

# **Sexuelle Kommunikation von *Drosophila*-Hybriden**

## **Bachelorarbeit**

vorgelegt an der Ernst-Abbe-Hochschule Jena  
Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie  
Biotechnologie

Hochschulbetreuer/in: Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Antje Burse

Betriebliche/r Betreuer/in: Herr Dr. Markus Knaden  
Firma/Institut: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

Bearbeitet von: Xinqi Dong  
Matrikelnummer: 645313  
Studiengang: Biotechnologie

# Verzeichnis

Verzeichnis.....	II
Abbkürzungsverzeichnis .....	III
1 Einleitung .....	1
2 Material und Methoden .....	4
2.1 Material.....	4
2.2 Methoden.....	5
2.2.1 Generierung von Hybriden.....	5
2.2.2 Bestätigung der Hybriden .....	7
2.2.3 Two-Choice-test .....	8
2.2.4 TDU-GC-MS (Thermal Desorption Unit - Gas Chromatographie - Massenspektrometrie).....	11
2.2.5 Bearbeitung der Statistik und der Abbildungen .....	12
3 Ergebnisse .....	13
3.1 Hybride Morphologie.....	13
3.2 Pheromonale und sexuelle Verhaltensmerkmale von Hybriden von <i>D.         melanogaster</i> mit den Arten der <i>simulans</i> -Untergruppe .....	16
3.3 Pheromonale und sexuelle Verhaltensmerkmale von Hybriden von-Arten der <i>simulans</i> -Untergruppe.....	19
4 Diskussion.....	24
4.1 Paarungsunterscheidung und Vorteilseffekt bei verschiedenen Hybriden .....	24
4.2 Das Pheromon des Hybriden kombiniert CHCs von beiden Seiten der elterlichen Arten.....	25
4.3 Mögliche Gründe für die Diskriminierung bei der Paarung und Vorteile.....	26
4.4 Hybridisierung im Anthropozän .....	27
Danksagung .....	29
Literaturverzeichnis .....	30
Selbständigkeitserklärung .....	33

# Abkürzungsverzeichnis

7-11-HD

7-11-Heptacosadien, 2

7-11-ND

7-11-Nonacosadien, 2

7-P

7-Pentacosen, 2

7-T

7-Tricosen, 2

CHCs

cuticular hydrocarbons, 23

cVA

11 cis Vaccenylacetat, 2

*D. mel-sec*

die Hybriden von *D. melanogaster* und *D. sechellia*, 12

*D. mel-sim*

die Hybriden von *D. melanogaster* und *D. simulans*, 12

*D. sec-mel*

die Hybriden von *D. sechellia* und *D. melanogaster*, 16

*D. sim-mel*

die Hybriden von *D. simulans* und *D. melanogaster*, 15

*D. sim-sec*

die Hybriden von *D. simulans* und *D. sechellia*, 12

IPCC

The Fourth Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 1

VOC

volatile organic compounds, 1

# 1 Einleitung

Ozon ist ein globaler atmosphärischer Schadstoff, der durch die chemische Reaktion von Stickstoff (NO<sub>x</sub>) und flüchtigen organischen Verbindungen (VOC) unter Einwirkung von Wärme und Sonnenlicht entsteht. Laut „The Fourth Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change“ (IPCC, 2007) ist troposphärisches Ozon, auch Oberflächenozon genannt, nach Kohlendioxid und Methan der drittgrößte anthropogene Beitrag zum Treibhauseffekt (Ladányi et al. 2012). Die Konzentration des Ozons an der Erdoberfläche betrug in der vorindustriellen Zeit etwa 10 ppbV oder weniger und ist seitdem auf Durchschnittswerte von 20-45 ppbV in Nordamerika gestiegen (Vingarzan 2004), mit Spitzenwerten von bis zu 120 ppbV während sommerlichen Ozonereignissen (Fiore et al. 2002; Vingarzan 2004). In städtischen Gebieten, z. B. Los Angeles, was das Gebiet mit der höchsten Ozonbelastung in den Vereinigten Staaten ist wurden 110 ppbV Ozon gemessen (Lin et al. 2017). In China wurden häufig stündliche Maximalwerte von 150 ppb gemessen (Li et al. 2017; Wang et al. 2017).

Insekten verlassen sich auf Geruchssignale, um Wirte zu lokalisieren, Partner zu finden und Feinde zu meiden. Viele Studien haben gezeigt, dass Ozon Wirts- oder Feindgerüche oxidiert und dadurch die Orientierung beeinträchtigt (Fuentes et al. 2013; Farré-Armengol et al. 2016; Cook et al. 2020). Die Forschung zeigt zum Beispiel, dass Ozon die von den Pflanzen abgesonderten Gerüche oxidiert und damit die Effektivität der Bestäuber verringern kann (Fuentes et al. 2013; Farré-Armengol et al. 2016; Cook et al. 2020), was sich nicht nur negativ auf die Reproduktion der Pflanze auswirkt, sondern auch auf die Nährstoffversorgung der Insekten.

Pheromone, die als chemische Stoffe definiert sind, die von einem Individuum freigesetzt werden, um das Verhalten eines anderen Tieres derselben Art zu beeinflussen (Karlson und Lüscher 1959), spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Kommunikation innerhalb der Arten, sondern dienen z.B. bei *Drosophila* auch dazu, die Paarungsgrenze zwischen nahe verwandten *Drosophila*-Arten zu wahren (Cobb und Jallon 1990; Coyne et al. 1994; Coyne 1996; Coyne und Charlesworth 1997; Blows und Allan 1998; Higgie et al. 2000).

Sexual- und Aggregationspheromone, die der intraspezifischen Kommunikation bei Insekten dienen, werden ebenfalls durch Ozon verändert, was den Fortpflanzungsprozess der Insekten stören kann (McFrederick et al. 2008). Vor kurzem wurde von Jiang et al. gezeigt, dass Ozon die sexuelle Kommunikation von Drosophiliden weitreichend stört, einschließlich einer verringerten Akzeptanz der Weibchen gegenüber ozonisierten Männchen und eines verstärkten Balzverhaltens der Männchen untereinander, da die Erkennung der Geschlechter durch oxidierte männliche Pheromone korrumpiert wird (Jiang et al., 2023).

Aufgrund der nahen Verwandtschaft gehören die Arten *Drosophila melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia* zur *melanogaster* Artengruppe, wobei *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia* zusätzlich der *simulans* Untergruppe zugeordnet werden. *Drosophila melanogaster* ist als Kulturfolger und kosmopolitisches

Lebewesen in der Welt weit verbreitet, sein Ursprung wird in der Afrotropis vermutet, da die meisten verwandten Arten in dieser Region endemisch sind (David et. al, 2007).

*Drosophila simulans* ist eine weitere kosmopolitische Art, die sich vor 5,4 Millionen Jahren von *D. melanogaster* abgespalten hat (Tamura et. al, 2004).

Die endemische Art *Drosophila mauritiana* ist auf der Insel Mauritius im Indischen Ozean beheimatet (David et. al, 1989). *Drosophila sechellia* stammt von den Seychellen und hat sich auf die Früchte von *Morinda citrifolia* als einzige Nahrungsquelle spezialisiert (David et. al, 2007) (Abb.1).

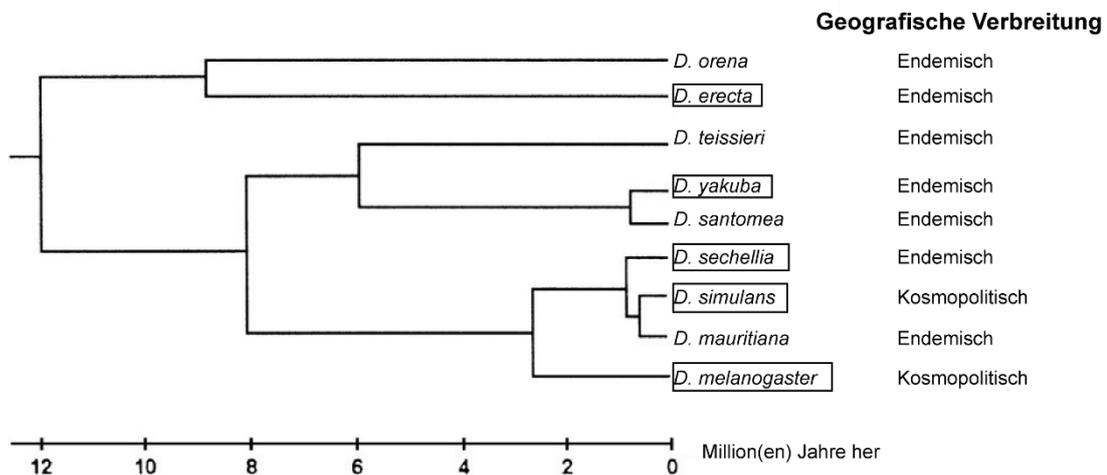


Abbildung 1: Konsens-Phylogenie der neun Arten in der *melanogaster* Artengruppe. Arten, deren gesamtes Genom derzeit sequenziert ist, sind in Kästen dargestellt. Informationen zur Ökologie und geografischen Verbreitung sind ebenfalls angegeben. Die Divergenzzeiten sind noch ungefähre Angaben. (Lachaise and Silvain 2004; Tamura et al. 2004).

Die Pheromone dieser vier Arten unterscheiden sich in Zusammensetzung und Menge und tragen zur Isolierung der Arten voneinander bei. Die wichtigsten Pheromone dabei sind nicht-kutikuläre und kutikuläre Kohlenwasserstoffe, darunter das flüchtige 11-cis-Vaccenylacetat (cVA) und die kutikulären Kohlenwasserstoffe 7-Tricosen (7-T), 7-Pentacosen (7-P), 7-11-Nonacosadien (7-11-ND) und 7-11-Heptacosadien (7-11-HD). Alle Männchen der *melanogaster*-Gruppe produzieren im Geschlechtapparat cVA das während der Paarung auf das Weibchen übertragen wird, um zu verhindern, dass sich andere Männchen mit dem frisch befruchteten Weibchen paaren. Auch die Pheromone 7-T und 7-P werden von den Männchen dieser vier Arten ausgeschüttet und sind bei *D. melanogaster* und *D. sechellia* männlich-spezifische Verbindungen, nicht aber bei *D. simulans* und *D. mauritiana*. 7-11-ND und 7-11-HD sind bei *D. melanogaster* und *D. sechellia* Komponenten die für Weibchen spezifisch sind, und die das Paarungsverhalten beeinflussen.

Bei den Weibchen von *D. simulans* und *D. mauritiana* ist 7-T die wichtigste Verbindung. Die oben genannten Verbindungen enthalten C-C-Doppelbindungen, die von Ozon zersetzt werden können, was die chemische Struktur und damit Wirksamkeit beeinträchtigt. Gegenwärtige Studien haben gezeigt, dass die Ozonbelastung über die

Degradierung der artspezifischen Pheromone zur Hybridisierung zwischen nahe verwandten *Drosophila*-Arten führen kann (Jiang et al. submitted).

In dieser Arbeit untersuche ich, inwiefern Hybride im Paarungsverhalten möglicherweise Heterosis aufweisen.

Der Begriff "Heterosis" bezieht sich auf das Phänomen, dass Nachkommen aus Kreuzungen zwischen unterschiedlichen Arten eine größere Biomasse, Entwicklungsgeschwindigkeit und Fruchtbarkeit aufweisen als es die Elterngeneration tut (Birchler et. al, 2010). Beispielsweise entstehen durch Artenkreuzung im Zuge der Domesitkation ergiebiger oder vorteilhaftere Nachkommen wie das beim Haushund (*Canis lupus*) oder Mais (*Zea mays*) der Fall ist. Der Heterosis-Effekt in der Landwirtschaft und der Tierzucht wird aufgrund des enormen finanziellen Bedarfs und der großen Nachfrage nach Nahrungsmitteln heutzutage sehr gut untersucht. Als Modellorganismus wurden Hybride von *Drosophila melanogaster* und ihrer nahverwandten Arten schon auf Heterosis untersucht (Dobzhansky, 1950; Houle, 1989), jedoch befassen sich nur sehr wenige Studien mit der Heterosis bei der sexuellen Kommunikation. Nach der r/K-Selektionstheorie ist *Drosophila* ein Organismus, der sich auf eine erhöhte Anzahl von Nachkommen auf Kosten der elterlichen Investitionen konzentriert (r-Strategie). Vorteile beim Paarungsverhalten sind eine wichtige Voraussetzung für eine erhöhte Anzahl der Nachkommen. Daher wollen wir herausfinden, ob die Hybriden aus verschiedenen Elternkonstellationen von *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* gegenüber reinerbigen Tieren Paarungsvorteile zeigen.

