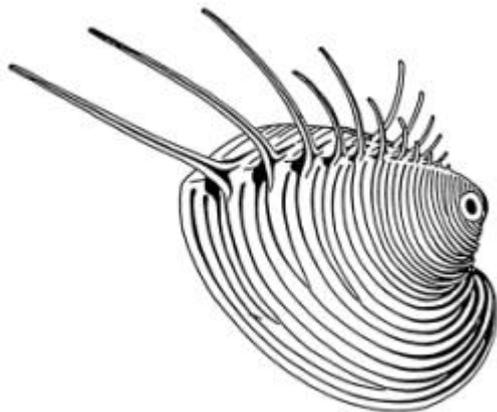




Molekulare Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia (Mollusca)

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)
an der Fakultät für Naturwissenschaften
und Mathematik der Universität Wien



DURCHFÜHRUNG

Mag. Sabine E. Hammer

LEITUNG

Prof. Mag. Dr. L. Salvini-Plawen

ORT

Institut für Zoologie, Universität Wien
Abteilung für Systematische Zoologie
und Entwicklungsgeschichte

Wien, im Oktober 2001



Wer ist weise?
Wer von jedermann lernt.
Wer ist stark?
Wer sich selbst überwindet.
Wer ist reich?
Wer sich mit dem Seinigen begnügt.
Wer ist achtbar?
Wer die Menschen achtet.

Talmud



INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	5
Summary	6
Zusammenfassung	7
I. EINLEITUNG	8
I.1. Das Phylum Mollusca Cuvier, 1795	9
I.1.1. Unterstamm *Aculifera* (Stachelweichtiere)	12
I.1.2. Unterstamm Conchifera (Schalenweichtiere)	12
I.2. Die Klasse Bivalvia Linné, 1758	13
I.2.1. Allgemeine Charakteristika	14
I.2.2. Die Unterklassen der Bivalvia im Überblick	16
I.2.3. Wichtige Merkmale der Großgruppen der Bivalvia	17
I.2.4. Die Großgruppen der Pteriomorpha im Überblick	20
I.3. Phylogenie der Pteriomorpha	21
I.3.1. Glossar für die phylogenetische Methode	21
I.3.2. Molekulare Phylogenien der Pteriomorpha	24
I.3.3. Verwendete molekulare Marker: 18S und 28S rDNA	29
I.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	33
II. MATERIAL UND METHODEN	35
II.1. Untersuchte Tiere	36
II.2. Sequenzierung der 18S rDNA	40
II.2.1. DNA-Extraktion mittels Chelex [®] 100 Resin	40
II.2.2. Amplifikation der 18S rDNA mittels PCR	41
II.2.3. Sequenzierung	44
II.3. Sequenzierung der 28S rDNA	45
II.3.1. DNA-Extraktion nach dem CTAB-Protokoll	45
II.3.2. Amplifikation der 28S rDNA mittels PCR	46
II.3.3. Klonierung der 28S rDNA	47
II.4. Phylogenetische Analyse	51
II.4.1. Verwendete Programme und Parameter	51
II.4.2. Verwendete Taxa in der phylogenetischen Analyse	53
II.4.2.1. 18S rDNA-Datensatz	53
II.4.2.2. 28S rDNA-Datensatz	56
II.4.2.3. 18S+28S rDNA-Datensatz	57



