* **76**, 887-883.
- Yang H, Ding Y, Hutchins LN, *et al.* (2009) A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse. *Nature Methods* **6**, 663-665.

7. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei vielen Menschen bedanken, die mich während der Zeit der Diplomarbeit auf die eine oder andere Art unterstützt haben.

Zuerst meinem Betreuer Prof. Diethard Tautz, dem ich einen tieferen Einblick in die Populationsgenetik verdanke; Prof. Günther Hartl vom dem ich erste Einblicke in die Populationsgenetik erhielt; Arne Nolte meinem fast immer gut gelaunten und wirklich immer erreichbaren Ansprechpartner für die Groppen; Kathryn Stemshorn, die mir während meiner Zeit als Hilfwissenschaftler viele Tricks für effektives Arbeiten im Labor gezeigt hat; Elke Blohm Sievers und Elke Busdorf für technisches Wissen und Tatkraft; Jan von Rönn für Wissen über die Gesetze der Wissenschaft; Till Czypionka für gutes Frühstück und Korrekturlesen; Inka Montero für Tips und Tricks für die Formatierung; Guy Reeves für jede Menge gute Witze; Louis Boell für gute Gespräche auch abseits der Wissenschaft; Barbara Kleinhenz für die eine oder andere Aufmunterung wenn der Laborstress groß war; Derk, Werner und Herbert für das lösen vieler Computerprobleme und außerdem allen anderen Mitarbeitern des Instituts !!! Und natürlich meiner Mutter deren praktische Weisheit mir weiter durchs Leben hilft ☺

8. Anhang

- **Anhang 1** Test auf Abweichungen vom Hardy Weinberg Gleichgewicht für 85 SNP Loci in den parentalen Populationen.
- **Anhang 2** Admixture Mapping Loci plus assoziierte Merkmale aus der Dissertation von Arne Nolte und entsprechende abstammungsinformative Loci plus Kopplungsinformationen aus der Dissertation von Kathryn Stemshorn sowie Introgressionsmuster dieser Loci aus der vorliegenden Arbeit.
- **Anhang 3** *Cottus* Kopplungsgruppen plus enthaltende Loci mit zugehörigen Introgressionsmustern aus der vorliegenden Arbeit.
- **Anhang 4** Bewertung der genomischen Klinen für die untersuchten Loci und Hybridzonen.
- **Anhang 5** Genomische Klinen für die Bröl Hybridzone
- **Anhang 6** Genomische Klinen für die Naaf Hybridzone

Anhang 1 Test auf Abweichungen vom Hardy Weinberg Gleichgewicht in den parental Populationen. Loci die, signifikant vom HWG abweichen, sind rot (P < 0.01) markiert. STABW = Standardabweichung für die berechneten P-Werte.

LOCUS	<i>C. rhenanus</i> P-Wert	Bröl STABW	<i>C. rhenanus</i> P-Wert	Naaf STABW	invasive Linie P-Wert	Sieg STABW
Cand24f	-		-		0.4558	0.0028
Cand64f	-		-		1	0.0000
Co407f	-		-		0.4175	0.0021
Co425r	-		-		1	0.0000
Co476-sp6f	-		-		0.2892	0.0021
Cott197	-		-		0.2688	0.0028
CottE9	-		-		0.3847	0.0028
co804af	-		-		0.0654	0.0017
LCE21	-		-		1	0.0000
co373-sp6	1	0.0000	-		1	0.0000
co395	-		1	0.0000	-	
co413	0.6089	0.0019	0.7618	0.0018	-	
co417	-		-		1	0.0000
co434-sp6	-		-		1	0.0000
co527	-		-		0.6399	0.0017
co306	-		-		1	0.0000
co421	-		-		1	0.0000
co445	-		-		1	0.0000
co449	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0172	0.0008
co492	-		-		0.2988	0.0024
co540	-		-		1	0.0000
Cott108	-		-		0.4627	0.0028
CottE7	-		-		1	0.0000
LCE87	0.0183	0.0007	-		1	0.0000
cand27	1	0.0000	0.3219	0.0023	0.5054	0.0024
cand29	-		-		0.3758	0.0025
cand3e	-		-		1	0.0000
co313	-		-		0.2601	0.0026
co379	0.5400	0.0017	1	0.0000	0.3815	0.0024
co705	0.5404	0.0017	0.4621	0.0026	0.0615	0.0014
Cott153	-		-		0.3763	0.0024
Cott173	-		-		1	0.0000
Cott580	-		-		0.6834	0.0018
CottE2	-		-		0.4815	0.0030
co264	-		-		0.1487	0.0025
co522-sp6	-		-		0.6643	0.0017
Cott68	0.0001	0.0000	-		0.1360	0.0025
LCE68	-		-		1	0.0000
cand34	0.0909	0.0018	0.7437	0.0018	1	0.0000
co403	-		1	0.0000	0.6785	0.0018
co434-m13	-		-		0.5485	0.0016
co484	-		-		0.0011	0.0002
co525-m13	-		-		0.1130	0.0021
co552	-		-		1	0.0000
co93	-		1	0.0000	0.2619	0.0027
cand54	-		-		0.0006	0.0001
co303	-		-		0.6791	0.0017
co312	-		-		0.4125	0.0022
co317	-		-		0.1443	0.0017
co376	-		-		1	0.0000
co46r	-		-		0.6904	0.0018
co624	-		-		0.0159	0.0008
co78	-		-		0.0013	0.0002
LCE78	-		-		1	0.0000
co325	1	0.0000	-		0.5502	0.0016
co40f	0.0200	0.0008	-		0.0774	0.0019
co444	0.0317	0.0011	1	0.0000	0.1435	0.0016
co470	1	0.0000	1	0.0000	0.1977	0.0021

	<i>C. rhenanus</i>	Bröl	<i>C. rhenanus</i>	Naaf	invasive Linie	Sieg
LOCUS	P-val	S.E	P-val	S.E	P-val	S.E
co547-m13	1	0.0000	0.0955	0.0016	1	0.0000
co572-m13	-	-	-	-	0.4137	0.0022
cand39	0.0277	0.0011	-	-	0.4100	0.0022
co311	-	-	-	-	0.0504	0.0012
co331-m13	-	-	-	-	1	0.0000
co564-m13	-	-	-	-	0.3742	0.0025
co577	0.0000	0.0000	-	-	1	0.0000
co82f	0.3116	0.0019	-	-	1	0.0000
co830	1	0.0000	0.6895	0.0019	1	0.0000
Cott205	0.0229	0.0009	0.1300	0.0020	1	0.0000
Cott43	1	0.0000	0.0117	0.0006	1	0.0000
co293-sp6	1	0.0000	-	-	1	0.0000
co391-m13	1	0.0000	0.0003	0.0001	-	-
co414	0.6635	0.0019	0.1804	0.0024	1	0.0000
co539f	1	0.0000	-	-	0.0000	0.0000
Cott228	-	-	-	-	1	0.0000
LCE27	-	-	0.2186	0.0018	-	-
cand38	1	0.0000	0.3181	0.0021	1	0.0000
co302-sp6	-	-	1	0.0000	-	-
co539-m13r	-	-	-	-	0.3248	0.0023
co569-m13	-	-	-	-	0.6374	0.0017
cand13	0.0038	0.0004	0.0000	0.0000	1	0.0000
co346-sp6	-	-	-	-	0.5614	0.0014
co355	0.3839	0.0027	0.0000	0.0000	1	0.0000
co468	0.0270	0.0009	0.1342	0.0026	0.7029	0.0018
co481f	-	-	-	-	1	0.0000
cand26	1	0.0000	-	-	1	0.0000
co316	0.0041	0.0004	0.0037	0.0003	0.0688	0.0015
co340	0.0612	0.0015	0.6929	0.0019	0.4130	0.0024
co349-m13f	-	-	-	-	0.3274	0.0024
co485	-	-	-	-	1	0.0000
co491f	-	-	-	-	0.0454	0.0011
co534f	-	-	0.3137	0.0028	1	0.0000
co542f	-	-	-	-	-	-
co569-m13r	-	-	-	-	-	-

Anhang 2 Admixture Mapping Loci plus assoziierte Merkmale aus der Dissertation von Arne Nolte (2005a) und entsprechende abstammungsinformative Loci plus Kopplungsinformationen aus der Dissertation von Kathryn Stemshorn (2007) sowie Introgressionsmuster dieser Loci aus der vorliegenden Arbeit. Abbildung bis auf Introgressionsmuster aus der Dissertation von Stemshorn.

Muster	Ancestry-informative Locus	Fixed ancestry	Admixture mapping Locus	Associated trait	Hit on <i>Gasterosteus</i> Linkage group	Position on <i>Gasterosteus</i> Linkage group (bp)	Distance inferred from syteny
S (NS)	LCE21	<i>C. perfretum</i>	LCE21	Prickling	XVI	12.922.306	-
S (PS)	Co340	Potentially <i>C. perfretum</i>	Cott146	Prickling	XVI	14.075.930/ 14.611.755	540 kb
S (NS)	CottE9	<i>C. perfretum</i>	CottE9	Prickling, Habitat	IX	18.334.973	-
S (PS)	Co547	Potentially <i>C. perfretum</i>	Cott78	Prickling	XI	10.104.235/ 10.793.926	690 kb
S (PS)	Co413	Potentially <i>C. perfretum</i>	Cgo56	Prickling	III	14.662.844/ 14.742.507	80 kb
S (NS)	Cott197	<i>C. perfretum</i>	CottES21	Habitat	XX	4.905.894/ 4.387.625	510 kb

Anhang 3 *Cottus* Kopplungsgruppen (KG) plus enthaltende Loci (Stemshorn 2007) mit zugehörigen Introgressionsmustern aus der vorliegenden Arbeit.