Unsere Studie verwendet eine umfassende Methode, um die Heterosis der sexuellen Kommunikation bei *Drosophila*-Hybriden zu aufzudecken. Dafür wurden als erstes die Hybriden anhand der Geschlechtsverteilung und der Morphologie der männlichen Genitalien identifiziert. Dann wurde die Körperchemie der Hybriden mit Hilfe der Thermodesorptionseinheit mit Gaschromatographie und Massenspektrum untersucht. Schließlich wurden ‚Two-Choice‘-Balztests durchgeführt, um einen gegebenenfalls vorhandenen Paarungsvorteil sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Hybriden zu bewerten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

In dieser Arbeit wurden folgende Wildtypen Fliegenarten verwendet: *Drosophila melanogaster* strain Canton-s (aus der Zucht der Abteilung), *Drosophila simulans* (Stock Nummer: 14021-0251.01), *Drosophila mauritiana* (Stock Nummer: 14021-0241.150) und *Drosophila sechellia* (Stock Nummer: 14021-0248.07).

Alle Arten wurden im *The National Drosophila Species Stock Center der Cornell Universität* (<https://blogs.cornell.edu/drosophila/>) erworben, mit Standard Futter (Zusammensetzung siehe Tab. 2.1) versorgt, unter 25 °C mit 12 h Licht : 12 h Dunkel und 50% relative Luftfeuchtigkeit gehalten und alle 12 Tage in frische Röhren umgesetzt.

Das Züchten und die Behandlung für die Fliegen unterliegt keiner ethischen Regulation.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Standardfutters der *Drosophila*

Bestandteil	Einheit	Menge 1000ml
Rübensirup	[g]	118
Bierhefe	[g]	11
Wasser heiß	[ml]	202
Agarpulver	[g]	4,1
Wasser kalt		270
Maisgrieß	[g]	95
Mit Wasser heiß auffüllen	[ml]	270
Wasser heiß zum Nachspülen	[ml]	68
Wasser kalt	[ml]	108
Propionsäure	[ml]	2,4
Nipagin 30%	[ml]	3,3

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generierung von Hybriden

Frisch geschlüpfte Fliegen der verschiedenen Arten wurden durch Kohlendioxid betäubt. Unter dem Mikroskop OLYMPUS SZ2-ILST wurden die Fliegen nach Geschlecht mithilfe der morphologische Geschlechtseigenschaft getrennt, und separat in Gruppen gesammelt, um männliche und weibliche Jungfrauen zu bekommen. Die Sammlungen erfolgten alle 6h, weil sonst die Möglichkeit besteht, dass die Tiere zu kopulieren beginnen. Jungfrauen wurden für 7 Tage gehalten, um sicher zu stellen, dass die Tiere geschlechtsreif sind, und beim Absammeln der Jungfrauen nicht aus Versehen ein Männchen mit gesammelt worden war. Wenn Spuren von Maden vorhanden waren, wurden die weiblichen Tiere nicht mehr verwendet.

Nach 7 Tagen wurde das Vorhandensein der Madenspur in den Futterröhrchen kontrolliert. Die Röhrchen mit Madenspur wurden entsorgt, die Jungfrauen in den Röhrchen, in den keine Madenspur sichtbar war, Kreuzung bereit.

Für die Kreuzung wurden alle Arten von *Drosophila* jeweils 15 weibliche und 15 männliche Fliegen eingesetzt (Tab. 2.2.1). Die Eltern wurden entfernt, wenn die erste Puppe vorhanden war.

Tabelle 2.2.1: Kreuzung von vier Arten der *melanogaster* Artengruppe

	<i>D. melanogaster</i>	<i>D.mauritiana</i>	<i>D. simulans</i>	<i>D. sechellia</i>
<i>D. melanogaster</i>	-	<i>D. mel</i> ♀ × <i>D. mau</i> ♂	<i>D. mel</i> ♀ × <i>D. sim</i> ♂	<i>D. mel</i> ♀ × <i>D. sec</i> ♂
<i>D. mauritiana</i>	<i>D. mau</i> ♀ × <i>D. mel</i> ♂ keine Nachkommen	-	<i>D. mau</i> ♀ × <i>D. sim</i> ♂ keine Nachkommen	<i>D. mau</i> ♀ × <i>D. sec</i> ♂ keine Nachkommen
<i>D. simulans</i>	<i>D. sim</i> ♀ × <i>D. mel</i> ♂	<i>D. sim</i> ♀ × <i>D. mau</i> ♂	-	<i>D. sim</i> ♀ × <i>D. sec</i> ♂
<i>D. sechellia</i>	<i>D. sec</i> ♀ × <i>D. mel</i> ♂	<i>D. sec</i> ♀ × <i>D. mau</i> ♂	<i>D. sec</i> ♀ × <i>D. sim</i> ♂ keine Nachkommen	-

## 2.2.2 Bestätigung der Hybriden

Um zu beurteilen, ob die Nachkommen Hybriden sind, wurden die zwei unten genannten Kriterien verwendet:

*Geschlechts-Quotient:* Dieses Kriterium gilt nur für Kreuzungen Arten der *simulans* Untergruppe mit *D. melanogaster*. Denn bei den Kreuzungen mit *D. melanogaster* als weiblichem Elternteil und *simulans*-Gruppe als männlichem Elternteil, sind alle Nachkommen weiblich. Umgekehrt sind alle Nachkommen männlich (Tsacas et. al, 1985), wenn die *simulans*-Untergruppe als weiblicher Elternteil dient und *D. melanogaster* als männlicher. Waren die Nachkommen der Kreuzungen entweder alle männlich oder weiblich, konnte man sicher sein, dass es sich bei diesen Tieren um Hybride handelt.

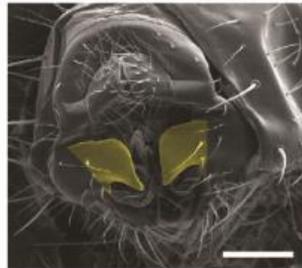
*Hybriderkennung aufgrund der Morphologie der männlichen Geschlechtsorgane:* Wenn Arten innerhalb der *simulans* Untergruppe gekreuzt werden, weisen die Nachkommen beide Geschlechter auf. Die Morphologie der Hinterlappen des männlichen Genitalbogens zeigen große Unterschiede in Hinblick auf Größe und Form inmitten der nahverwandten Arten von *Drosophila* (Masly et. al, 2011), weshalb diese als Kriterium zur Beurteilung der Hybriden dienen können.

Alle Präparationen wurden unter einem OLYMPUS SZ2-ILST Mikroskop durchgeführt. Die männlichen Hybriden wurden unter Kohlendioxid betäubt und auf das Kohlendioxid-Pad platziert. Einzelne Fliegen wurden mit einer Dumont 5SF Pinzette fixiert und deren Hinterleib wurde mit einem Skalpell abgeschnitten. Davon wurden der sogenannte Posterior lobe und der Prim clasp abpräpariert (Abb.2.2.2). Dieses Stück wurde dann auf einen Standard-Objekträger (MARIENFELD HistoBond + 76x26x1 mm) übertragen. Auf diesem befand sich ein Salicylsäure-methylester (99 % Sigma-Aldrich) Tröpfchen (wirkt fäulnishemmend). Der Tropfen mit dem Gewebe wurde mit einem Objekträger abgedeckt (MARIENFELD HistoBond + 76x26x1 mm).

Die Morphologie der präparierte Geweben wurden unter einem ZEISS ApoTome.2 AXIO Zoom .V16 Mikroskop fotografiert, mit ApoZ 1.5 x/ 0,37 FWD 30mm Objektiv, 20 Fach Vergrößerung und 20 % Lichtwert als Einstellungsparameter. Abschliessend wurden die Aufnahmen mit der Standardmorphologie von den Ursprungsarten und den Hybriden verglichen, um die Fliegen herauszufinden die wirklich Hybride sind.



(a)



(b)

Abbildung 2.2.2: Äußere Genitalmorphologie bei Mitgliedern der *melanogaster*-Artengruppe. (a) Endabschnitt des männlichen Abdomens. Der schwarze Kasten bezeichnet den Bereich der männlichen Genitalien, der in der rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (b) gezeigt wird. *D. melanogaster* Männchen (Masly 2012)

### 2.2.3 Two-Choice-test

Two-Choice-Tests wurden für die Untersuchung der Wettbewerbsstärke der gleichen Geschlechter zwischen der Hybriden und den Wildtyp durchgeführt.

Unverpaarte weibliche und männliche Hybriden und Jungfrauen der Ursprungsarten wurden nach dem Schlüpfen gesammelt und nach Geschlechtern getrennt in der Gruppe für 7 Tage gehalten.

Dieser Test wurden in einer Kammer (Abb.2.2.3-1) von 2 cm Durchmesser und 0,5 cm Tiefe mit einer bewegliche Plastikdecke durchgeführt. Bei den Versuchen wurden drei Fliegen in die Versuchskammer gesetzt. Ein Hybrid und ein Wildtyp mit dem gleichen Geschlecht und ein Wildtyp mit dem anderen Geschlecht. Weil die Fliegenarten einander so ähnlich sind, dass sie bei Verhaltensbeobachtungen schwer zu unterscheiden sind, wurden einzelne Fliegen bei Kopulationsversuchen farblich markiert.

Entweder das Weibchen der Ursprungsart oder das Hybridweibchen wurde mit rotem UV-fluoreszierendem Puder UVXPBR (erworben von Maxmax.com; <https://maxmax.com>) vor dem Beginn des Tests markiert und in die Kammer getan. Dann wurde zusätzlich das andere Weibchen und ein Wildtypmännchen in die Kammer getan. Dieser Versuch wurde unter dem normalen weißen Licht bei 25 °C mit 70% Luftfeuchtigkeit für 60 min direkt beobachtet. Jede Fliege wurde nur für einen Experiment verwendet. Nach Beginn der Kopulation wurden die kopulierenden Fliegen unter dem UV Licht beobachtet, und der von dem Wildtyp ausgewählte Kopulationspartner sowie

die *Paarungs Latenz* wurden protokolliert. Die Versuchsgruppe, bei welcher es innerhalb 60 min keinen Kopulationserfolg gab, wurden als ‚nicht kopuliert‘ dokumentiert.

Jede Kombination (Alle Kombinationen wurde in Abb 2.2.3-2 dargestellt) wurde mindestens zehn Mal wiederholt. Bei fünf Wiederholungen wurden die Wildtypen markiert und beim Rest wurden die Hybriden markiert, um die Möglichkeit zu vermeiden, dass der UV Puder bei der Wahl der Fliegen eine Rolle spielen sollte.

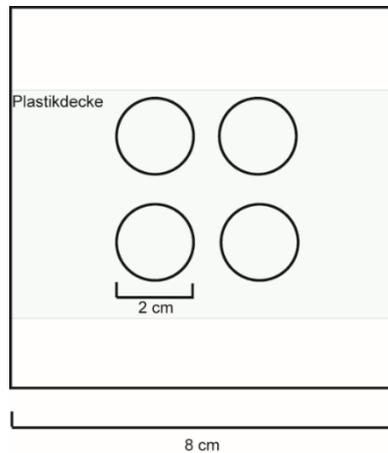


Abbildung 2.2.3-1: Versuchskammer für Two-Choice-Test

Tabelle 2.2.3-1: Kombination der Fliegen mit denen Two-Choice-Tests durchgeführt wurden.