III. ERGEBNISSE	59
III.1. 18S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia	60
III.1.1. Erhaltene 18S rDNA-Sequenzen	60
III.1.2. Phylogenetische Beziehungen höherer Taxa	61
III.1.3. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha	65
III.2. 28S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia	68
III.2.1. Erhaltene 28S rDNA-Sequenzen	68
III.2.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha	69
III.3. 18S+28S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia	73
III.3.1. Erhaltene 18S+28S rDNA-Sequenzen	73
III.3.2. Phylogenetische Beziehungen der Pteriomorpha	74
IV. DISKUSSION	78
IV.1. Phylogenie der Pteriomorpha	79
IV.1.1. Phylogenetische Beziehungen höherer Taxa	79
IV.1.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha	82
IV.2. Aussagekraft der molekularen Daten	85
IV.2.1. Sequenzalignments	85
IV.2.2. Transitions/Transversionsraten	86
IV.2.3. Substitutionsraten	87
IV.3. Kongruenz zwischen morpholog. und molekul. Daten	89
V. ANHANG	93
V.1. Verwendete Lösungen und Chemikalien	94
V.1.1. Enzyme, Puffer und Lösungen	94
V.1.2. Verwendete Chemikalien und Enzyme	95
V.2. Verzeichnisse	97
V.2.1. Zitierte Literatur	97
V.2.2. Verwendete Abkürzungen	101
V.2.3. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	104
V.2.4. 28S rDNA-Datenset (aktualisiert)	106
V.2.5. Sequenzierte Taxa	108
V.2.6. Bildtafeln der sequenzierten Pteriomorpha	109
V.3. Curriculum vitae	115
V.4. Publikationen	118



DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, daß sie jederzeit ein offenes Ohr für meine Probleme und Sorgen hatten und nach wie vor haben. Andererseits aber auch immer meine Erfolgserlebnisse mit der für sie typischen Begeisterung mit mir teilen.

Ich danke meinem Dissertationsbetreuer, Univ.-Prof. Mag. Dr. Luitfried Salvini-Plawen (Institut für Zoologie, Universität Wien) für die Überlassung der Fragestellung und für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Zoologie der Universität Wien durchführen zu können. Ebenso danke ich meinem Projektleiter, Ao. Univ.-Prof. Dr. Gerhard Steiner (Institut für Zoologie, Universität Wien), für seine großzügige Unterstützung bei der Datenauswertung für diese Dissertation. Weiters auch für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit und die zahlreichen wichtigen wie auch lehrreichen Anregungen. Bei Ao. Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Pinsker (Institut für Medizinische Biologie, Universität Wien) möchte ich mich ebenfalls für sein fortwährendes Interesse an meiner wissenschaftlichen Laufbahn im Allgemeinen und an dieser Dissertation im Speziellen bedanken.

Allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Systematische Zoologie und Entwicklungsgeschichte danke ich für die vielfältigen Erscheinungsformen ihrer Unterstützung während meines Doktoratsstudiums - sie wissen schon, was alles damit gemeint ist! Weiters gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Zoologie für die gute Zusammenarbeit.

Für die Unterstützung bei der Sammlung der Proben bedanke ich mich bei Werner Piller, Martin Zuschin und Karl Kleemann (Institut für Paläontologie, Universität Wien), David Campbell (University of South Carolina, USA), Bruce Marshall (Museum of New Zealand Te Papa Tongarewa) sowie Argyro Zenetos (National Center of Marine Research, Greece). Für wertvolle technische Hilfestellungen bei der Sequenzierung danke ich Robert Felber und Manfred Müller (VBC Genomics Bioscience Research GmbH, Wien). Gonzalo Giribet (Harvard, Massachusetts, USA) stellte uns freundlicherweise vier 18S rDNA-Sequenzen vor deren eigentlicher Veröffentlichung für unsere Analysen zur Verfügung.

Abschließend gilt mein ganz besonderer Dank Katrina, die maßgeblich daran beteiligt war, daß die Zeit des „Zusammenschreibens“ eine doch sehr angenehme war. Für die gemeinsame Zeit während der praktischen Arbeit möchte ich mich bei Silvia bedanken. Tja, und bezüglich all meiner Freundinnen und Freunden kann ich nur sagen: Ich bin einfach froh, daß es Euch gibt!

Diese Arbeit wurde unterstützt vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF), Österreich, und trägt die Projektnummer P11846-GEN, bewilligt für Ao. Univ.-Prof. Dr. Gerhard Steiner.