Locus	<i>Cottus</i> KG	Bröl	Naaf	Beide
co478-m13	1 or 25			x
co572-m13	1 or 25			S (NS UD)
co407-sp6	1 or 25			x
co476-sp6	1 or 25			S (NS)
co355	1 or 25			x
co391-m13	1 or 25			S(PS)
co373-sp6	1 or 25			x
co569	1 or 25	S (E OD)	N	
co349-m13	1 or 25			S(E UD)
Cott197	2			S(NS)
Cott108	2			S(NS)
Cott228	2			S(NS)
CottE1	3			x
co525	3			S(NS)
co312	3			S(NS)
cand39	3			S(NS)
co264	4			S(NS)
CottE2	5			S(NS)
co40f	5	S(NS)	S(NS E)	S(NS)
co804	5			S(NS)
Cott43	5	S(PS)	S(NS)	S
cand64	6	N	S(NS OD)	
co531	6			x
co534	6	N	S(PS)	
co376	6	N	S(NS)	
LCE27	7			x
Cott153	7	S(NS)	S(NS OD)	S(NS)
co705	8	S(NS)	A	
LCE87	8	S(NS)		
co316	8			x
co624	8			x
co539-m13	8	S(E)	S(IA)	
co311	9	S(E)	N	
co413	9			S(PS)
co552	9			S(NS)
cand3e	10			S(NS)
co522	10			S(NS)
co82f	10			S(NS)
co444	10			S(OD)
co470	10			S(NS OD)
co325	10	S(PS)	S(NS)	S
co46r	10			S(NS)
co542	10			A
cand27	10			S(PS)

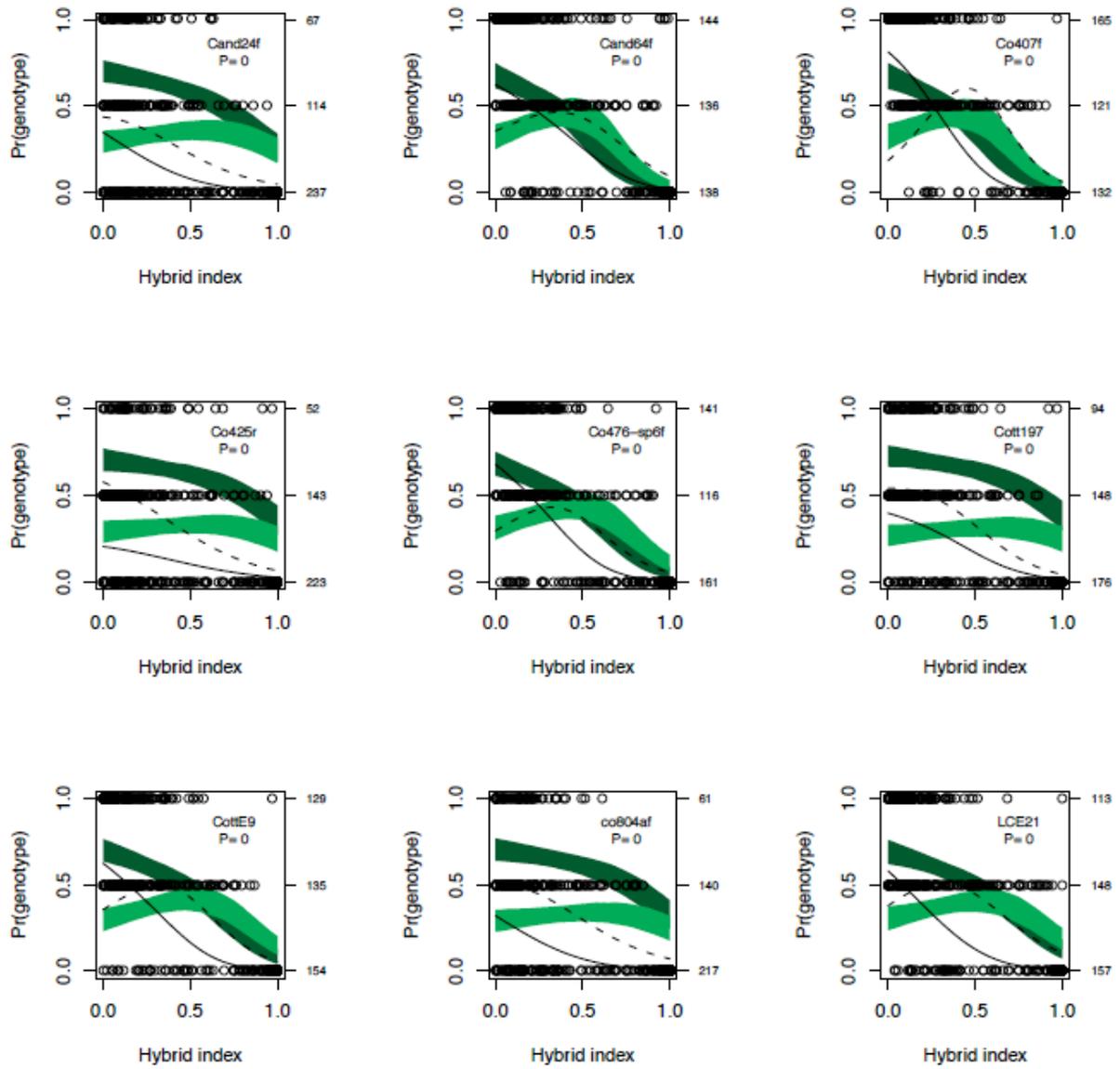
Locus	Cottus LG	Bröl	Naaf	Beide
co528	11			x
co379	11			S(NS)
cand26	11	S(PS)	S(NS)	S
co395	11			A
co577	12 or 19	S(PS UD)	N	
co78r	12 or 19			S(NS)
LCE78	12 or 19			A
cand24	12 or 19			S(NS)
co830	12 or 19	S(NS)	S(PS)	S
co346-sp6	13 or 24	S(NS)	N	
co547-m13	13 or 24			S(PS)
cand54	13 or 24			S(NS)
cand13	13 or 24			x
co293-sp6	13 or 24			S(NS)
co411	14 or 23			x
co445	14 or 23			S (NS)
cand34	14 or 23			S(PS)
co306	14 or 23			S (NS)
co421	14 or 23			S (NS)
co527	14 or 23			S (NS)
co302-sp6	15			A
Cott313	15			
LCE68	15			S(NS)
CottE9-1	15			S(NS)
co540	16			S(NS)
co492	16	S(NS)	N	
cand38	16			S(NS)
co484	16			A
Cott580	16			S(NS)
CottE7	17			S(NS)
co414	17	S(PS)	S(E)	S(E)
co93	18			S(NS)
co303	18	S(NS)	S(NS OD)	S(NS)
co317-m13	18			S(NS)
co449	20	S(NS)	S(OD)	
co485	20			S(NS)
co564-m13	20			S(NS)
co425	20			S(NS)
co468	20			S(NS)
Cott205	20			S(NS)
co491	21			x
co331-m13	21			x
co403	21			S(NS)
co417	21			A
LCE21-1	21			S(NS)
co340	21			S(PS)
co434-sp6	22			S(E UD)
CottE31	22			x
Cott173	?			x
cand29	?			x

Anhang 4 Bewertung der genomischen Klinalen für die untersuchten Hybridzonen. Abkürzungen für die verschiedenen Muster der Introgression: N = neutral, S = nicht neutral, PS = positive Selektion, NS = Negative Selektion, OD = Überdominanz, UD = Unterdominanz, E = Epistasis, IA = erhöhte Hybridisierung. x symbolisiert das Auftreten eines Musters. Loci, die in beiden Hybridzonen die gleichen Muster zeigten, wurden unter der Kategorie Beide erfasst.

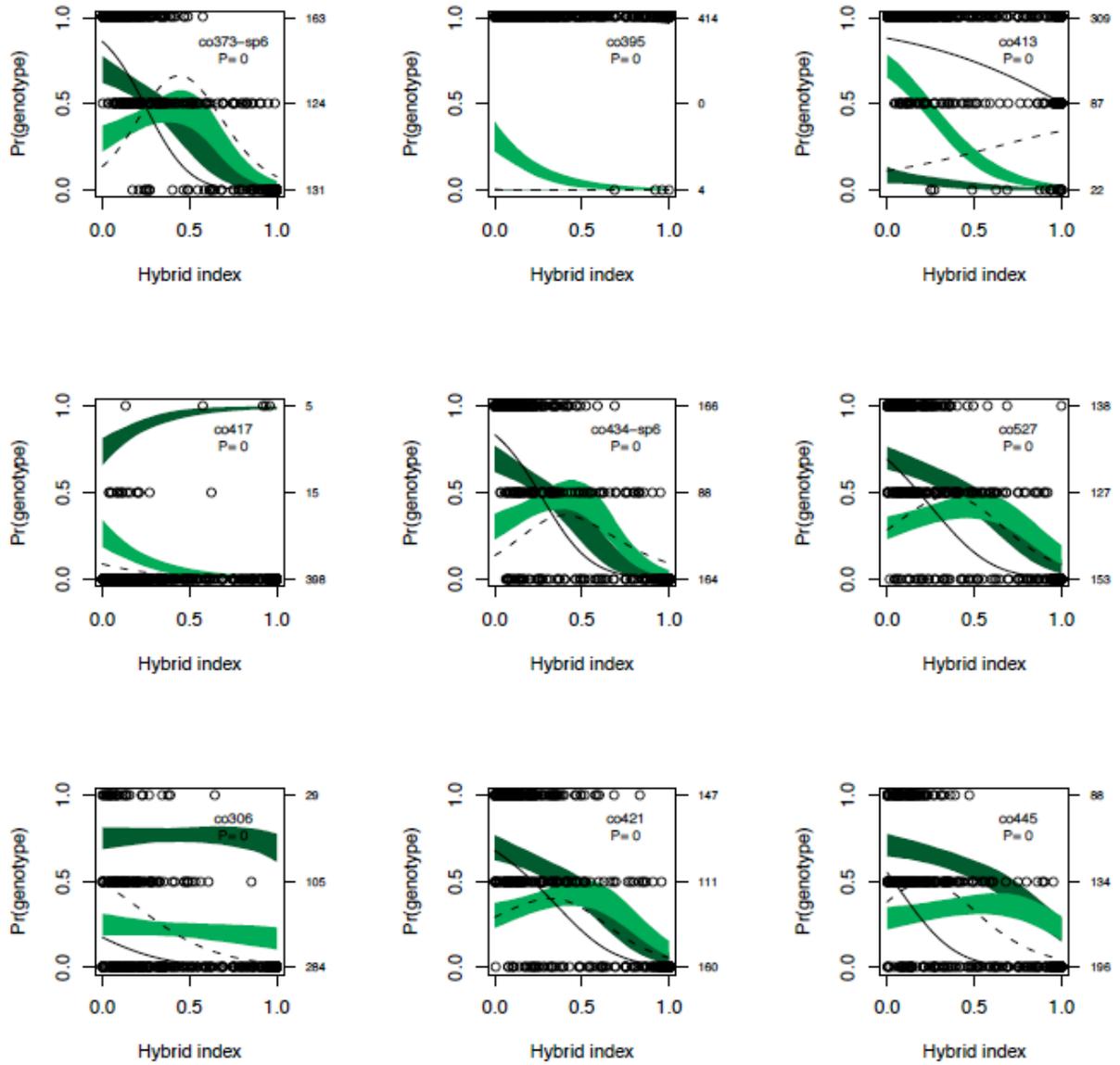
Locus	Bröl								Naaf								Beide							
	N	S	PS	NS	OD	UD	E	IA	N	S	PS	NS	OD	UD	E	IA	N	S	PS	NS	OD	UD	E	IA
cand24		x		x						x		x						x		x				
cand64	x									x		x	x											
co407		x			x		x			x		x						x						
co425		x		x						x		x						x			x			
co476-sp6		x		x						x		x						x			x			
cott197		x		x						x		x						x			x			
Cotte9		x		x						x		x						x			x			
co804		x		x						x		x						x			x			
LCE21		x		x						x		x						x			x			
co373-sp6		x			x		x		x															
co395																								
co413			x							x		x						x		x				
co417																								
co434-sp6		x				x	x			x				x	x			x				x	x	
co527		x		x						x		x						x			x			
co306		x		x						x		x						x			x			
co421		x		x						x		x						x			x			
co445		x		x						x		x						x			x			
co449		x		x						x			x					x						
co492		x		x					x															
co540		x		x						x		x						x			x			
Cott108		x		x						x		x						x			x			
CottE7		x		x						x		x						x			x			
LCE87		x		x						x		x						x			x			
cand27		x	x							x		x						x			x			
cand29		x		x						x		x						x			x			
cand3e		x		x						x		x						x			x			
co313		x		x						x		x						x			x			
co379		x		x						x		x						x			x			
co705		x		x																				
cott153		x		x						x		x	x					x			x			
cott173		x		x						x		x						x			x			
cott580		x		x						x		x						x			x			
cottE2		x		x						x		x						x			x			
co264		x		x						x		x						x			x			
co522		x		x						x		x						x			x			
cott68		x		x						x		x						x			x			
LCE68		x		x						x		x						x			x			
cand34		x	x							x		x						x			x			
co403		x		x						x		x						x			x			
co434-m13		x		x						x		x						x			x			
co484																								