Name des Hybrids	Kombinationen	Name des Hybrids	Kombinationen	Name des Hybrids	Kombinationen	Name des Hybrids	Kombinationen
<i>D. mel-sim</i> nur ♀:	<i>D. mel</i> ♀ <i>D. mel-sim</i> ♀ <i>D. mel</i> ♂  <i>D. sim</i> ♀ <i>D. mel-sim</i> ♀ <i>D. sim</i> ♂	<i>D. sim-mel</i> nur ♂:	<i>D. sim</i> ♂ <i>D. sim-mel</i> ♂ <i>D. sim</i> ♀  <i>D. mel</i> ♂ <i>D. sim-mel</i> ♂ <i>D. mel</i> ♀	<i>D. sec-mel</i> nur ♂	<i>D. sec</i> ♂ <i>D. sec -mel</i> ♂ <i>D. sec</i> ♀  <i>D. mel</i> ♂ <i>D. sec -mel</i> ♂ <i>D. mel</i> ♀	<i>D. mau-mel</i> nur ♂	keine Nachkommen erhalten
<i>D. mel-sec</i> nur ♀:	<i>D. mel</i> ♀ <i>D. mel-sec</i> ♀ <i>D. mel</i> ♂  <i>D. sec</i> ♀ <i>D. mel-sec</i> ♀ <i>D. sec</i> ♂	<i>D. sim-sec</i> ♀:	<i>D. sim</i> ♀ <i>D. sim-sec</i> ♀ <i>D. sim</i> ♂  <i>D. sec</i> ♀ <i>D. sim-sec</i> ♀ <i>D. sec</i> ♂	<i>D. sec- sim</i> ♀	keine Nachkommen	<i>D. mau-sim</i> ♀	keine Nachkommen erhalten
<i>D. mel-mau</i> nur ♀:	<i>D. mel</i> ♀ <i>D. mel-mau</i> ♀ <i>D. mel</i> ♂  <i>D. mau</i> ♀ <i>D. mel-mau</i> ♀ <i>D. mau</i> ♂	<i>D. sim-sec</i> ♂:	<i>D. sim</i> ♂ <i>D. sim-sec</i> ♂ <i>D. sim</i> ♀  <i>D. sec</i> ♂ <i>D. sim-sec</i> ♂ <i>D. sec</i> ♀	<i>D. sec- sim</i> ♂	keine Nachkommen	<i>D. mau-sim</i> ♂	keine Nachkommen erhalten
		<i>D. sim-mau</i> ♀:	<i>D. sim</i> ♀ <i>D. sim-mau</i> ♀ <i>D. sim</i> ♂  <i>D. mau</i> ♀ <i>D. sim-mau</i> ♀ <i>D. mau</i> ♂	<i>D. sec- mau</i> ♀	<i>D. sec</i> ♀ <i>D. sec -mau</i> ♀ <i>D. sec</i> ♂  <i>D. mau</i> ♀ <i>D. sec -mau</i> ♀ <i>D. mau</i> ♂	<i>D. mau-sec</i> ♀	keinen Two-Choice-Test durchgeführt
		<i>D. sim-mau</i> ♂:	<i>D. sim</i> ♂ <i>D. sim-mau</i> ♂ <i>D. sim</i> ♀  <i>D. mau</i> ♂ <i>D. sim-mau</i> ♂ <i>D. mau</i> ♀	<i>D. sec- mau</i> ♂	<i>D. sec</i> ♂ <i>D. sec -mau</i> ♂ <i>D. sec</i> ♀  <i>D. mau</i> ♂ <i>D. sec -mau</i> ♂ <i>D. mau</i> ♀	<i>D. mau-sec</i> ♂	keinen Two-Choice-Test durchgeführt

## 2.2.4 TDU-GC-MS (Thermal Desorption Unit - Gas Chromatographie - Massenspektrometrie)

Bei diesen Versuchen soll untersucht werden, ob sich die Summe der flüchtigen Oberflächen- Botenstoffe (Geruch / Pheromon) bei Wildtypen und Hybriden unterscheidet, und einen Selektionsvorteil bietet. TDU-GC-MS ermöglicht die Analyse von flüchtigen Duftstoffen von einzelnen Fliegen.

*Probe Vorbereitung:* Je Geschlecht wurden 10 unverpaarte Hybriden und 10 unverpaarte Tiere der beiden Elternteile vor der TDU-GC-MS Analyse Tests für 30 Minuten bei -20 °C immobilisiert. Danach wurde jede Fliege einzeln in ein Glasmikroröhrchen getan, und 0,5 µl 1-Bromodecane wurden als interner Standard auf die Fliegen gegeben. Dann wurden die Glasmikroröhrchen in das TDU Desorptionsrohr eingesetzt.

*Thermal Desorption Unit-Gas Chromatographie – Massenspektrometrie (TDU-GC-MS):* Das Agilent GC 7890 A mit MS 5975 C inert XL MSD Einheit GC-MS Gerät wurde mit einer HP5-MS UI Säule (19091S-433UI; Agilent Technologies) ausgerüstet. Nach Desorption bei 250 °C für 3 Minuten, wurden die flüchtigen Stoffe bei -50°C gefangen,. Um die Komponenten danach in die GC Säule zu transportieren, wurde der Verdampfer-Injektor schrittweise (12 °C/s) auf 270 °C erhitzt und für 5 Minuten gehalten. Die Temperatur des GC Ofens wurde bei 50 °C für 3 Minuten gehalten, schrittweise erhitzt mit Heizgeschwindigkeit 15 °C/min bis 250 °C und wurde für 3 Minuten gehalten, und dann bis 280 °C mit Hitzegeschwindigkeit 20 °C/min erhitzt und dann für 30 Minuten gehalten. Die eluierte Komponente für die folgende Analyse wurde ionisiert und das Massenspektrum wurde in dem positiven Ionen Modul mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis  $m/z$  zwischen 33 und 500 aufgezeichnet. Das Massenspektrum und die Retentionszeit der detektierten chemischen Komponenten wurden mit dem Standard verglichen. Die Bearbeitung des Massenspektrums wurde mithilfe der Software ChemStation erledigt.

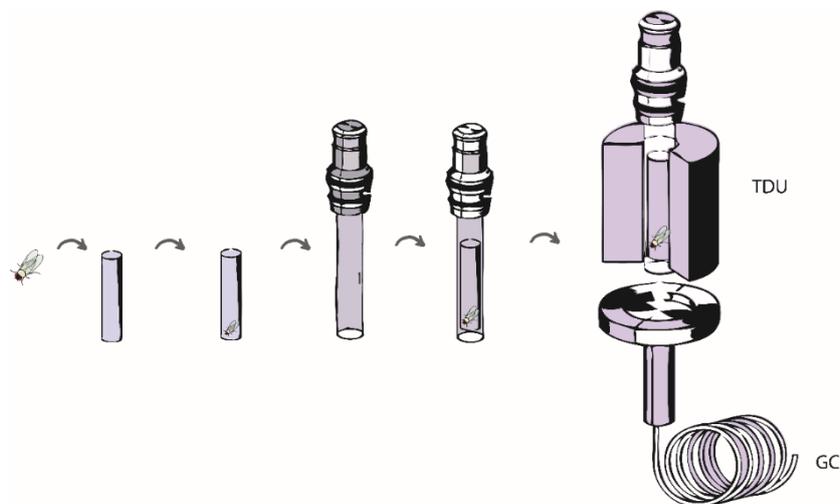


Abbildung 2.2.4: TDU test schematische Darstellung

### **2.2.5 Bearbeitung der Statistik und der Abbildungen**

Statistische Analysen (siehe die entsprechenden Legenden jeder Abbildung) und vorläufige Abbildung wurden mit GraphPad Prism 9 (<https://www.graphpad.com/>) durchgeführt. Abbildungen wurden durch Adobe Illustrator CS5 bearbeitet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Hybride Morphologie

Frühere Forschungen haben gezeigt, dass aus der Paarung von *D. melanogaster* mit *D. simulans*, *D. sechellia* oder *D. mauritiana*, je nach Kombination, entweder nur hybride Weibchen, oder nur Männchen hervorgehen. Hybride, die aus der Kombination von *D. simulans*, *D. sechellia* und *D. mauritiana* entstanden sind, können sowohl männlich wie auch weiblich sein. Unsere Ergebnisse unterstützen diese Beobachtungen, da wir erfolgreich das Auftreten von ein- oder zweigeschlechtlichen Hybridverhältnissen als Folge von verschiedenen Kombinationen nachgewiesen haben (siehe Abbildung 3.1-1). Darüber hinaus wiesen die weiblichen Hybride *D. mel-sim* und *D. mel-sec* eine anomale Flügelmorphologie auf und hatten Schwierigkeiten, länger als fünf Tage zu überleben. Andere Hybride hingegen zeigten normale Phänotypen, die denen ihrer Parentalarten ähnelten (siehe Abbildung 3.1-1).

Die Hybride von *D. melanogaster*, die sich mit *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia* paaren, waren entweder nur männlich oder nur weiblich. Die Hybriden aus der Kombination von *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia* wiesen dagegen die traditionellen binären Geschlechterverteilung auf.

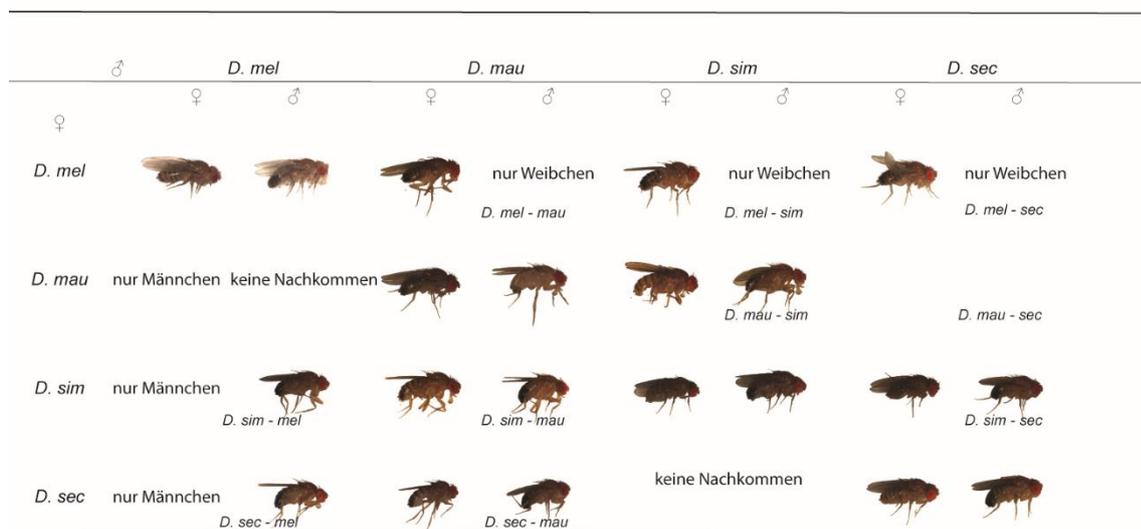


Abbildung 3.1-1: Die Morphologie der Nachkommenschaft aus der Kreuzung der vier Arten.

Wir untersuchten die Morphologie des Hinterlappens bei Genitalen männlicher Hybride, da diese für ihre Beteiligung am sexuellen Kommunikationsprozess bekannt sind, wie es die "Schlüssel-Schloss"-Theorie postuliert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Morphologie des Hinterlappens von Hybriden unterschiedliche Merkmale der jeweiligen Elterntiere aufweist. So wies der Hinterlappen von *D. simulans* eine breite "Grashaken"-Form auf, während der von *D. sechellia* eine "Gänsekopf"-Form zeigte. Bemerkenswert ist, dass die Hybride *D. sim-sec* eine ähnliche Höhe wie *D. sechellia* aufwies, aber einen verlängerten Außendurchmesser hatte, der an *D. simulans* erinnerte (siehe Abbildung

3.1-2). Auch andere Hybriden wiesen zusammengesetzte Merkmale auf, die sie von ihren r Elternarten geerbt hatten, was darauf hindeutet, dass der Phänotyp des Hinterlappens offenbar von Genen beider Elternlinien beeinflusst wird.