SUMMARY

Phylogenetic studies on the Pteriomorpha, a major division of the Bivalvia with Ordovician origins, produced contradictory results, because of convergent and parallel evolution in numerous morphological characters. In the present study, two ribosomal data sets are used to elucidate pteriomorph relationships with molecular characters, expected to be less prone to convergence due to similar life styles. The 18S rDNA data set contains 72 pteriomorph and 28 molluscan outgroup sequences; the 28S rDNA (domains D1-D3) data set contains 33 pteriomorph and 2 protobranch outgroup sequences; whereas the 18S plus 28S rDNA data set in combination consists of 30 pteriomorph and 2 protobranch outgroup sequences. Parsimony, maximum-likelihood (ML), spectral analysis methods are used for phylogenetic analysis. Branch support is calculated by bootstrap, decay, and puzzle indices.

The relative rate test returns significantly lower rates in the 18S rDNA for the Pteriomorpha than for all the other molluscan groups; rates comparison among the pteriomorph families shows higher values for the 28S rDNA, but only moderate correlation between the genes. In general, the branches of family-group taxa have strongest support. The analysis of the 18S data yield 106946 most parsimonious trees (MPT), however, the strict consensus tree shows only a single polytomy for the major groups. The 28S data yield two MPT with the only polytomy being within the Arcoidea. The two genes support similar topologies differing only in the arrangement of the basal groups Mytiloidea and Arcoidea. These uncertainties become also apparent in the ML analyses, both in the branching order of these two groups and in very short branch lengths in this area. The 18S plus 28S rDNA combined data return one MPT that shows the same topology as the ML-tree of the 28S data set, but has higher branch support.

Parallel or convergent evolution of morphological characters is discussed under the topology of the combined molecular data. Finally, the pteriomorph data set is an example for the advantages of combining two molecular marker systems yielding increased resolution and branch support.



ZUSAMMENFASSUNG

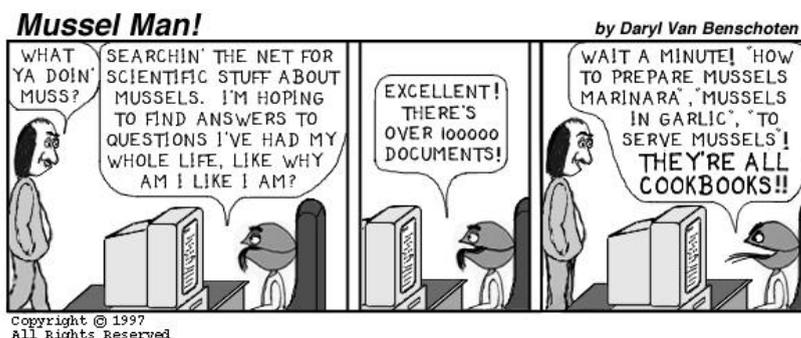
Die Pteriomorpha bilden eine Ordnung innerhalb der Bivalvia (Mollusca), deren Ursprung auf das Ordovizium zurückgeht. Phylogenetische Studien führten stets zu widersprüchlichen Ergebnissen, was durch konvergente und parallele Evolution bei zahlreichen morphologischen Merkmalen erklärt wird. In dieser Arbeit werden zwei ribosomale Datensätze (18S und 28S rDNA) verwendet, um intraspezifische Beziehungen der Pteriomorpha zu untersuchen. Der 18S-Datensatz besteht aus 72 Pteriomorpha und 28 anderen Vertretern der Mollusca; der 28S-Datensatz umfaßt 33 Pteriomorpha sowie 2 Protobranchia; der 18S- plus 28S-Datensatz in Kombination beinhaltet 30 Pteriomorpha und wiederum 2 Protobranchia. Die phylogenetische Analyse wird mit Parsimonie, Maximum-Likelihood (ML) und der Spektralanalyse durchgeführt. Die Robustheit der Knoten der ermittelten Bäume wird mit Bootstrap, Decay- und Puzzle-Indizes überprüft.