Locus	Bröl								Naaf								Both							
	N	S	PS	NS	OD	UD	E	IA	N	S	PS	NS	OD	UD	E	IA	N	S	PS	NS	OD	UD	E	IA
co525		x		x						x		x						x		x				
co552		x		x						x		x						x		x				
co93		x		x						x		x						x		x				
cand54		x		x						x		x						x		x				
co303		x		x						x		x	x					x		x				
co312		x		x						x		x						x		x				
co317		x		x						x		x						x		x				
co376	x									x		x												
co46		x		x						x		x						x		x				
co78		x		x						x		x						x		x				
LCE78																								
co325		x	x							x		x						x						
co40		x		x						x		x		x				x		x				
co444		x			x					x			x					x			x			
co470		x		x	x					x		x	x					x		x	x			
co547-m13		x	x							x	x							x	x					
co572-m13		x		x		x				x		x		x				x		x		x		
cand39		x		x						x		x						x		x				
co311		x					x		x															
co564-m13		x		x						x		x						x		x				
co577		x	x			x				x														
co82		x		x						x		x						x		x				
co830		x		x						x	x							x						
cott205		x		x						x		x						x		x				
cott43		x	x							x		x						x						
co293-sp6		x		x						x		x						x		x				
co391-m13		x	x							x	x							x	x					
co414		x	x							x					x			x						
co539		x		x						x		x						x		x				
cott228		x		x						x		x						x		x				
cand38		x		x						x		x						x		x				
co302-sp6																								
co539-m13		x					x			x						x		x						
co569-m13		x		x						x		x						x		x				
co346-sp6		x		x						x														
co468		x		x						x		x						x		x				
co481		x	x			x				x														
cand26		x	x			x				x		x						x						
co340		x	x							x	x							x	x					
co349-m13		x				x	x			x				x	x			x				x	x	
co485		x		x						x		x						x		x				
co534	x									x	x													
co542																								
Gesamt	3	76	12	57	4	6	6	0	6	72	8	58	6	4	3	1	0	69	6	52	2	3	2	0

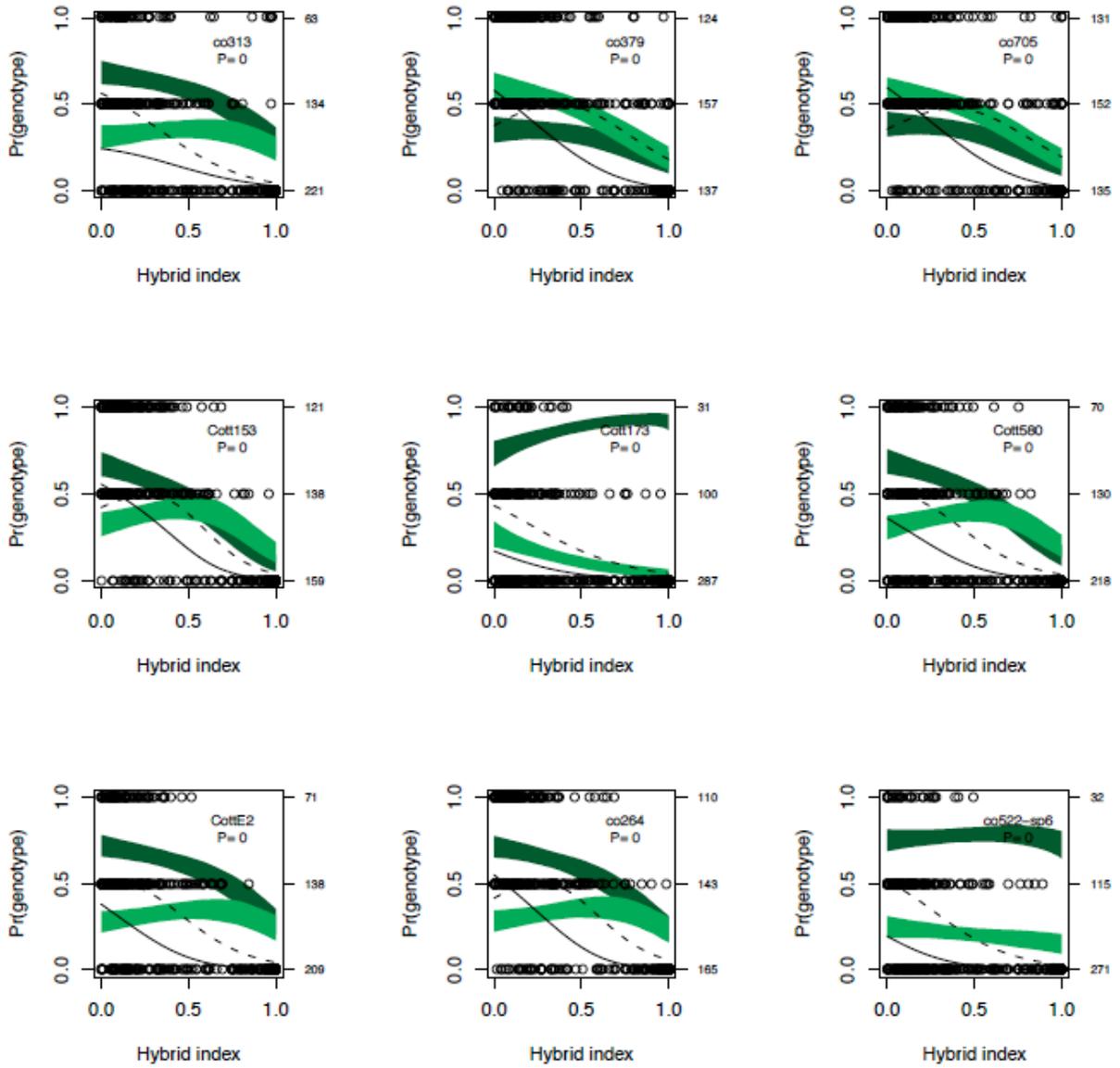
Anhang 5 Genomische Klinen der Bröl Hybridzone.



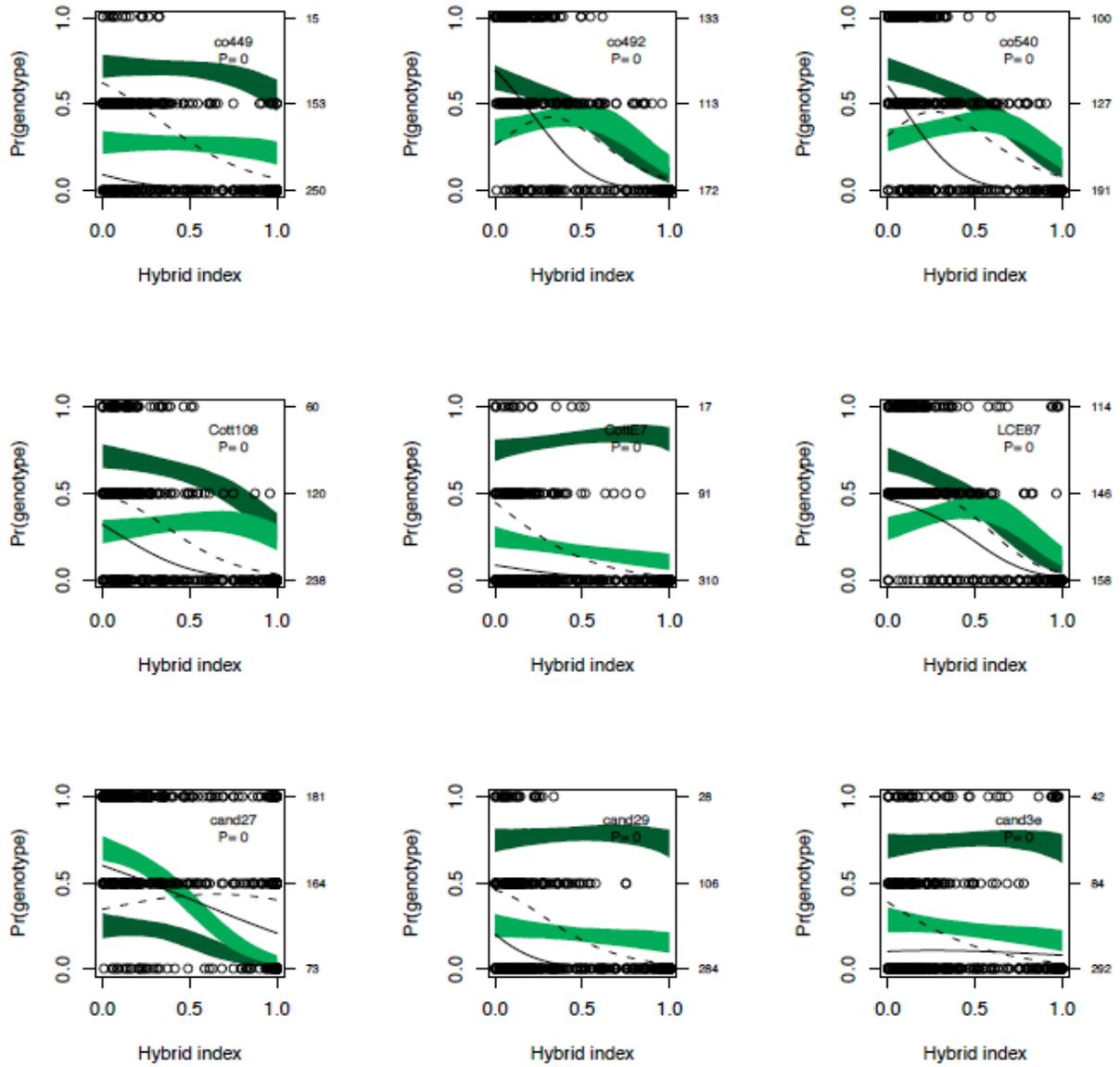
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