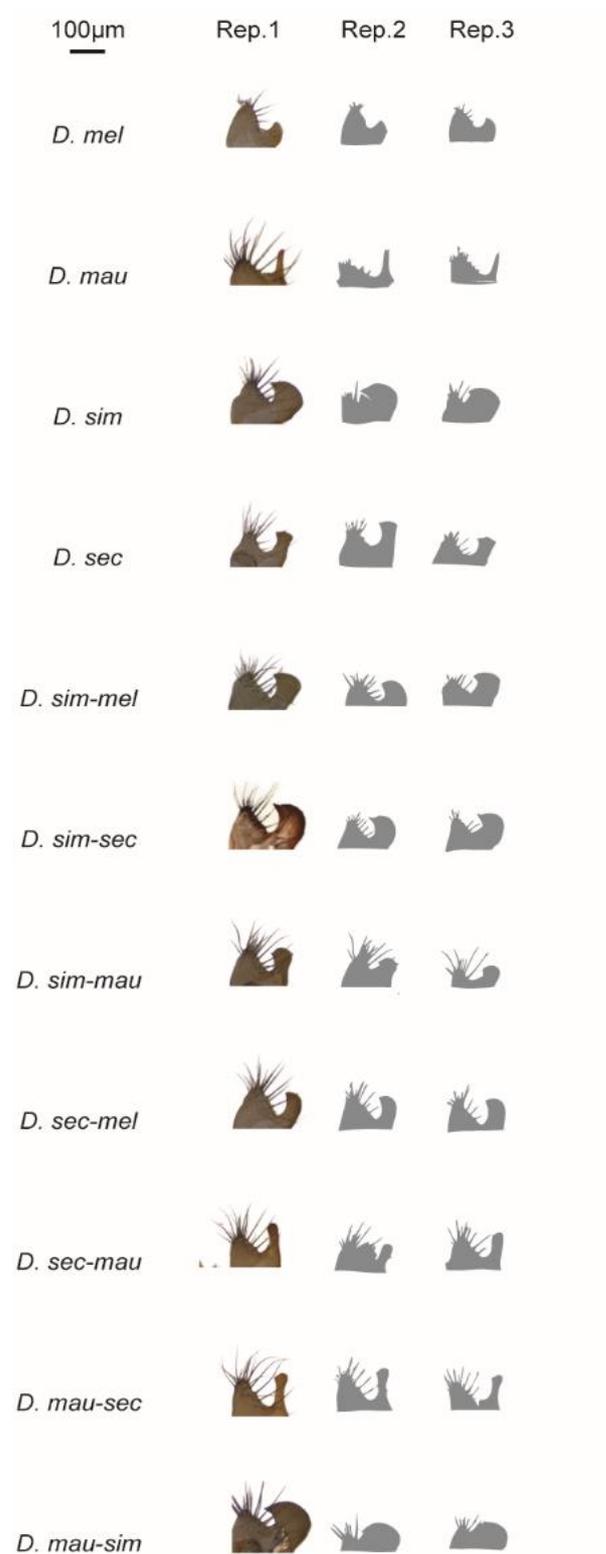


Abbildung 3.1-2: Die Morphologie des Hinterlappens der Hybriden aus der Kreuzung der vier *Drosophila*-Arten sowie der Ursprungsarten. Der Name der Hybriden gibt die Eltern der Hybriden an. Zum Beispiel: *D. sim-mel* bedeutet die Hybriden hervorgegangen aus der Paarung eines *D. simulans* Weibchen und eines *D. melanogaster* Männchens. Rep,3 Replikate.

### 3.2 Pheromonale und sexuelle Verhaltensmerkmale von Hybriden von *D. melanogaster* mit den Arten der *simulans*-Untergruppe

Die Pheromone von *D. melanogaster* und *D. sechellia* weisen einen ausgeprägten Dimorphismus auf, wobei die Weibchen durch das Vorhandensein von 7-11-HD und 7-11-ND als ihre charakteristischen Pheromone gekennzeichnet sind, während Verbindungen wie cVA, 7-T und 7-P für Männchen spezifisch sind. Im Gegensatz dazu gelten *D. simulans* und *D. mauritiana* als chemisch eher monomorphe Arten, bei denen sowohl männliche als auch weibliche Individuen die Verbindungen 7-T und 7-P aufweisen, mit Ausnahme von cVA, das bei beiden Arten ausschließlich den Männchen vorbehalten bleibt.

Bei den Hybriden, die aus der Kombination von *D. melanogaster* und *D. simulans* hervorgegangen sind, haben unsere TDU-GC-MS-Analysen unerwartete Muster zutage gefördert. Die weiblichen *D. mel-sim*-Hybriden wiesen ein Pheromonprofil auf, das der Mischung der Profile der Elternarten entsprach: 7-11-HD und 7-11-ND von *D. melanogaster*-Weibchen sowie 7-T und 7-P von *D. simulans*-Weibchen (siehe Abbildung 3.2-1). Bemerkenswert ist, dass die Intensitäten aller vier Verbindungen in *D. mel-sim* deutlich niedriger waren als in den jeweiligen reinrassigen Elternarten, mit Ausnahme von 7-P, das in *D. mel-sim* im Vergleich zu *D. simulans*-Weibchen eine höhere Intensität aufwies. (siehe Abbildung 3.2-1).

Als Ergebnis einer weiteren Hybridisierung (mütterlicherseits *D. simulans* mit väterlicherseits *D. melanogaster*) besaßen die männlichen *D. sim-mel*-Hybriden die charakteristischen männlichen Pheromone cVA, 7-T und 7-P, wobei die Intensität von 7-T der von *D. simulans*-Männchen sehr ähnlich war. Überraschenderweise übertrafen die cVA-Werte der *D. sim-mel*-Männchen die ihrer männlichen Elterntiere sowohl von *D. melanogaster* als auch von *D. simulans*, wobei die Hybride im Vergleich zu den Ursprungsarten fast viermal so hohe cVA-Werte aufwiesen. Darüber hinaus wiesen die *D. sim-mel*-Männchen eine leicht erhöhte 7-P-Intensität auf, verglichen mit den Männchen von *D. simulans* und *D. melanogaster* (siehe Abbildung 3.2-1).

Anschließend führten wir einen Wettbewerbstest mit zwei Wahlmöglichkeiten durch, um die Paarungskonkurrenz der Hybride gegenüber gleichgeschlechtlichen Konkurrenten ihrer Elternarten zu bewerten (siehe Abbildung 3.2-1). Diese Tests lieferten bemerkenswerte Ergebnisse. In Versuchen mit weiblichen *D. mel-sim*-Hybriden zeigte eine signifikante Mehrheit der männlichen *D. melanogaster* eine Vorliebe für die Paarung mit weiblichen *D. melanogaster* anstelle der *D. mel-sim*-Hybride. Analoge Ergebnisse ergaben sich bei Versuchen mit weiblichen *D. mel-sim*-Hybriden, die mit *D. simulans*-Weibchen gepaart wurden, wobei die *D. simulans*-Männchen eine Präferenz für die Paarung mit ihren Artgenossen zeigten (siehe Abbildung 3.2-1).

In den Versuchen mit männlichen *D. sim-mel*-Hybriden hingegen bevorzugten die *D. melanogaster*-Weibchen mit überwältigender Mehrheit die Paarung mit männlichen *D. melanogaster*-Pendants gegenüber den *D. sim-mel*-Hybriden (siehe Abbildung 3.2-1). Bei Tests mit männlichen *D. sim-mel*-Hybriden, die mit *D. simulans*-Weibchen gepaart wurden, kam es nur bei 3 von 10 Wiederholungen zu einer erfolgreichen Paarung,

während bei den restlichen 7 Wiederholungen keine Paarung stattfand (siehe Abbildung 3.2-1). Diese Ergebnisse deuten insgesamt auf einen erkennbaren Trend hin, bei dem der Balz- und Paarungsprozess die hybriden *D. mel-sim*-Weibchen und *D. sim-mel*-Männchen einer Art Diskriminierung durch ihre Ursprungsarten *D. melanogaster* und *D. simulans* auszusetzen scheint (siehe Abbildung 3.2-1).

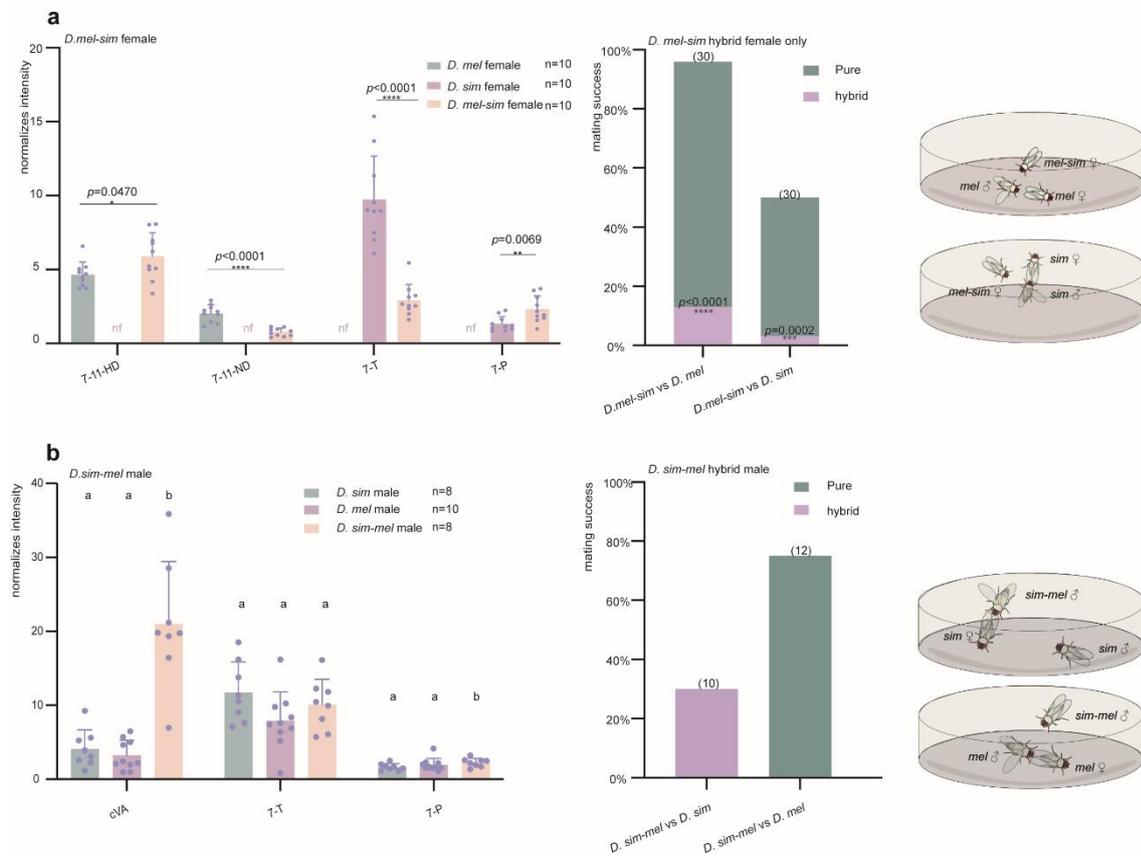


Abbildung 3.2-1: Quantifizierung der Pheromone (links) mit ungepaarten t-Test (a) und einfaktorieller Varianzanalyse (b) und Ergebnisse der Paarungstests, exakter Chi-Quadrat-Test (rechts), \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

Die weiblichen *D. mel-sec*-Hybride, die aus der zweiten Kombination von *D. melanogaster*-Weibchen und *D. sechellia*-Männchen hervorgegangen sind, wiesen auch die primären weiblichen Pheromone 7-11-HD und 7-11-ND auf. Die Intensität dieser Pheromone bei den Hybriden wies jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Ursprungsarten auf. Dagegen besaß der männliche Hybrid *D. sec-mel* cVA, 7-T und 7-P. Die cVA-Konzentrationen in *D. sec-mel* waren vergleichbar mit denen der Männchen von *D. sechellia* und *D. melanogaster*, während die Intensität von 7-T geringer war als bei *D. sechellia*, aber höher als bei *D. melanogaster*. Darüber hinaus war die 7-P-Konzentration in *D. sec-mel* generell niedriger als in den beiden reinen Elternarten.

Nachfolgende Two-Choice-Tests ergaben folgende Ergebnisse: Traten weibliche *D. mel-sec* gegen weibliche *D. melanogaster* oder *D. sechellia* an, zeigten die Männchen von *D. melanogaster* oder *D. sechellia* eine Präferenz für die Paarung mit ihren reinen Artgenossen gegenüber dem Hybrid *D. mel-sec*. Ein ähnlicher Trend wurde bei männlichen *D. sec-mel*-Hybriden und männlichen *D. melanogaster*- oder *D. sechellia*-Männchen beobachtet (siehe Abbildung 3.2-2). Diese Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass Hybride aus *D. melanogaster* mit *D. sechellia*, während des sexuellen Kommunikationsprozesses im Allgemeinen von ihren reinen Elternarten diskriminiert werden (siehe Abbildung 3.2-2).