Der „Relative Rate Test“ ergibt für die Pteriomorpha signifikant niedrigere Werte in der 18S rDNA als bei den anderen Gruppen der Mollusca. Ein Vergleich der Raten zwischen den Familien der Pteriomorpha zeigt höhere Werte für die 28S rDNA. Es gibt nur eine moderate Korrelation zwischen diesen beiden Genen und die Knoten der Familiengruppen sind am besten unterstützt. Die Analyse der 18S-Daten ergibt 106946 „most parsimonious trees“ (MPT) und der „strict consensus tree“ zeigt eine einzige Polytomie für die Großgruppen. Die Analyse der 28S-Daten führt zu 2 MPT und die einzige Polytomie befindet sich innerhalb der Arcoidea. Die ML-Analysen bestätigen, daß beide Gene ähnliche Topologien unterstützen, die sich nur im Arrangement der basalen Gruppen Mytiloidea und Arcoidea unterscheiden. Die Analyse der 18S- plus 28S-Daten in Kombination ergibt 1 MPT, der die gleiche Topologie wie der 28S-ML-Baum zeigt, jedoch mit höherer Robustheit in den Knoten.

Der vorliegende Datensatz zeigt, daß die Verwendung von zwei molekularen Markersystemen in Kombination die Auflösung und die Robustheit der phylogenetischen Rekonstruktion verbessert.



I. EINLEITUNG



I.1. Das Phylum Mollusca Cuvier, 1795	9
I.1.1. Unterstamm *Aculifera* (Stachelweichtiere)	12
I.1.2. Unterstamm Conchifera (Schalenweichtiere)	12
I.2. Die Klasse Bivalvia Linné, 1758	13
I.2.1. Allgemeine Charakteristika	14
I.2.2. Die Unterklassen der Bivalvia im Überblick	16
I.2.3. Wichtige Merkmale der Großgruppen der Bivalvia	17
I.3.4. Die Großgruppen der Pteriomorpha im Überblick	20
I.3. Phylogenie der Pteriomorpha	21
I.3.1. Glossar für die phylogenetische Methode	21
I.3.2. Molekulare Phylogenie der Pteriomorpha	24
I.3.3. Verwendete molekulare Marker: 18S und 28S rDNA	29
I.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	33



I.1. Das Phylum Mollusca Cuvier, 1795

Die Mollusca (Weichtiere) bilden eine besonders formen- wie auch artenreiche Tiergruppe, die den zweitgrößten Tierstamm repräsentiert und primär den marinen Lebensraum besiedelt. Rezent sind acht Klassen mit ca. 55 000 Arten bekannt (Mizzarro-Wimmer & Salvini-Plawen 2001) (Abb. 1), die vorwiegend zu den Schnecken (Gastropoda) und Muscheln (Bivalvia) zu zählen sind und deren Ursprung bereits auf das Präkambrium zurückgeht. Die am höchsten organisierten und physiologisch leistungsfähigsten Mollusken sind die Kopffüßer (Cephalopoda). Der Lebensraum der Mollusken umfaßt alle Habitats, mit Ausnahme der vom Dauereis bedeckten Hochgebirgs- und Polarregionen, sowie der Luft (Mizzarro-Wimmer & Salvini-Plawen 2001; Westheide & Rieger 1996).

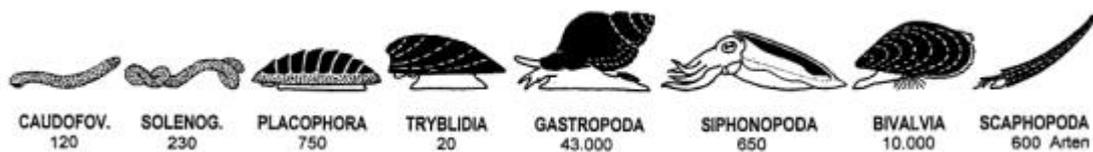


Abb. 1: Die Klassen der Mollusca in schematisierten Darstellung. Aus Mizzarro-Wimmer & Salvini-Plawen (2001, p. 1)