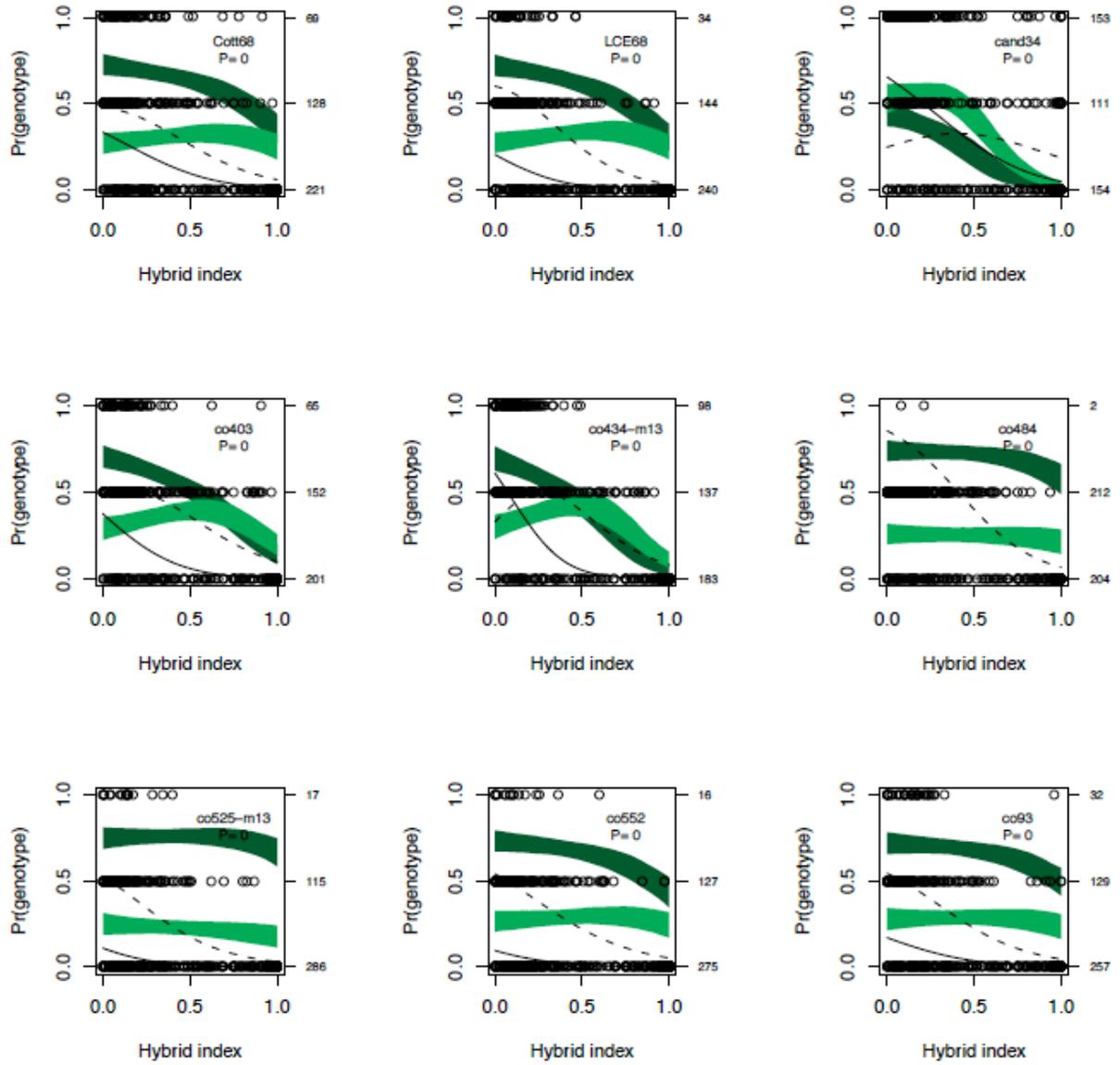
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



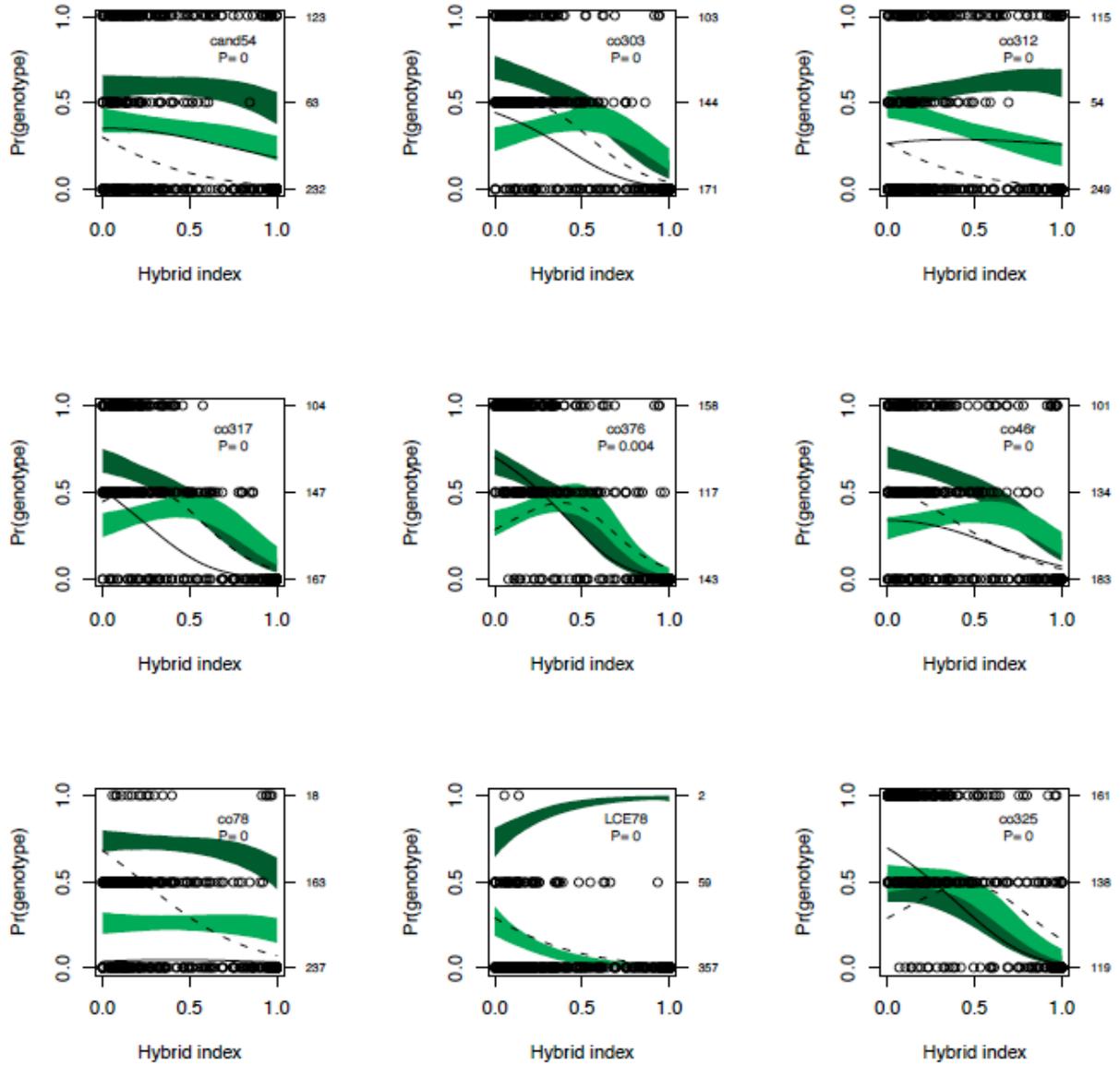
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



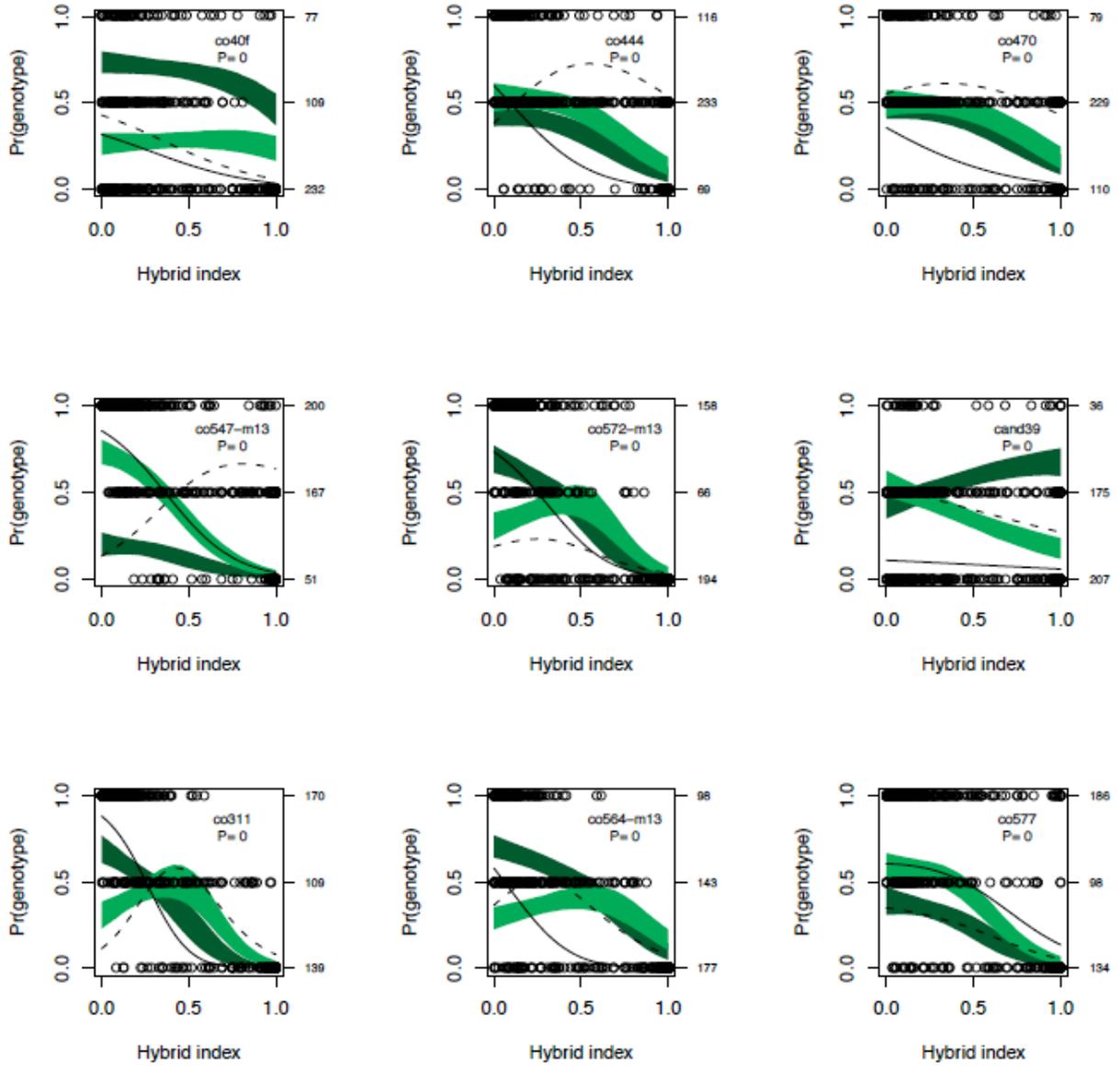
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