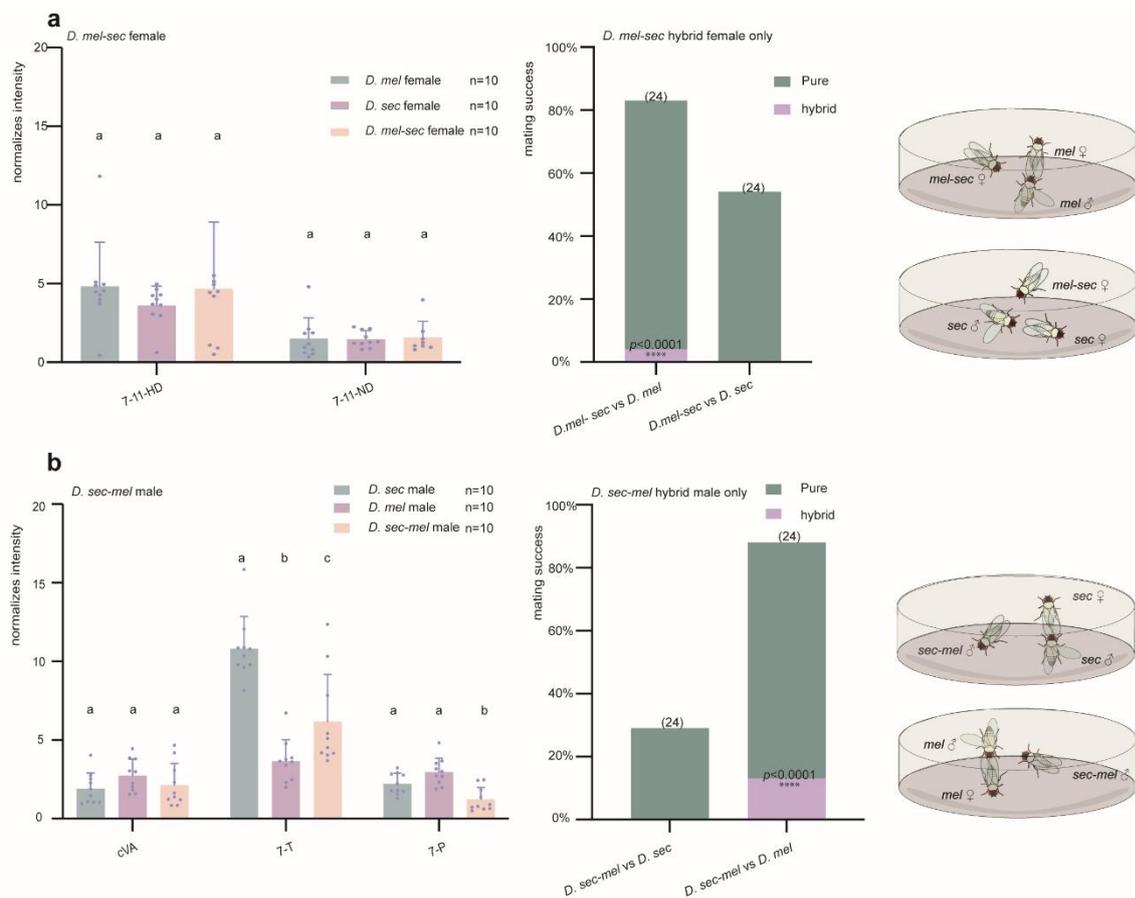


Abbildung 3.2-2: Quantifizierung der Pheromone (links) mit einfaktorieller Varianzanalyse und Ergebnisse der Paarungstests, exakter Chi-Quadrat-Test (rechts), \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Bei der dritten Kombination aus *D. melanogaster* und *D. mauritiana* erhielten wir ausschließlich weibliche Hybriden *D. mel-mau*, und umgekehrt wurden keine männlichen Hybriden *D. mau-mel* erzeugt. Die TDU-Ergebnisse für weibliche *D. mel-mau* ergaben das Vorhandensein der Pheromone 7-11-ND, 7-11-HD und 7-T. Auch hier zeigte der Hybrid *D. mel-mau* ein zusammengesetztes Pheromonprofil, das sowohl von *D. melanogaster* als auch von *D. mauritiana* stammt. Bemerkenswert ist, dass sich die Intensitäten von 7-11-HD und 7-11-ND in den Hybriden nicht signifikant von denen von

*D. melanogaster* unterschieden, während die 7-T-Werte höher waren als in *D. mauritiana* (siehe Abbildung 3.2-3).

Nachfolgende Two-Choice-Tests zeigten dass, weder reinrassige *D. melanogaster* noch *D. mauritiana*-Männchen während des sexuellen Kommunikationsprozesses hybride Individuen bevorzugten. (siehe Abbildung 3.2-3).

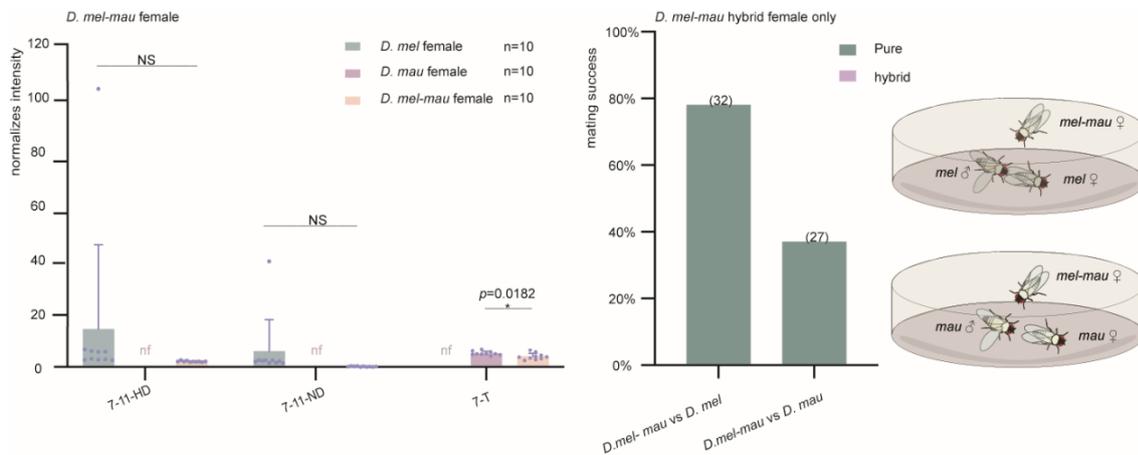


Abbildung 3.2-3: Quantifizierung der Pheromone (links) mit ungepaarten t-Test und Ergebnisse der Paarungstests, exakter Chi-Quadrat-Test (rechts), \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.3 Pheromonale und sexuelle Verhaltensmerkmale von Hybriden von-Arten der *simulans*-Untergruppe

Hybride, die von *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia* abstammen, zeigten eine normale Geschlechterverteilung. Bedauerlicherweise führten unsere Hybridisierungsversuche nicht zu Hybriden bei folgenden Kombinationen: *D. mau-sim*, *D. sec-mau* und *D. sec-sim*. Daher untersuchten wir die pheromonalen Eigenschaften der erhaltenen Hybride aus den anderen Kombinationen.

Im Allgemeinen wiesen sowohl die männlichen als auch die weiblichen Hybride Pheromonprofile auf, die denen ihrer jeweiligen reinen Elternarten ähnelten. So wies das Weibchen von *D. sim-mau* das von den Eltern geerbte Merkmal 7-T auf, wenn auch in einer höheren Konzentration als bei den Weibchen von *D. simulans* und *D. mauritiana*. Auch wiesen die männlichen *D. sim-mau* Pheromonprofile auf, die cVA, 7-T und 7-P umfassten, Merkmale, die sie mit den männlichen *D. simulans* und *D. mauritiana* teilen. Ein Vergleich von cVA, 7-T und 7-P - in den Hybriden *D. sim-mau*, *D. simulans* und *D. mauritiana* zeigte, dass nur 7-T und 7-P in den Hybriden und *D. mauritiana* in ähnlichen Mengen vorhanden waren, wenn auch in geringerem Maße als in *D. simulans*. Bemerkenswert ist, dass die cVA-Werte in den Testproben keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (siehe Abbildung 3.3-1).

Anschließend lieferten Two-Choice-Tests eindeutige Ergebnisse: *D. simulans* Männchen bevorzugten reinrassige *D. simulans* Weibchen über *D. sim-mau*-Hybride.

Diese Vorliebe unterstreicht die Diskriminierung, die *D. simulans* während der sexuellen Kommunikation gegenüber den Hybriden *D. sim-mau* zeigt. Überraschenderweise

paarte sich jedoch männliche *D. mauritiana* etwa gleich häufig mit weiblichen *D. sim-mau*-Hybriden wie mit weiblichen *D. mauritiana*, was darauf hindeutet, dass die *D. sim-mau*-Hybriden nicht von der Ursprungsart diskriminiert werden (siehe Abbildung 3.3-1).

Auffallend ist, dass männliche *D. sim-mau*-Hybriden eine deutlich höhere Erfolgsrate bei der Paarung mit weiblichen *D. simulans* aufweisen als männliche *D. simulans* selbst. Dieser unerwartete Paarungsvorteil wurde bei den Interaktionen der männlichen Hybride mit *D. simulans*-Weibchen beobachtet (siehe Abbildung 3.3-1). Bei der Bewertung der Paarungskonkurrenz der männlichen *D. sim-mau*-Hybriden gegenüber *D. mauritiana* ergaben die Ergebnisse hingegen eine ähnliche Erfolgsrate bei der Paarung wie bei den männlichen *D. mauritiana*, insbesondere wenn es sich um *D. mauritiana*-Weibchen handelte. (siehe Abbildung 3.3-1).

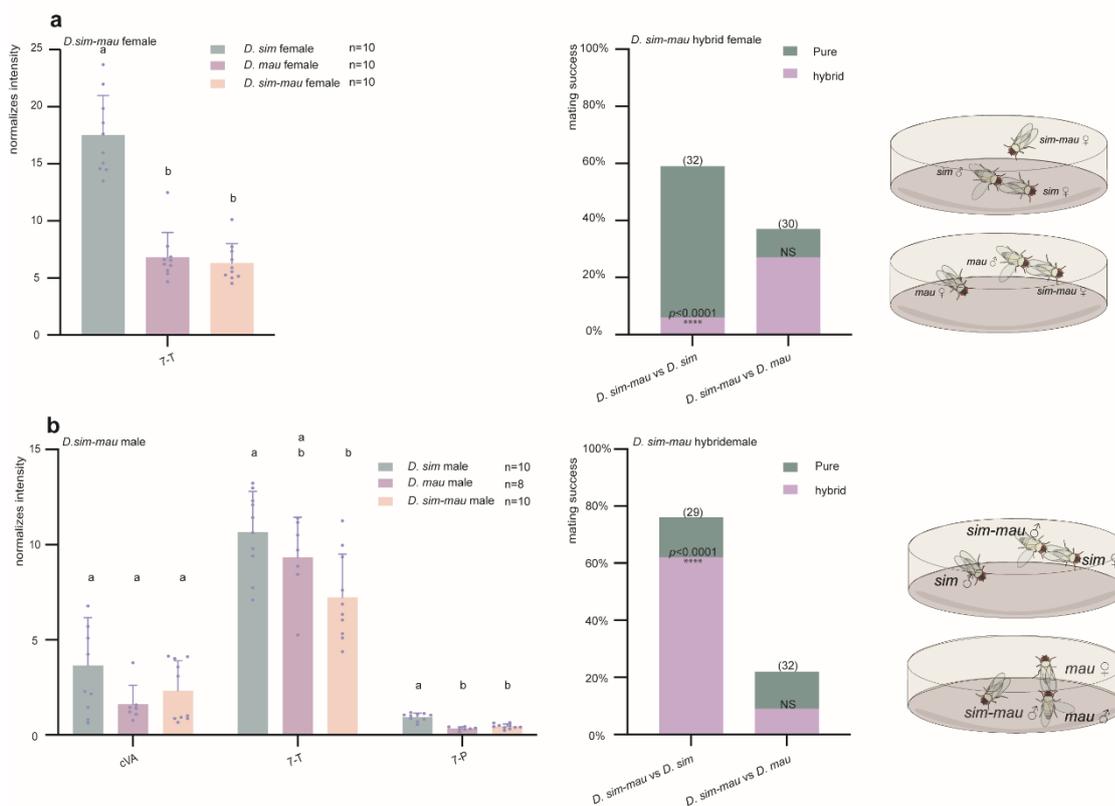


Abbildung 3.3-1: Quantifizierung der Pheromone (links) mit einfaktorieller Varianzanalyse und Ergebnisse der Paarungstests, exakter Chi-Quadrat-Test (rechts), \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Nach einer Paarung von *D. simulans* und *D. sechellia* weist der weibliche Hybrid *D. sim-sec* eine kombinierte Mischung von Pheromonen auf: 7-T, 7-P, 7-11-HD und 7-11-ND, die von beiden elterlichen Arten stammen. Dies ist bemerkenswert, da diese beiden Arten, als monomorphe bzw. dimorphe Pheromone eingestuft werden (Abbildung 3.3-2). Vergleicht man die Pheromonzusammensetzung der weiblichen *D. sim-sec* mit der ihrer Artgenossen aus *D. simulans* und *D. sechellia*, so wird deutlich, dass sie im Allgemeinen niedrigere Werte aller oben genannten Verbindungen aufweist, mit

Ausnahme von 7-P (Abbildung 3.3-2). Umgekehrt enthalten die Pheromonprofile der männlichen *D. sim-sec* cVA, 7-P und 7-T, wenn auch mit durchweg geringeren Mengen an kutikulären Kohlenwasserstoffen im Vergleich zu *D. simulans* (siehe Abbildung 3.3-2). Im Gegensatz zum geringeren Vorhandensein von 7-P im Vergleich zu *D. sechellia* übertreffen die 7-T-Werte bei männlichen *D. sim-sec* sogar die von *D. sechellia* (Abbildung 3.3-2).