Der Körper der Mollusken weist im Grundbauplan eine Dorsoventralität auf, ist unsegmentiert und höchstens in Kopf und Rumpf gegliedert. Der lokomotorische Abschnitt (Fuß) bildet zusammen mit dem teils frontal abgesetzten Kopfbereich den Ventralabschnitt des Körpers. Je nach Klasse sind verschiedene Differenzierungen des Fußes als Lokomotionsorgan beschrieben. Das Nervensystem besteht aus einem cerebralen Zentrum, sowie aus dem Buccalring und zwei Paar Körperstränge (Tetraneurie). Die Körperdecke ist dorsal meist mit Schuppen, Nadeln, Platten oder einer Schale versehen und daher zu einem schützenden Mantel (Pallium) differenziert; nackte Bereiche des Körpers sind sehr reich an Schleimdrüsen. Der Respirationsraum (Mantelhöhle) befindet sich allseitig oder terminal an der Grenze zwischen Fuß und Mantel unter einer freien Mantelfalte und ist meist mit fiederförmigen Kiemen ausgestattet. Weiters besitzen die Mollusken (mit Ausnahme der Bivalvia) im Vorderdarm eine Radula (bezahlte Chitinmembran), und das dorsocaudale Herz befindet sich in dem sogenannten Pericardialraum (Mizzarro-Wimmer & Salvini-Plawen 2001).

Zwar sind Mollusken bilateralsymmetrische Organismen, dennoch weisen sie gelegentlich eine Tendenz zur Asymmetrie auf, die bei den Gastropoda (Schnecken) den gesamten Körper umfaßt. Die Ontogenie verläuft meist über eine Spiralfurchung und die Bildung einer pelagischen Larve (Hüllglockenlarve - z.B. Solenogastres; Pseudotrochophora - z.B. Polyplacophora; planktotrophe Veliger - z.B. Gastropoda). Die Ausnahme bei den Mollusca bilden die Cephalopoda, da bei diesen primär keine Larve mehr gebildet wird, sondern eine direkte Entwicklung stattfindet.



Wie bereits eingangs erwähnt, handelt es sich bei den Mollusken hinsichtlich des Erscheinungsbildes, der Anatomie, sowie der Ökologie wie auch Physiologie um eine äußerst diverse Tiergruppe (Mizzaro-Wimmer & Salvini-Plawen 2001; Salvini-Plawen & Steiner 1996). Aus diesem Grunde werden bereits seit Beginn von vergleichenden Untersuchungen sowohl der phylogenetische Entwicklungsweg des Phylums im Allgemeinen, wie auch jener der acht Klassen der Mollusca im Speziellen stets kontrovers diskutiert (vgl. Haszprunar 2000; Salvini-Plawen & Steiner 1996). Beruhend auf Analysen von morphologischen wie auch molekularen Merkmalen wird die Position des Phylums Mollusca innerhalb der Spiralia¹⁾ angenommen. Bezüglich des phylogenetischen Hintergrundes der Entwicklung dieses Phylums war man einerseits der Auffassung, daß die Vorfahren der Mollusca Turbellarien-ähnliche Organismen waren, andererseits schien auch einiges für einen Anneliden-ähnlichen Ursprung zu sprechen (Haszprunar 2000). Gegenwärtig wird allerdings der Ursprung der Mollusca bevorzugt im Zusammenhang mit den Coelomata gesehen (vgl. Haszprunar 2000 und dort zitierte Arbeiten). Hinsichtlich der Identität der Schwesterngruppen zu den Mollusken ergeben die Auswertungen von molekularen Daten im Allgemeinen nach wie vor keinen eindeutigen Befund (vgl. Boore & Brown 1994 und Winnepeninckx et al. 1996). Die Analysen von phänotypischen (= morphologischen) Merkmalen hingegen weisen jedoch darauf hin, daß vor allem die Sipuncula (Sipunculida - Spritzwürmer) oder aber die Kamptozoa (Entoprocta - Kelchwürmer) die unmittelbaren Schwesterngruppen zu den Mollusken bilden (vgl. Haszprunar 2000 und dort zitierte Arbeiten).