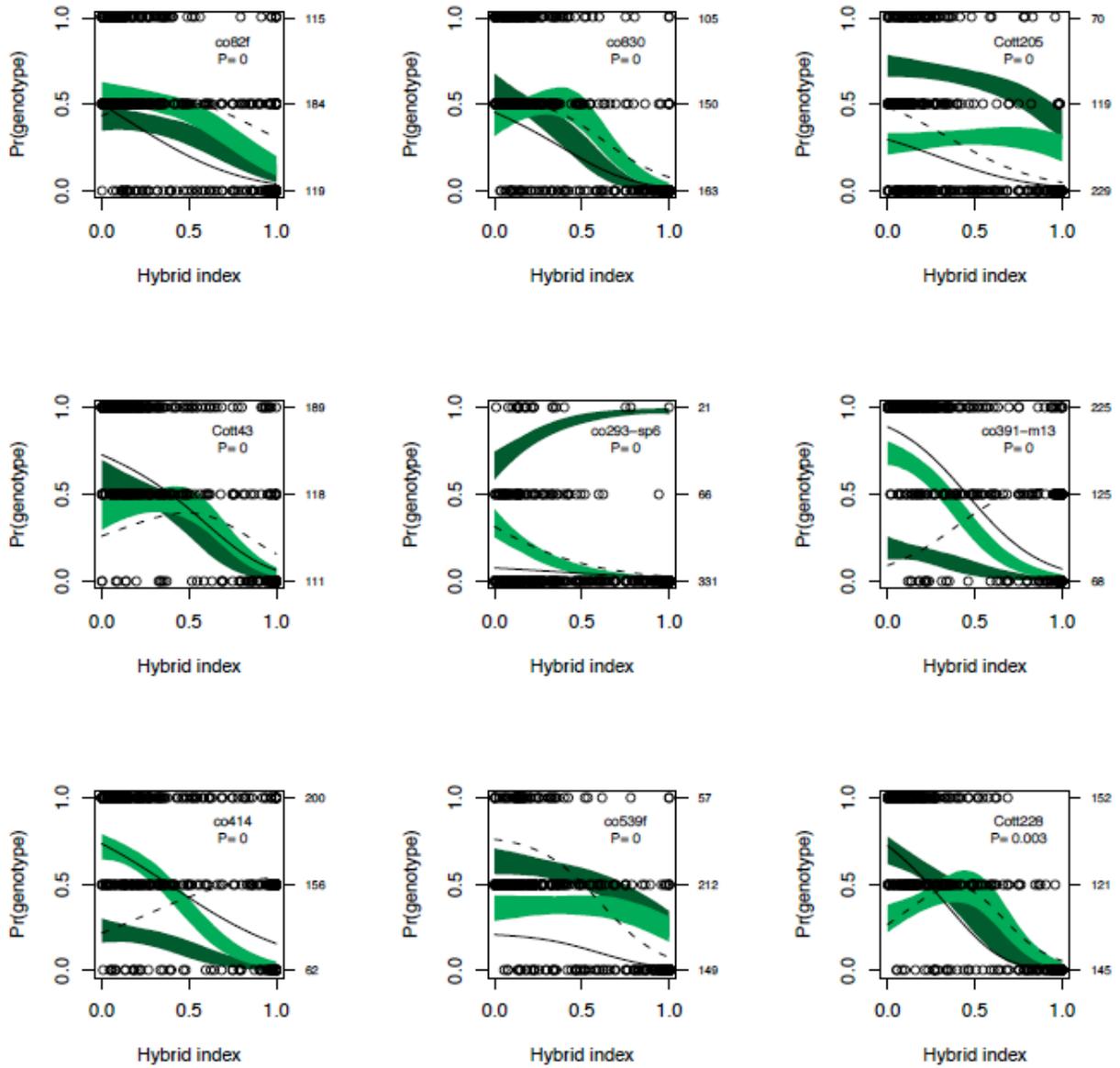
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



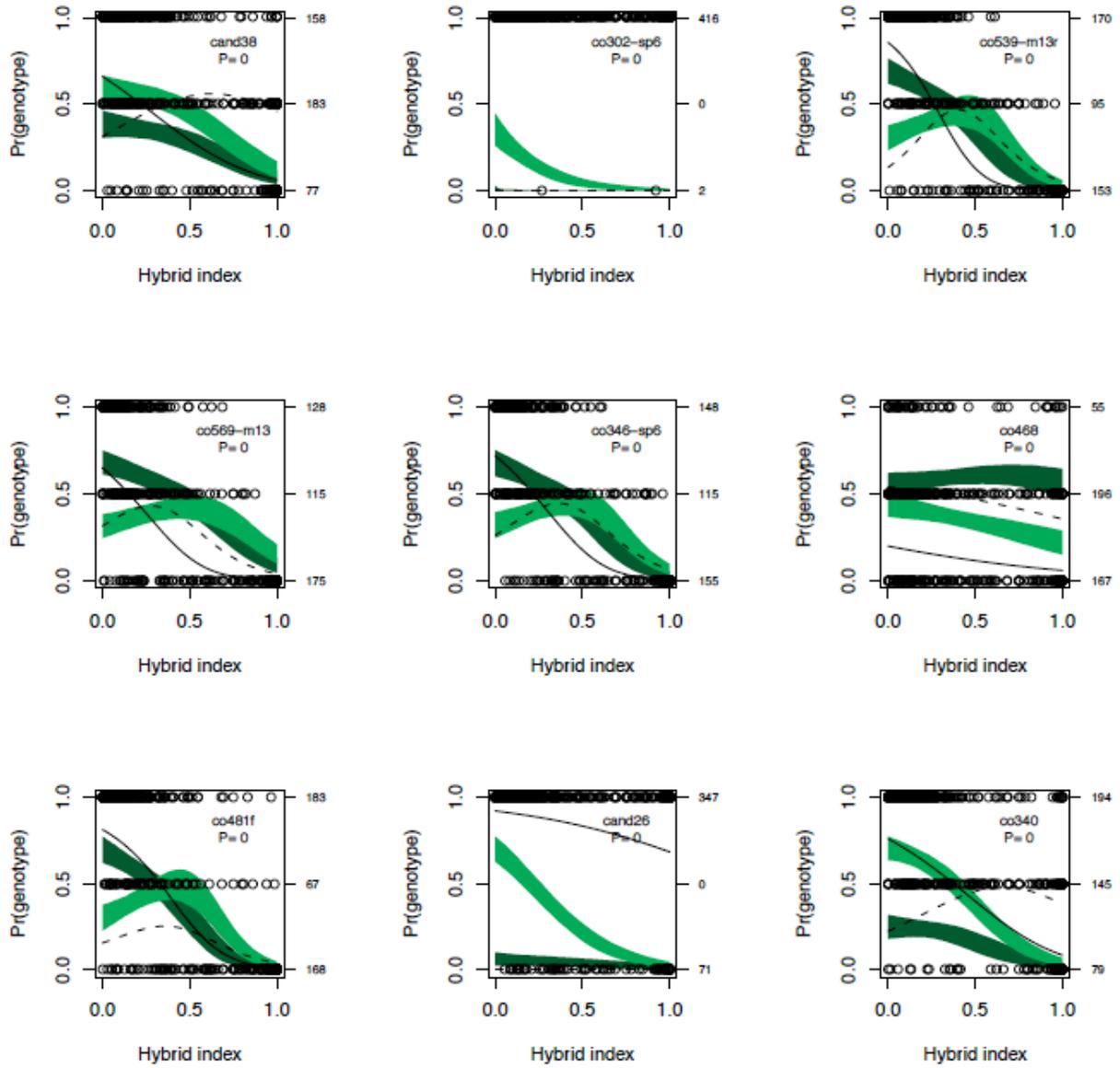
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



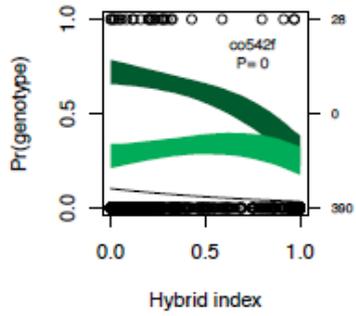
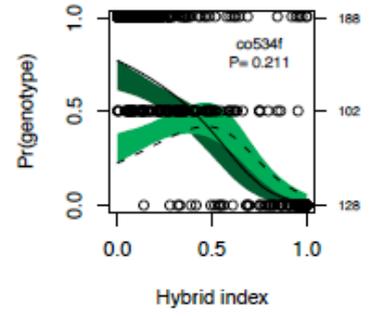
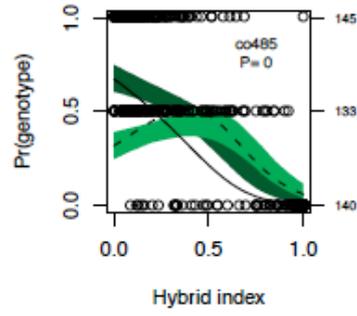
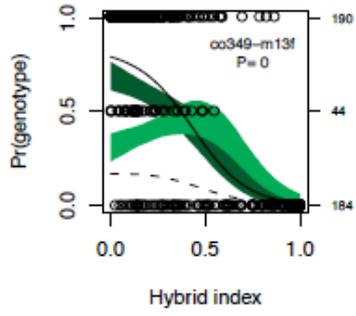
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



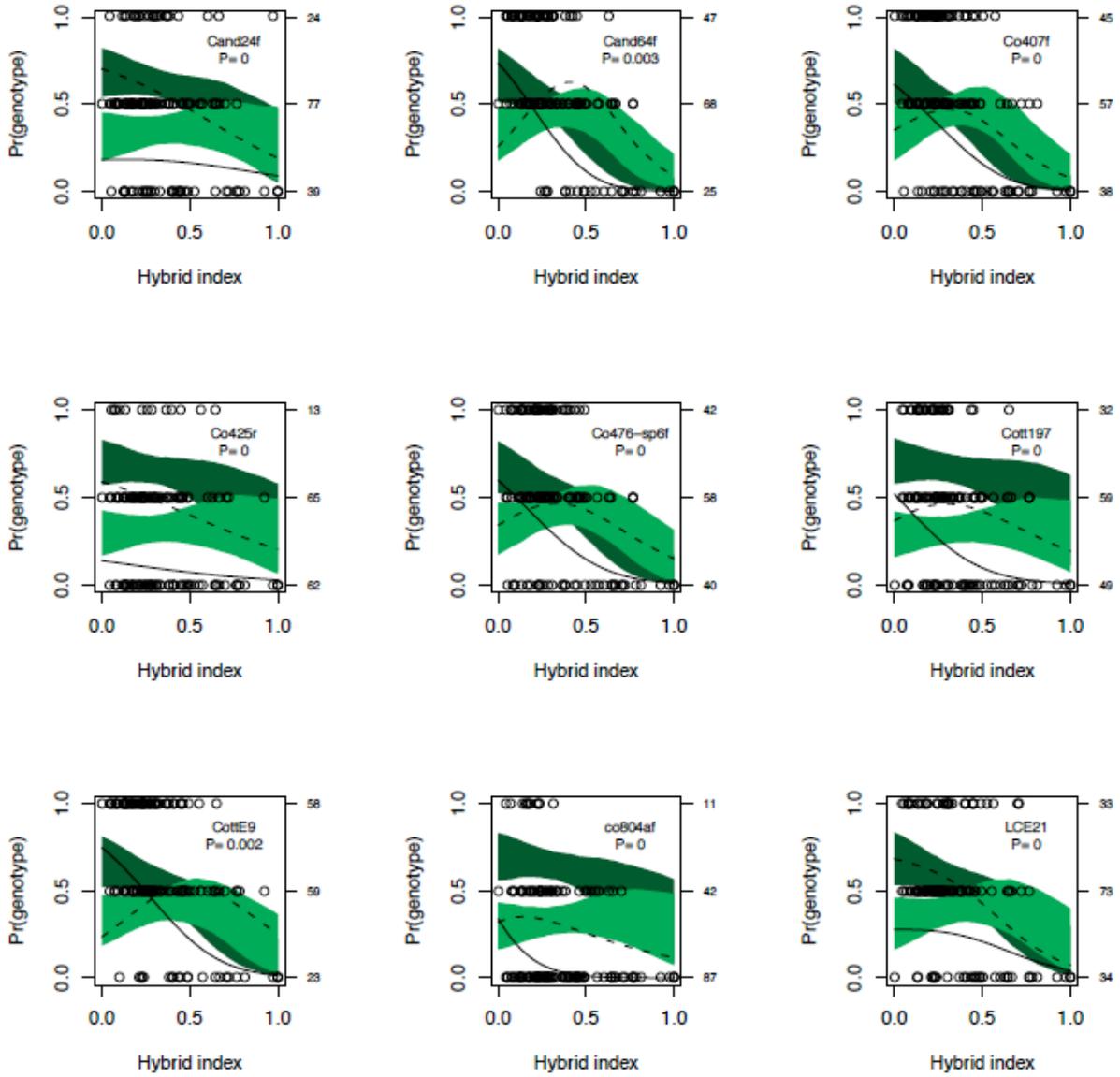
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