Die Two-Choice-Tests ergaben, dass *D. simulans* Männchen nicht zwischen *D. sim-sec* Weibchen und *D. simulans* Weibchen unterscheiden, während *D. sechellia* Männchen, *D. sim-sec* Weibchen sogar gegenüber eigenen Weibchen bevorzugen. *D. sim-sec* Männchen wiederum werden von *D. simulans* Weibchen gegenüber *simulans* Männchen stark bevorzugt, während sie von *D. sechellia* Weibchen fast nie akzeptiert werden (Abbildung 3.3-2).

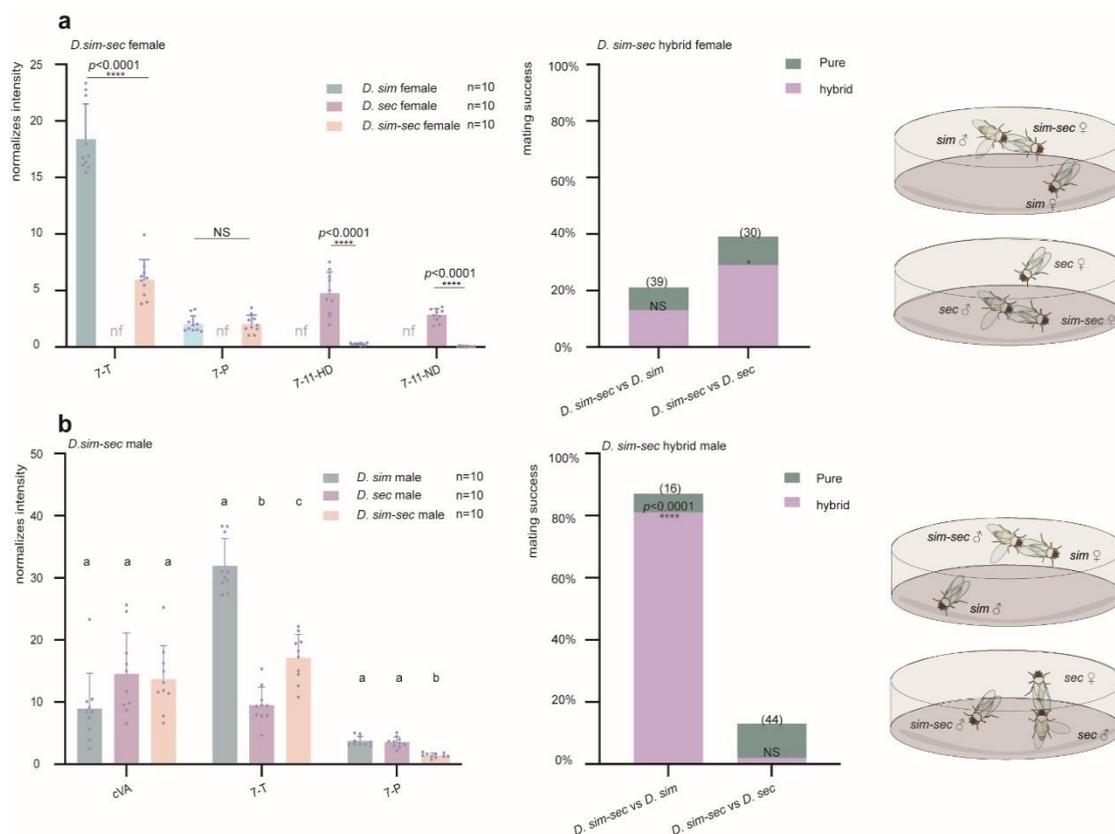


Abbildung 3.3-2: Quantifizierung der Pheromone (links) mit ungepaarten t-Test (a) und einfaktorieller Varianzanalyse (b) und Ergebnisse der Paarungstests, exakter Chi-Quadrat-Test (rechts), \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Die nächste Reihe von Arten-Kombination zur Erzeugung von Hybriden bestand aus *D. mauritiana* und *D. sechellia*, obwohl sich ihre ökologischen Lebensräume nicht überschneiden, da *D. mauritiana* eine endemische Art auf Mauritius ist und *D. sechellia* spezifisch für die Seychellen ist. Das Ziel der Versuche war, die Möglichkeit einer

Hybridisierung zwischen den beiden Arten und die daraus resultierenden pheromonalen und verhaltensbezogenen Merkmale der Hybriden untersuchen.

Die weibliche Hybride, *D. sec-mau*, weisen ebenfalls vier Verbindungen auf (7-T, 7-P, 7-11-HD und 7-11-ND), doch sind ihre Werte deutlich niedriger als die der beiden reinrassigen Elternarten (siehe Abbildung 3.3-3). Bei männlichen *D. sec-mau* ist eine deutliche Verringerung der cVA-, 7-T- und 7-P-Werte im Vergleich zu männlichen *D. simulans* festzustellen. Darüber hinaus weist *D. sec-mau* im Vergleich zu den Männchen von *D. sechellia* ebenfalls verringerte Pheromonwerte auf, mit Ausnahme von 7-T.

Die Ergebnisse der Two-Choice-Tests zeigen, dass sowohl männliche als auch weibliche *D. sec-mau*-Hybriden im Vergleich zu ihren jeweiligen Ursprungsarten ähnliche Paarungserfolge aufweisen (siehe Abbildung 3.3-3).

In ähnlicher Weise weisen die Hybride, *D. mau-sec*, ein Pheromonprofil auf, das aus der Kombination ihrer Elternarten resultiert. Die Verbindungen sind bei den weiblichen Hybriden durchweg in geringeren Mengen vorhanden als bei den beiden Elternarten. Die Männchen von *D. mau-sec* weisen einen vergleichbaren Gehalt an cVA und 7-P auf wie *D. mauritiana* und *D. sechellia*, allerdings mit einem geringeren Gehalt an 7-T. Interessanterweise weisen die Männchen von *D. mau-sec* einen höheren Gehalt an 7-T auf als die Männchen von *D. sechellia*, obwohl sie einen geringeren Gehalt an 7-P haben (siehe Abbildung 3.3-3). Leider waren nicht genug Hybrid Nachkommen vorhanden um anschließend Two-Choice-Tests durchzuführen

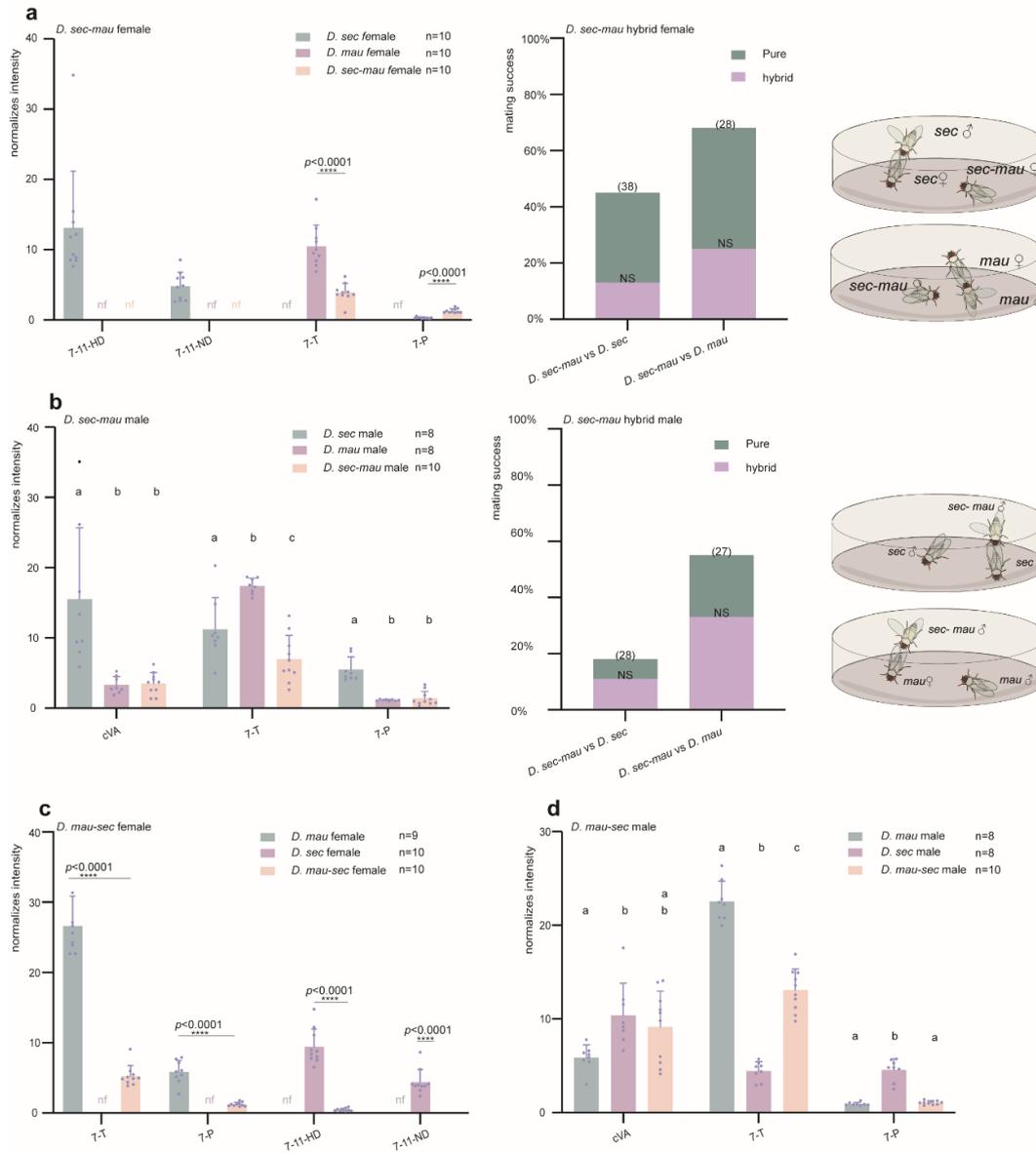


Abbildung 3.3-3: Quantifizierung der Pheromone (links) mit ungepaarten t-Test (a) und einfaktorieller Varianzanalyse (b,c) und Ergebnisse der Paarungstests, exakter Chi-Quadrat-Test (rechts), \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## 4 Diskussion

*Drosophila melanogaster* ist auf dem Gebiet der Genetik umfassend erforscht worden. Den sexuellen Kommunikationsmustern von Hybriden, die aus verschiedenen *Drosophila*-Arten hervorgegangen sind, wurde jedoch nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Ziel dieser Studie ist es, die Pheromonprofile und das Verhalten dieser *Drosophila*-Hybride mit Hilfe der TDU GC-MS-Analyse und Two-Choice-Tests zu untersuchen. Die Ergebnisse unserer Forschung zeigen verblüffende Erkenntnisse. Die meisten der in unserer Studie untersuchten Hybride haben nur eine begrenzten Attraktivität für mögliche Geschlechtspartner, was oft auf ihre Sterilität (die häufig bei männlichen Hybriden beobachtet wird) oder ihre Unterscheidbarkeit von den Elternarten zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz sind sogar einige sterile männliche Hybriden manchmal ähnlich erfolgreich oder sogar erfolgreicher beim Werben um Weibchen als ihre reinerbigen Geschlechtsgenossen. Überraschenderweise zeigen auch einige fruchtbare weibliche Hybriden ähnliche Wirkungen. Die kontinuierliche Verpaarung von sterilen Hybriden in der Natur könnte möglicherweise zu einem Rückgang der Populationen der ursprünglichen Arten beitragen. Gleichzeitig könnte ein kontinuierlicher Paarungserfolg von fertilen Hybriden den Genfluss zwischen Arten langfristig erhöhen und möglicherweise zur Entstehung neuer Arten beitragen.