Jene grundlegenden interspezifischen Beziehungen der acht Klassen der Mollusca beruhend auf der Abfolge von Änderungen bestimmter Merkmalsausprägungen (anagenetische Merkmale) und des organisatorischen Niveaus, die mittlerweile generell akzeptiert zu sein scheinen, sind in Abbildung 2 dargestellt. In jener Studie, aus der diese Abbildung entnommen wurde (Salvini-Plawen & Steiner 1996), dient ein ancestraler, hypothetischer Archimollusk mit den plesiomorphen Merkmalen Mantel, Radula und Adultus mit Fuß als Ausgangs-Organismus für dieses Phylum. Die Differenzierung verläuft ausgehend von einem aplacophoren Stadium über das polyplacophore und ein gemeinsames monoplacophores Stadium bis zur Entwicklungsstufe der Conchifera (höheres-conchiferes Stadium) (Mizzaro-Wimmer & Salvini-Plawen 2001; Salvini-Plawen & Steiner 1996).

Das Konzept der Monophylie der jeweiligen fünf Klassen der Mollusca, die innerhalb der Conchifera (Schalenweichtiere) zusammengefaßt werden, scheint gegenwärtig sehr breiten Konsens zu finden (Haszprunar 2000). Über den Status und die phylogenetische Position der Klassen Caudofoveata (Schildfüßer), Solenogastres (Furchenfüßer) und Polyplacophora (Käferschnecken), die unter der Bezeichnung *Aculifera* (Stachelweichtiere) vereinigt werden, herrschen nach wie vor rege Auseinandersetzungen (Haszprunar 2000).

¹⁾ Unter „Spiralia“ versteht man die Protostomia-Gruppen mit Spiralfurchung.