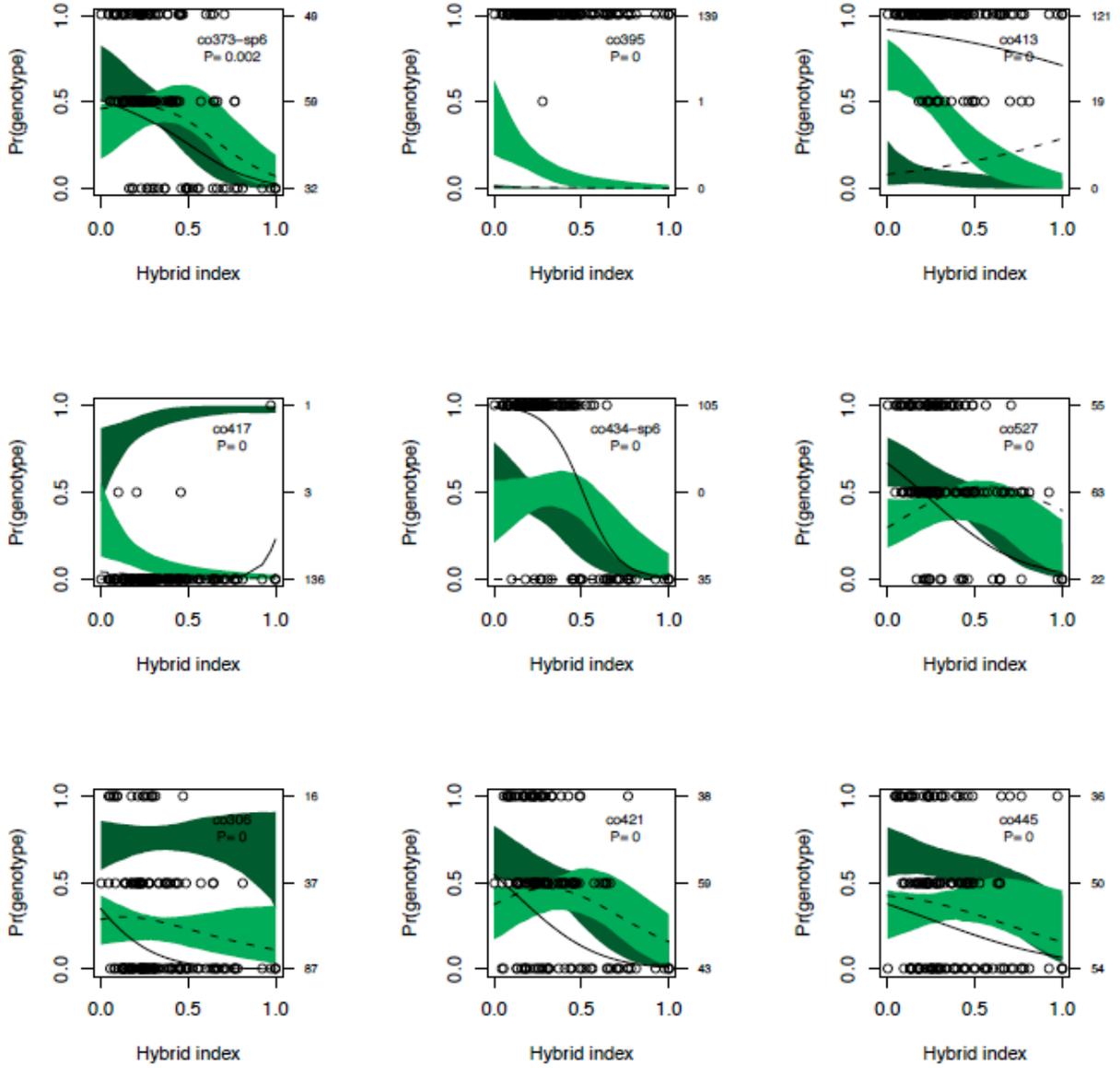
genomische Klinen der Bröl Hybridzone



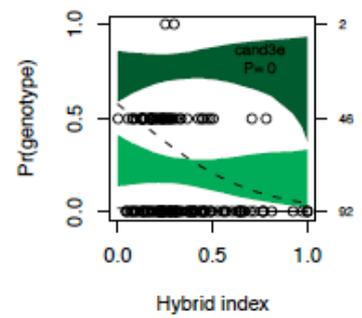
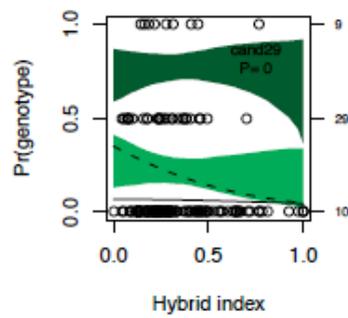
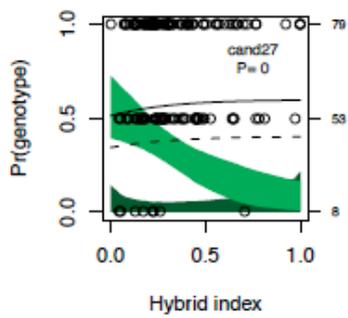
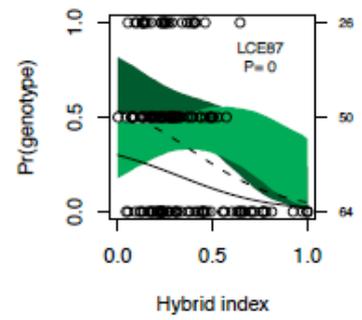
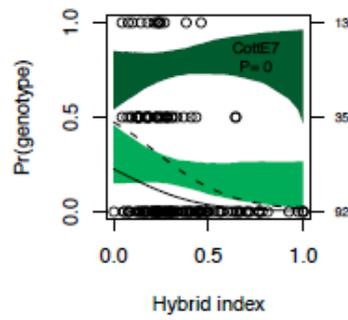
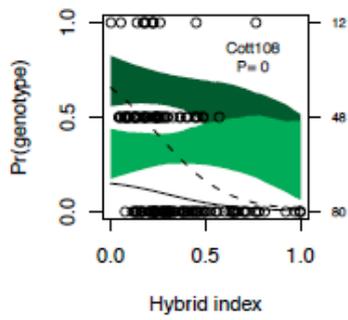
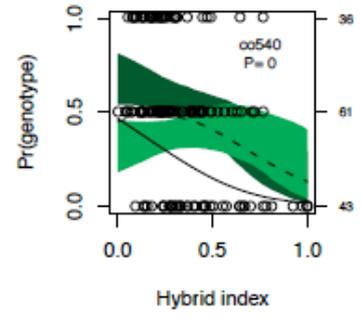
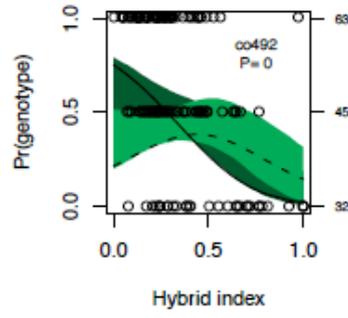
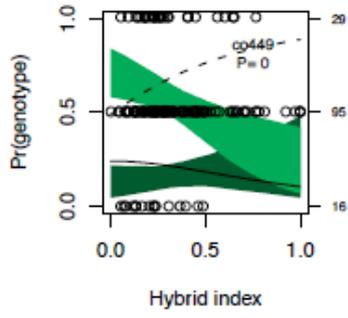
Anhang 6 Genomische Klinen der Naaf Hybridzone.