### 4.1 Paarungsunterscheidung und Vorteilseffekt bei verschiedenen Hybriden

Beim Sexualverhalten von Drosophiliden, wie z. B. *Drosophila melanogaster*, zeigen die Männchen ein Balzritual, das aus dem Ausstrecken und Vibrieren eines einzelnen Flügels zur Erzeugung des Balzgesangs, dem Ausrichten auf das Weibchen, dem Verfolgen, Klopfen, Lecken, dem Versuch der Kopulation und der Kopulation besteht (Hall, 1994). Mehrere sensorische Modalitäten, einschließlich Chemosensorik für Pheromone und CHCs, Mechanosensorik für den Balzgesang und Berührungen sowie das Sehen können beim Balzritual eine Rolle spielen (Krstic et al., 2009; Markow, 1987; Markow und Hanson, 1981; Markow und Manning, 1980; Agrawal et al., 2014). Unter diesen Signalen spielen Pheromone (bestehend aus mehreren Verbindungen) und Balzgesänge (bestehend aus einer Reihe von Impulsen mit einem Intervall zwischen den Impulsen) eine wichtige Rolle beim Balzritual (Ewing und Bennet-Clark, 1968; Hoy et al., 1988; Ritchie und Gleason, 1988). Alle damit zusammenhängenden Signale werden in den höheren Zentren, z.B. Pilzkörper und Seitenhorn, im Gehirn integriert und lösen schließlich das Verhalten der Tiere aus.

Alle männlichen Hybriden, die wir in dieser Studie getestet haben, folgten dem grundlegenden Balzritual wie *D. melanogaster*, wenn sie sich beiden Seiten der Weibchen zuwandten. Sie zeigten Interesse am Weibchen, indem sie mit ihren Flügeln vibrierten, um den Balzgesang zu erzeugen, sich an dem Weibchen orientierten, ihm folgten, es berührten, beleckten und versuchten, sich zu paaren. Die weiblichen Hybriden verhielten sich ebenfalls wie die *D. melanogaster*-Weibchen, wenngleich einige der Hybride (*D. mel-sim* und *D. mel-sec*) abnorme Flügel entwickelten. Wenn wir jedoch den Paarungserfolg der Hybriden überprüfen, stellen wir fest, dass die meisten Hybriden von ihren reinerbigen Elterntieren diskriminiert werden. Obwohl Serrato-Capuchina et al.

(2021) über den Effekt der Paarungsdiskriminierung berichten, haben wir mehr Hybridisierungskombinationen verschiedener *Drosophila*-Arten untersucht als sie. Zunächst stellen wir fest, dass fast alle Hybriden von *D. melanogaster*, die sich mit anderen getesteten Arten paaren, einschließlich *D. mel-sim*, *D. mel-mau*, *D. mel-sec*, *D. sec-mel*, von den Ursprungsarten diskriminiert wurden, mit Ausnahme des Männchens *D. sim-mel*, was möglicherweise auf den geringen Stichprobenumfang zurückzuführen ist, da sich nur 3 Weibchen in 10 Tests mit den Hybriden paarten. Ein weiterer diskriminierter Hybride ist das *D. sim-mau*-Weibchen, das einen geringeren Paarungserfolg des *D. simulans*-Männchens zeigte, wenn es mit dem *D. simulans*-Weibchen konkurrierte. Im Gegensatz zum Diskriminierungseffekt zeigten die meisten Hybriden von *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia* keine Diskriminierungseffekte, einschließlich ähnlicher Paarungspräferenzen und sogar Paarungsvorteile. Besonders hervorzuheben sind die Paarungsvorteile bei den Hybriden von *D. sim-mau* Männchen zu *D. simulans*, *D. sim-sec* Männchen zu *D. simulans* und *D. sim-sec* Weibchen zu *D. sechellia*.

Hybriden haben immer eine geringere Fitness, was für das Fortbestehen der Art in der Natur wichtig ist (Coughlan und Matute, 2020). In unseren Fällen haben wir festgestellt, dass die weiblichen Hybriden *D. mel-sim* und *D. mel-sec* nicht nur abnorme Flügel haben, sondern auch eine kürzere Lebensdauer (weniger als 10 Tage), was darauf hindeutet, dass diese Hybride eine geringere Fitness haben. Diese geringere Fitness wird in der Natur wahrscheinlich dazu führen, dass Hybride nicht langfristig zum Genpool beitragen und somit die Artengrenzen zwischen *D. melanogaster*, *D. simulans* und *D. sechellia* zu erhalten bleiben. Gleichzeitig ist die Diskriminierung von Hybriden mit geringerer Fitness für einen potentiellen Paarungspartner wahrscheinlich adaptiv, da das Tier der Ursprungsart dadurch seine eigene Fitness erhöht.

Hybriden, insbesondere von *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia*, zeigten manchmal keine-Diskriminierung oder wurden sogar bevorzugt.. Zum Beispiel sind männliche *D. sim-sec* ähnlich akzeptabel wie weibliche *D. simulans* gegenüber männlichen *D. simulans*. Es besteht kein Zweifel daran, dass diese Hybriden um die Paarung mit reinrassigen Arten konkurrieren und dann die ursprünglichen Artenpopulationen reduzieren werden, da männliche *Drosophila*-Hybriden normalerweise nach der Haldane-Regel (Haldane, 1922) steril sind. Die Weibchen von *D. sim-sec* sind im Gegensatz zu den Männchen jedoch fruchtbar. Ihr Paarungsvorteil könnte somit nicht nur zu einem Rückgang der Populationen der Ursprungsarten führen, sondern auch eine neue Artbildung durch kontinuierliche Hybridisierung (Mallet, 2007; Chapman und Burke, 2007) auslösen.

## **4.2 Das Pheromon des Hybriden kombiniert CHCs von beiden Seiten der elterlichen Arten**

Es wird angenommen, dass *Drosophila*-Pheromone, darunter die flüchtige Verbindung cVA und kutikuläre Kohlenwasserstoffe (CHCs), eine entscheidende Rolle bei der Artenerkennung spielen. *Drosophila*-Arten können anhand ihrer CHCs in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Monomorphe Arten wie *D. simulans* und *D. mauritiana* weisen sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen eine identische Zusammensetzung der pheromonalen CHCs auf, die typischerweise Verbindungen wie

7-T und 7-P enthalten. Im Gegensatz dazu weisen dimorphe Arten wie *D. melanogaster* und *D. sechellia* unterschiedliche pheromonale CHCs zwischen Männchen und Weibchen auf, wobei die Männchen Verbindungen wie 7-T und 7-P und die Weibchen 7,11-HD und 7,11-ND als geschlechtsspezifische Komponenten aufweisen.

Es gibt eine klare Verhaltensgrenze bei der Paarung zwischen monomorphen und dimorphen Arten, da die Männchen im Allgemeinen wenig Interesse an Weibchen mit anderen CHC-Profilen als ihren eigenen zeigen. Unsere TDU-GC-MS-Ergebnisse zeigen, dass bei der Paarung monomorpher Arten mit anderen monomorphen Arten die entstehenden Hybriden ihre Monomorphie beibehalten. Dasselbe Muster wird bei Hybriden beobachtet, die aus der Kreuzung zweier verschiedener dimorpher Arten hervorgehen. Wenn sich jedoch eine monomorphe Art mit einer dimorphen Art paart, zeigen die daraus entstehenden Hybriden ebenfalls Dimorphismus. So weisen beispielsweise die Hybride *D. sim-sec* einen Dimorphismus auf, wobei die Weibchen spezifische 7,11-HD- und 7,11-ND-Verbindungen aufweisen, wenn auch in geringerem Maße. Es ist erwähnenswert, dass 7,11-HD und 7,11-ND ursprünglich als weibchenspezifische Verbindungen in *D. melanogaster*-Weibchen identifiziert wurden und ihre Weibchenspezifität in den Hybriden beizubehalten scheinen.

Außerdem weisen Hybriden, die aus Kreuzungen verschiedener Arten hervorgegangen sind, eine Kombination beider elterlicher Pheromonprofile desselben Geschlechts auf. So exprimieren beispielsweise die Weibchen von *D. sechellia* die weibchenspezifischen Verbindungen 7,11-HD und 7,11-ND, während ihnen das männlich-spezifische Pheromon 7-T fehlt. Umgekehrt besitzen *D. simulans*-Individuen sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen 7-T. Bei *D. sim-sec* Hybriden weisen die Weibchen eine Mischung aus 7-T, 7,11-HD und 7,11-ND auf. Ähnliche Ergebnisse sind bei allen getesteten Hybriden zu beobachten. Folglich sind die Gene, die für die Synthese von CHCs verantwortlich sind, in diesen Hybriden aktiv, und das Vorhandensein oder Fehlen geschlechtsspezifischer Pheromone kann als Indikator für die Expressionsniveaus dieser Gene oder die Aktivitäten der beteiligten Enzyme dienen.

### **4.3 Mögliche Gründe für die Diskriminierung bei der Paarung und Vorteile**

Im Vergleich zu den anderen getesteten *Drosophila* Arten fällt auf, dass die Weibchen und Männchen von *D. melanogaster* ein höheres Maß an Diskriminierung gegenüber ihren Hybriden zeigen. Alle Hybriden von *D. melanogaster*, die aus Paarungen mit Arten aus der *simulans* Untergruppe paaren, werden durchweg von möglichen Geschlechtspartnern der Ursprungsarten diskriminiert. Der Grund für diese Benachteiligung könnte nach wie vor in den Pheromonen liegen, da diese Hybriden eine "falsch ausgerichtete" Pheromonmischung aufweisen, was zu geringeren Paarungsmöglichkeiten führt. So produzieren beispielsweise *D. mel-sim*-Weibchen 7-T, einen bekannten Antagonisten. So produzieren beispielsweise *D. mel-sim*-Weibchen 7-T, einen bekannten Antagonisten (Scott, 1986) für männliche *D. melanogaster*, was wahrscheinlich männliche *D. melanogaster* dazu veranlasst, sich lieber mit weiblichen *D. melanogaster* als mit *D. mel-sim* zu paaren. Für männliche *D. melanogaster*, was wahrscheinlich männliche *D. melanogaster* dazu veranlasst, sich lieber mit weiblichen *D. melanogaster* als mit *D. mel-sim* zu paaren.

Innerhalb der Arten der *simulans* Untergruppe weisen jedoch einige Hybriden einen Paarungsvorteil auf. So haben beispielsweise *D. sim-sec*-Männchen und *D. sim-mau*-Männchen einen Vorteil gegenüber *D. simulans*-Männchen. Überraschenderweise weisen beide Arten von Hybriden oft ähnliche oder sogar niedrigere Pheromonwerte auf als die benachteiligten *D. simulans*-Männchen. Daher kann die Pheromonmenge allein diesen Paarungsvorteil nicht erklären. Morphologisch weist der Hinterlappen der Hybriden im Vergleich zu *D. simulans*-Männchen eine besondere Form auf, was auf eine evolutionäre Fehlanpassung an die "Schloss-und-Schlüssel"-Theorie der Morphologie des männlichen Hinterlappens hindeuten könnte, auch wenn diese Theorie umstritten bleibt.