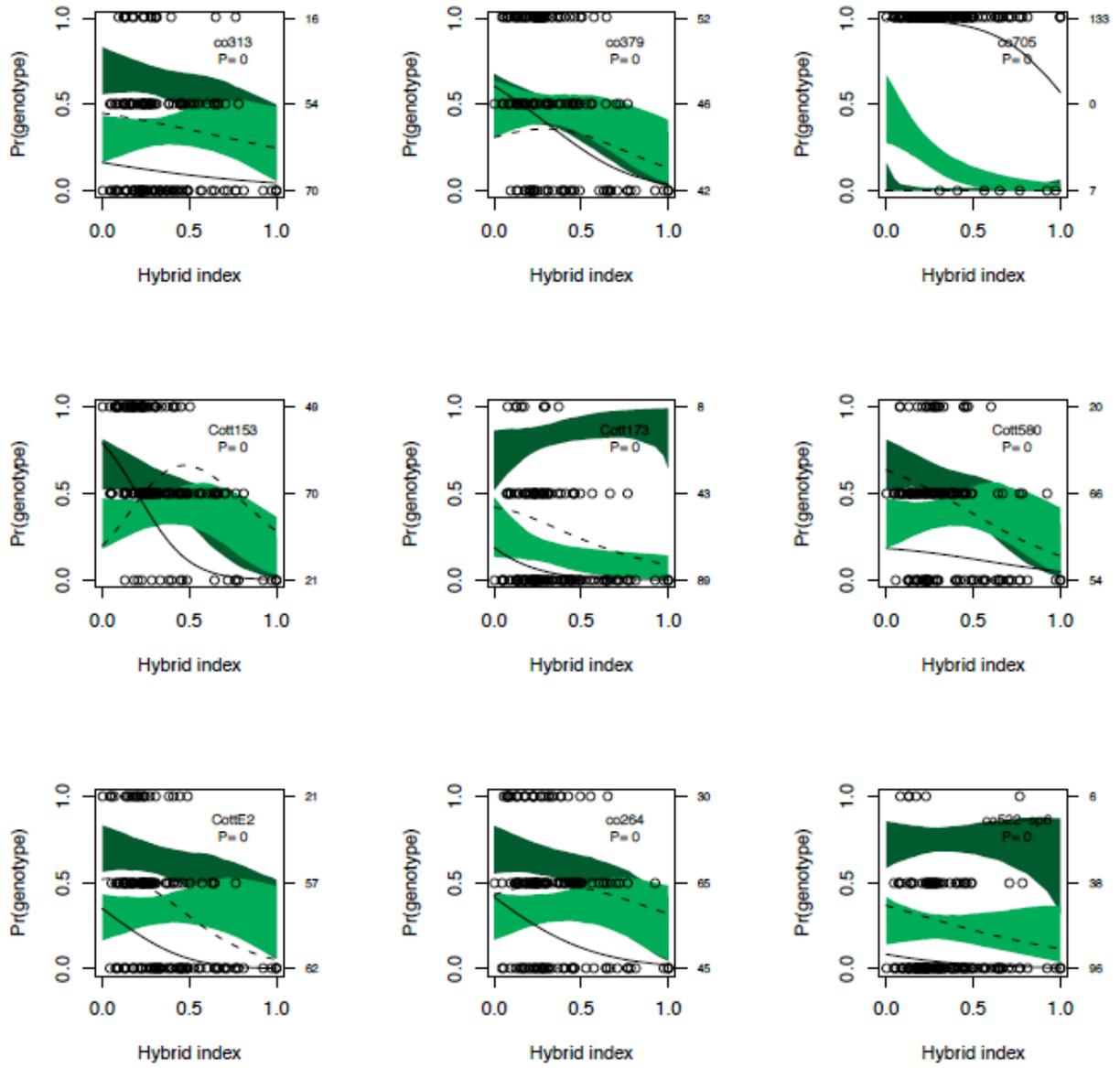
genomische Klinen Naaf Hybridzone



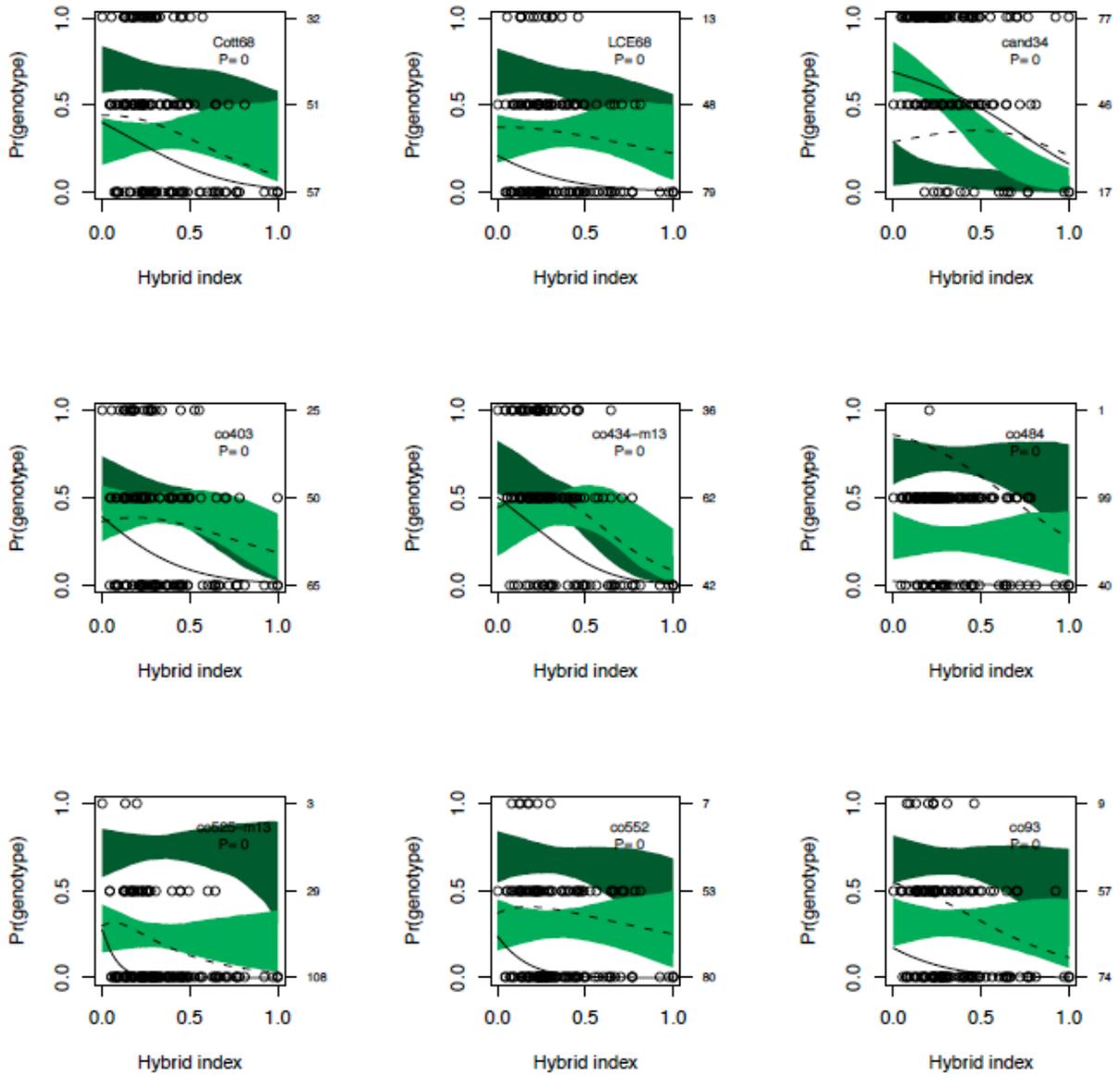
genomische Klinalen Naaf Hybridzone



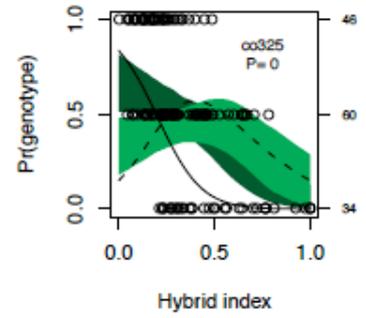
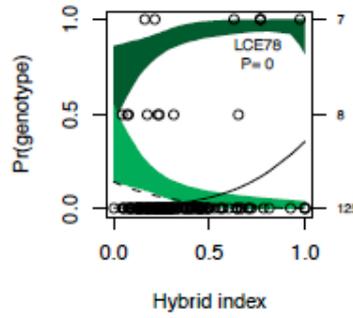
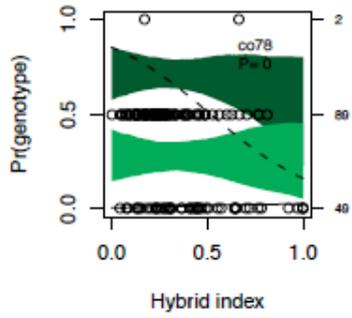
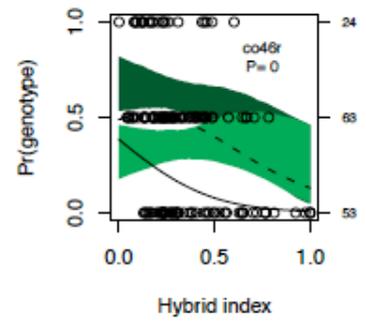
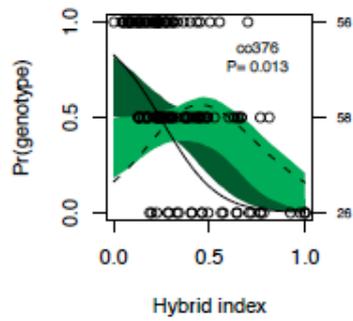
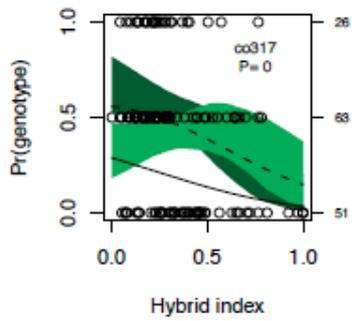
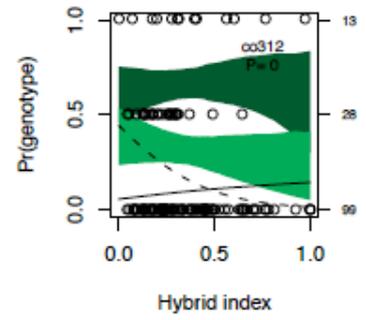
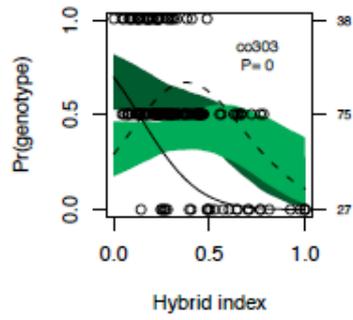
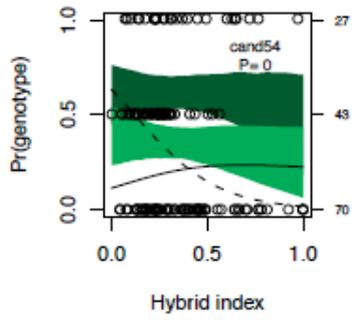
genomische Klinien Naaf Hybridzone



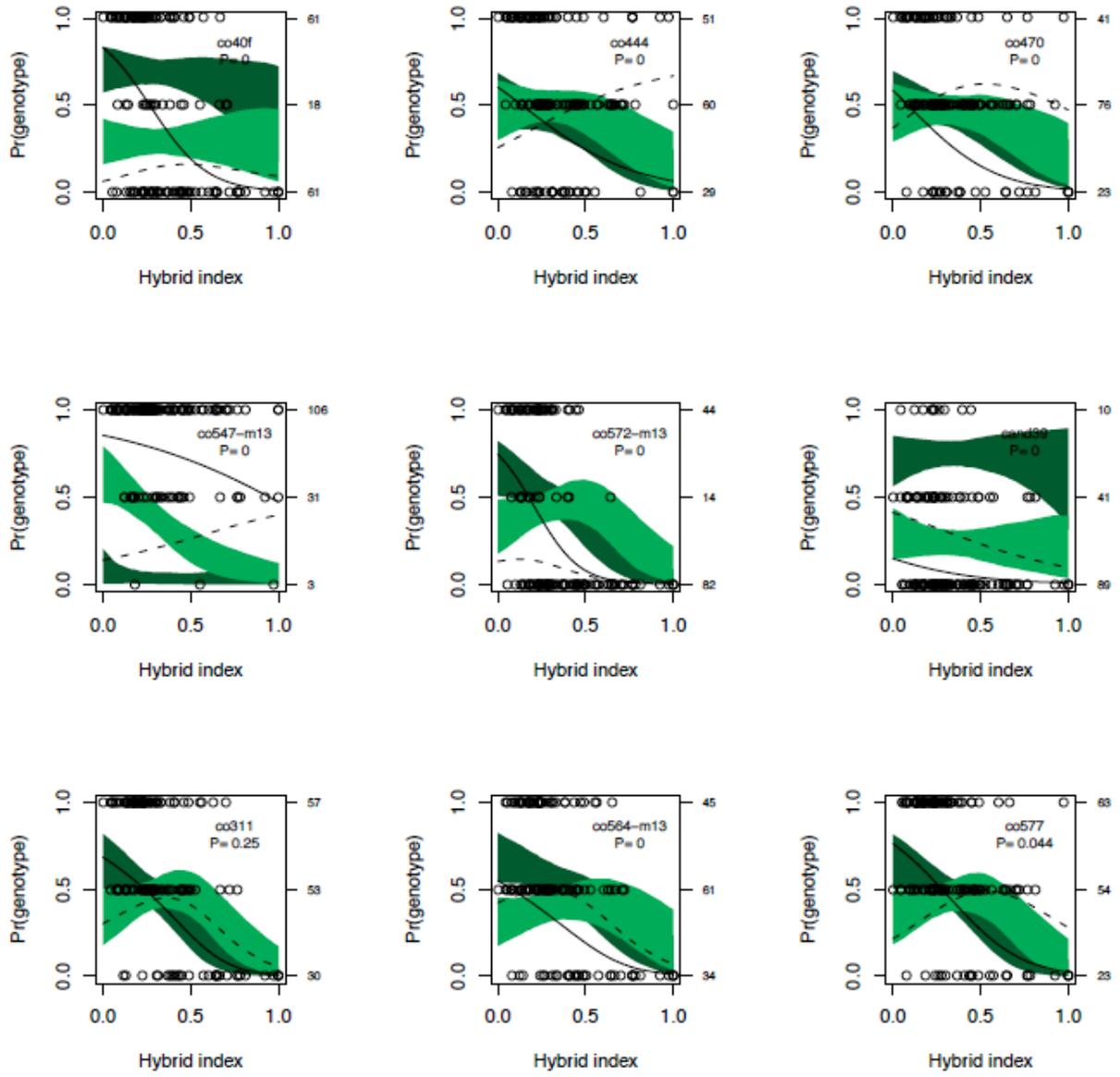
genomische Klinien Naaf Hybridzone



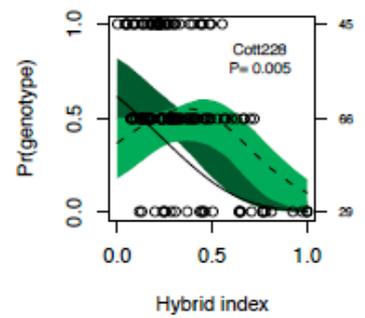
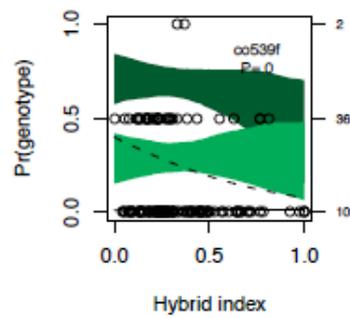
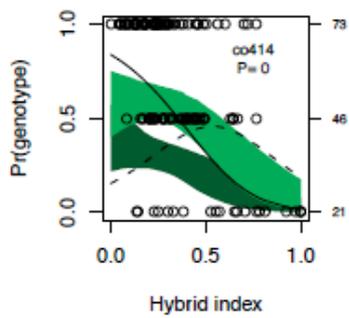
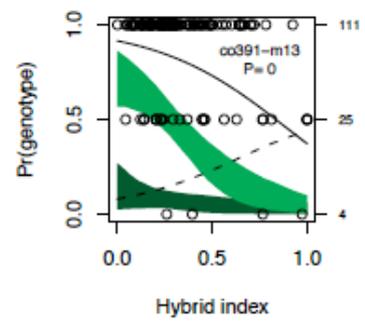
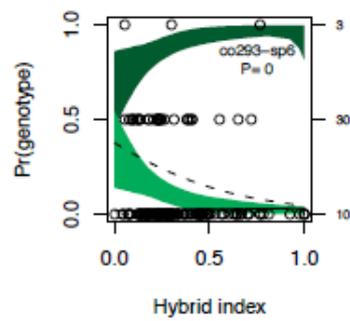
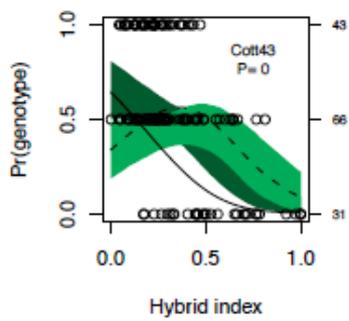
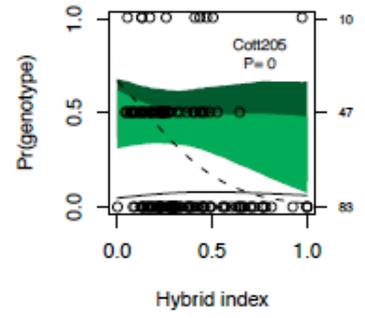
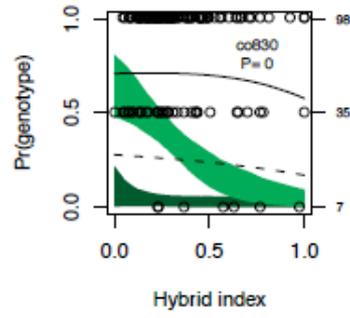
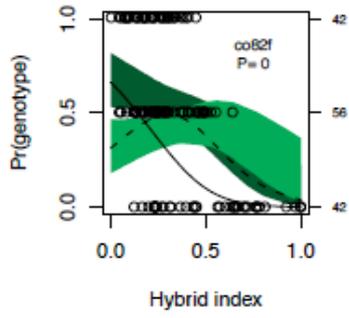
genomische Klinen Naaf Hybridzone



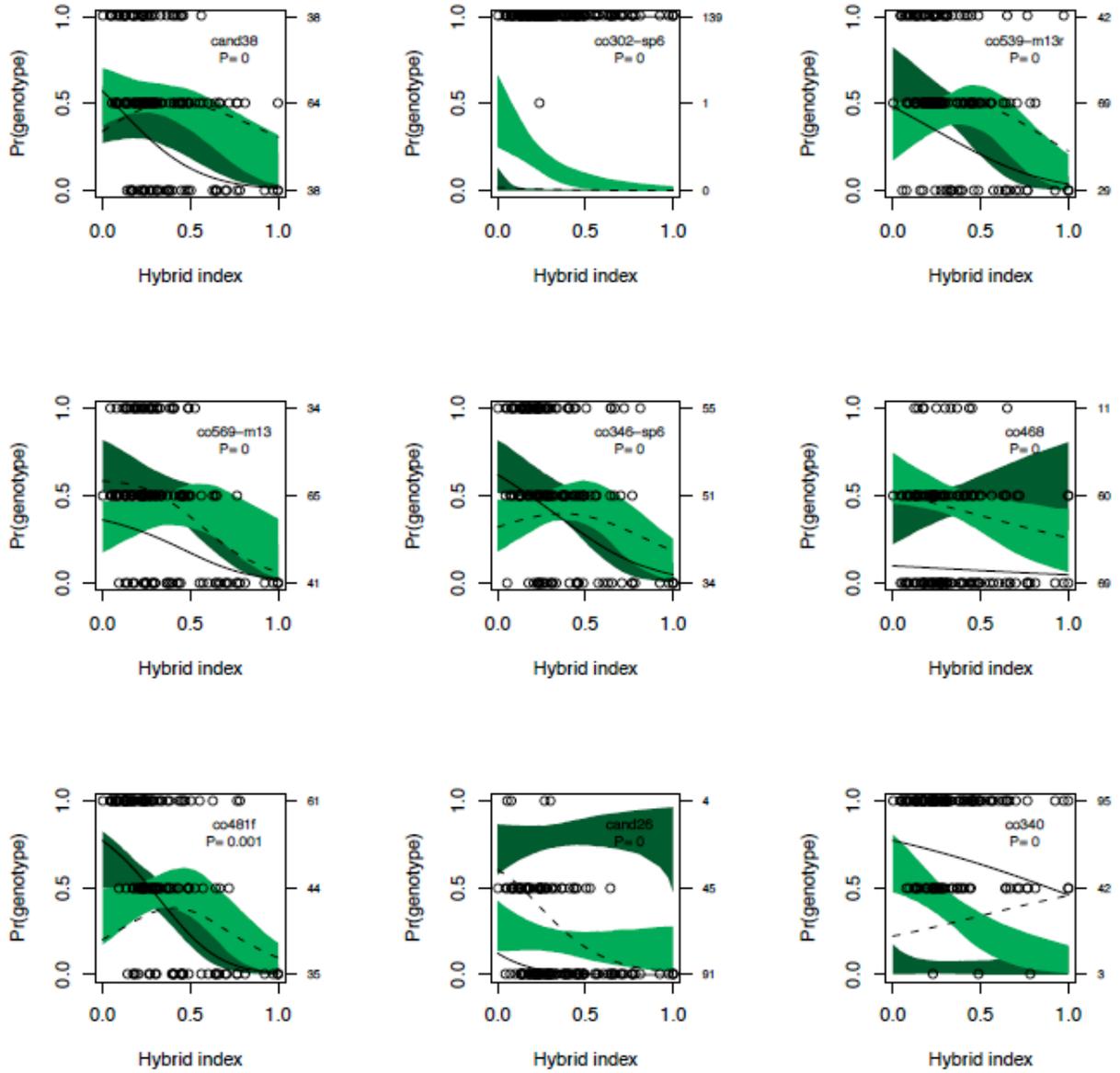
genomische Klinieen Naaf Hybridzone



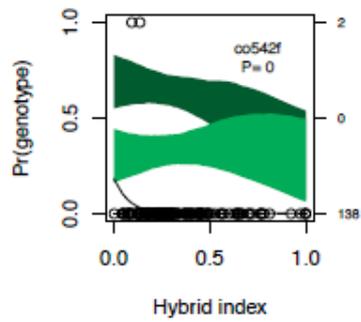
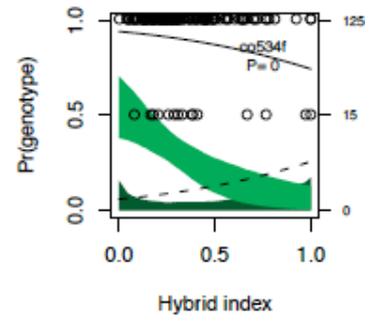
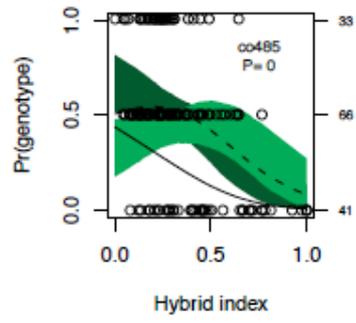
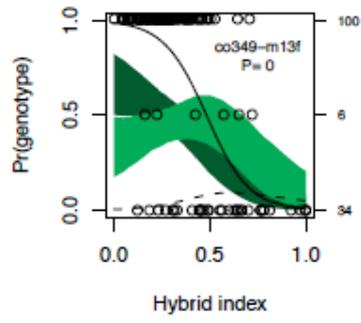
genomische Klinien Naaf Hybridzone



genomische Klinien Naaf Hybridzone



genomische Klinen Naaf Hybridzone



Erklärung

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

Plön, den

Jendrik Schroeder