Der bei den männlichen Hybriden beobachtete Paarungsvorteil lässt sich auf zwei Faktoren zurückführen:

1. Größere Größe: Bei unseren Experimenten haben wir festgestellt, dass die Hybriden tendenziell eine größere Körpergröße haben als die männlichen *D. simulans*, was es ihnen möglicherweise ermöglicht, eine günstigere Position beim Werben einzunehmen.

2. Erhöhter Balzdrang: Hybriden zeigen möglicherweise einen höheren Balzdrang im Vergleich zu reinen Arten.

Ein weiterer bemerkenswerter Aspekt ist der Paarungsvorteil der weiblichen *D. sim-sec*, die im Vergleich zu rivalisierenden weiblichen *D. sechellia* empfänglicher für das Werben um männliche *D. sechellia* zu sein scheinen. Die Untersuchung der neuronalen Aktivität und der Entscheidungsfindungsprozesse bei weiblichen Hybriden ist ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zum Verständnis dieser Verhaltensmuster.

#### 4.4 Hybridisierung im Anthropozän

Im Zeitalter des Anthropozäns haben menschliche Aktivitäten unbestreitbar einen tiefgreifenden Einfluss auf Insekten. Der Rückgang der Insektenpopulationen kann weitgehend auf den übermäßigen Einsatz von Pestiziden und die Zerstörung von Insektenlebensräumen zurückgeführt werden. Jüngste Studien haben zudem gezeigt, dass Luftschadstoffe wie Ozon die Partnererkennung von Insekten stören können (Jiang et al., 2023). Auch die Hybridisierung zwischen verschiedenen Arten ist ein in der Natur beobachtetes Phänomen. So dokumentierten Fisher et al. (2006) die Hybridisierung zwischen Schwertträgerfischen, *Xiphophorus birchmanni*, und *X. malinche* aufgrund der chemischen Verschmutzung des Wassers. Im Rahmen unserer Studie zeigen wir, dass die Hybridisierung zwischen verschiedenen *Drosophila*-Arten zwei bedeutende Auswirkungen auf die ursprüngliche Insektenpopulation haben kann:

1. Paarung mit männlichen Hybriden: Dieses Szenario führt wegen der Sterilität männlicher *Drosophila* Hybride in eine evolutionäre Sackgasse und trägt in der Folge zu einem Rückgang der Insektenpopulation bei.

2. Paarung mit weiblichen Hybriden: In diesem Fall sind die Folgen zweifach. Diese weiblichen Hybriden tragen nicht nur zu einem Rückgang der ursprünglichen Insektenpopulation bei, sondern haben auch das Potenzial, eine neue Phase der Artbildung einzuleiten.

Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse die komplexe Art und Weise, wie sich die Hybridisierung zwischen verschiedenen *Drosophila*-Arten auf die Insektenpopulationen auswirken kann, mit möglichen Auswirkungen auf die gesamte ökologische Landschaft.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Bill Hansson und Herrn Dr. Markus Knaden, für die Chance mein Praktikum und Bachelorarbeit am Max-Planck Institut durchzuführen, und für die Begutachtung meiner Bachelorarbeit.

Besondere Dank gebührt Herrn Dr. Nanji Jiang, der meine Bachelorarbeit betreut hat. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken. Und ich bedanke mich bei meiner Hochschulebetreuerin Frau Prof. Dr. Antje Burse, die meine Bachelorarbeit begutachtete.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Kommilitonin Jasmin Große bedanken, die mir mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Außerdem möchte ich Herrn Roland Spieß für das Korrekturlesen meiner Bachelorarbeit danken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Xinqi Dong

Jena, 18.09.2023

## Literaturverzeichnis

- Agrawal, S., Safarik, S., & Dickinson, M. (2014): The relative roles of vision and chemosensation in mate recognition of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 217(15), 2796-2805.
- Birchler, J. A., Yao, H., Chudalayandi, S., Vaiman, D., & Veitia, R. A. (2010): Heterosis. *The Plant Cell*, 22(7), 2105-2112.
- Blows, M. W., & Allan, R. A. (1998): Levels of mate recognition within and between two *Drosophila* species and their hybrids. *The American Naturalist*, 152(6), 826-837.
- Chapman, M. A., & Burke, J. M. (2007). Genetic divergence and hybrid speciation. *Evolution*, 61(7), 1773-1780.
- Cobb, M., & Jallon, J. M. (1990): Pheromones, mate recognition and courtship stimulation in the *Drosophila melanogaster* species sub-group. *Animal Behaviour*, 39(6), 1058-1067.
- Cook, B., Haverkamp, A., Hansson, B. S., Roulston, T. A., Lerda, M., & Knaden, M. (2020): Pollination in the Anthropocene: a moth can learn ozone-altered floral blends. *Journal of Chemical Ecology*, 46, 987-996.
- Coyne, J. A., Crittenden, A. P., & Mah, K. (1994): Genetics of a pheromonal difference contributing to reproductive isolation in *Drosophila*. *Science*, 265(5177), 1461-1464.
- Coyne, J. A. (1996): Genetics of differences in pheromonal hydrocarbons between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics*, 143(1), 353-364.
- Coyne, J. A., & Charlesworth, B. (1997): Genetics of a pheromonal difference affecting sexual isolation between *Drosophila mauritiana* and *D. sechellia*. *Genetics*, 145(4), 1015-1030.
- David, J. R., Lemeunier, F., Tsacas, L., & Yassin, A. (2007): The historical discovery of the nine species in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Genetics*, 177(4), 1969-1973.
- David, J. R., McEvey, S. F., Solignac, M., & Tsacas, L. (1989): *Drosophila* communities on Mauritius and the ecological niche of *D. mauritiana* (Diptera, Drosophilidae). *Revue de zoologie africaine* (1974), 103(1), 107-116.
- Dobzhansky, T. (1950): Genetics of natural populations. XIX. Origin of heterosis through natural selection in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 35(3), 288.
- Ewing, A. W., & Bennet-Clark, H. C. (1968): The courtship songs of *Drosophila*. *Behaviour*, 31(3-4), 288-301.
- Farré-Armengol, G., Penuelas, J., Li, T., Yli-Pirilä, P., Filella, I., Llusia, J., & Blande, J. D. (2016): Ozone degrades floral scent and reduces pollinator attraction to flowers. *New Phytologist*, 209(1), 152-160.
- Fiore, A. M., Jacob, D. J., Field, B. D., Streets, D. G., Fernandes, S. D., & Jang, C. (2002): Linking ozone pollution and climate change: The case for controlling methane. *Geophysical Research Letters*, 29(19), 25-1.

- Fisher, H. S., & Rosenthal, G. G. (2006): Female swordtail fish use chemical cues to select well-fed mates. *Animal Behaviour*, 72(3), 721-725.
- Fuentes, J. D., T'ai, H. R., & Zenker, J. (2013): Ozone impedes the ability of a herbivore to find its host. *Environmental Research Letters*, 8(1), 014048.
- Gottsberger, B., & Mayer, F. (2007): Behavioral sterility of hybrid males in acoustically communicating grasshoppers (Acrididae, Gomphocerinae). *Journal of Comparative Physiology A*, 193, 703-714.
- Gottsberger, B., & Mayer, F. (2019): Dominance effects strengthen premating hybridization barriers between sympatric species of grasshoppers (Acrididae, Orthoptera). *Journal of evolutionary biology*, 32(9), 921-930.
- Haldane, J. B. (1922): Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of genetics*, 12, 101-109.
- Hall, J. C. (1994): The mating of a fly. *Science*, 264(5166), 1702-1714.
- Higgie, M., Chenoweth, S., & Blows, M. W. (2000): Natural selection and the reinforcement of mate recognition. *Science*, 290(5491), 519-521.
- Hoy, R. R., Hoikkala, A., & Kaneshiro, K. (1988): Hawaiian courtship songs: evolutionary innovation in communication signals of *Drosophila*. *Science*, 240(4849), 217-219.
- Houle, D. (1989): Allozyme-associated heterosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 123(4), 789-801.
- Jiang, N. J., Chang, H., Weißflog, J., Eberl, F., Veit, D., Weniger, K., ... & Knaden, M. (2023): Ozone exposure disrupts insect sexual communication. *Nature Communications*, 14(1), 1186.
- Karlson, P., & Lüscher, M. (1959): 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183(4653), 55-56.
- Krebs, R. A. (1990): Courtship behavior and control of reproductive isolation in *Drosophila mojavensis*: Genetic analysis of population hybrids. *Behavior genetics*, 20(4), 535-543.
- Krstic, D., Boll, W., & Noll, M. (2009): Sensory integration regulating male courtship behavior in *Drosophila*. *PloS one*, 4(2), e4457.
- Lachaise, D., & J.-F. Silvain, (2004): How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* paleogeographic riddle. *Genetica* 120: 17–39. *Contemporary Issues in Genetics and Evolution*, vol 11. Springer, Dordrecht.
- Ladányi, M., Nowinszky, L., Kiss, O., Puskás, J., Szentkirályi, F., & Barczikay, G. (2012): Modelling the impact of tropospheric ozone content on light-and pheromone-trapped insects. *Applied Ecology and Environmental Research*, 10(4), 471-491.
- Li, G., Bei, N., Cao, J., Wu, J., Long, X., Feng, T., ... & Tie, X. (2017): Widespread and persistent ozone pollution in eastern China during the non-winter season of 2015: observations and source attributions. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(4), 2759-2774.

- Lin, M., Horowitz, L. W., Payton, R., Fiore, A. M., & Tonnesen, G. (2017): US surface ozone trends and extremes from 1980 to 2014: quantifying the roles of rising Asian emissions, domestic controls, wildfires, and climate. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(4), 2943-2970.
- Mallet, J. (2007): Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), 279-283.
- Markow, T. A. (1987): Behavioral and sensory basis of courtship success in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(17), 6200-6204.
- Markow, T. A., & Hanson, S. J. (1981): Multivariate analysis of *Drosophila* courtship. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(1), 430-434.
- Markow, T. A., & Manning, M. (1980): Mating success of photoreceptor mutants of *Drosophila melanogaster*. *Behavioral and Neural Biology*, 29(2), 276-280.
- Masly, J. P., Dalton, J. E., Srivastava, S., Chen, L., & Arbeitman, M. N. (2011): The genetic basis of rapidly evolving male genital morphology in *Drosophila*. *Genetics*, 189(1), 357-374.
- Masly, J. P. (2012): 170 years of "lock-and-key": genital morphology and reproductive isolation. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012.
- McFrederick, Q. S., Kathilankal, J. C., & Fuentes, J. D. (2008): Air pollution modifies floral scent trails. *Atmospheric Environment*, 42(10), 2336-2348.
- Ritchie, M. G., & Gleason, J. M. (1995): Rapid evolution of courtship song pattern in *Drosophila willistoni* sibling species. *Journal of Evolutionary Biology*, 8(4), 463-479.
- Scott, D. (1986): Sexual mimicry regulates the attractiveness of mated *Drosophila melanogaster* females. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8429-8433.
- Serrato-Capuchina, A., Schwochert, T. D., Zhang, S., Roy, B., Peede, D., Koppelman, C., & Matute, D. R. (2021): Pure species discriminate against hybrids in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evolution*, 75(7), 1753-1774.
- Svedin, N., Wiley, C., Veen, T., Gustafsson, L., & Qvarnström, A. (2008): Natural and sexual selection against hybrid flycatchers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1635), 735-744.
- Tamura, K., Subramanian, S., & Kumar, S. (2004): Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. *Molecular biology and evolution*, 21(1), 36-44.
- Tsacas, L., Cariou, M. L., & Lachaise, D. (1985): Le groupe *Drosophila obscura* en Afrique de l'Est, description de trois nouvelles espèces (Diptera: Drosophilidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.(NS)*, 21, 413-424.
- Vingarzan, R. (2004): A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric environment*, 38(21), 3431-3442.
- Wang, T., Xue, L., Brimblecombe, P., Lam, Y. F., Li, L., & Zhang, L. (2017): Ozone pollution in China: A review of concentrations, meteorological influences, chemical precursors, and effects. *Science of the Total Environment*, 575, 1582-1596

## Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in der gleichen oder ähnlichen Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

Hiermit erkläre ich mich mit der Einsichtnahme in meine Abschlussarbeit im Archiv der Bibliothek der EAH Jena einverstanden / ~~nicht einverstanden~~ (Unrichtiges bitte streichen).

Ort, Datum      Unterschrift