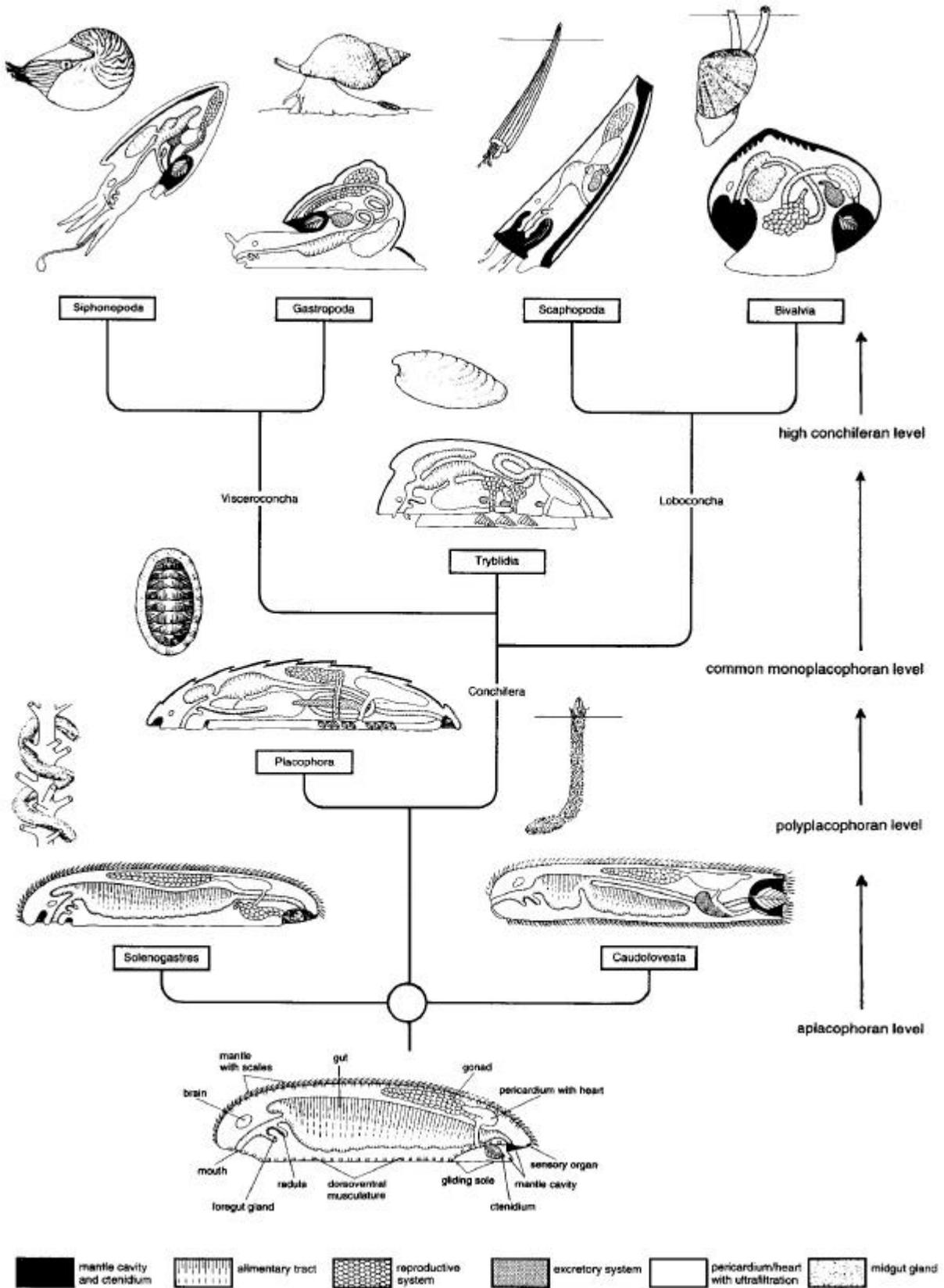


Abb. 2: Phylogenie der rezenten Mollusca beruhend auf anagenetischen Ebenen der Differenzierung. Ein ancestraler, hypothetischer Archimollusk mit plesiomorphen Merkmalen dient als Ausgangs-Organismus für dieses Phylum. Aus Salvini-Plawen & Steiner (1996).



I.1.1. Unterstamm *Aculifera* (Stachelweichtiere)

Aculifera sind wurmähnliche oder stark abgeflachte Mollusca, deren Mantel über dem gesamten Körper entwickelt ist und Schuppen, Stacheln oder 8 dorsale Platten aufweist. Die Gestalt der Tiere ist gestreckt und streng bilateral-symmetrisch mit einer ausgeprägten Längsachse. Der Kopf-abschnitt fehlt oder ist nur schwach entwickelt, wodurch weder Kopfaugen noch Fühler oder Statocysten vorhanden sind. Der Anus liegt subterminal. Nachstehend sind die beschriebenen Klassen der *Aculifera* mit der Anzahl der bisher bekannten Arten angeführt (Mizzaro-Wimmer & Salvini-Plawen 2001):

- ◆ Klasse Caudofoveata (Schildfüßer)
ca. 120 Arten
- ◆ Klasse Solenogastres (Furchenfüßer)
ca. 230 Arten
- ◆ Klasse Polyplacophora (Käferschnecken)
ca. 750 Arten

I.1.2. Unterstamm Conchifera (Schalenweichtiere)

Die Conchifera sind vielgestaltige Mollusca, deren Mantel zum Teil auf den Rumpf beschränkt und in der Regel von einer Schale ganz oder teilweise bedeckt ist. Diese Schale besteht meist nur aus einem einheitlichen oder längsgeteilten Stück, das ursprünglich die Tiere zur Gänze bedeckte. Bei verschiedenen Tiergruppen kann die Schale reduziert sein, überwachsen sein, oder ganz fehlen. Die Schale entsteht generell aus dem Bereich der Schalendrüse der Larve aus verdickten Ektoderm-zellen, die eine Schicht Calcium-bindender Glykoproteide (Conchin) sezernieren. Der Kopfabschnitt der Conchifera weist Anhangsorgane wie z.B. Tentakel, Mundlappen oder Fangarme auf, und für den Vorderdarm sind Kieferbildungen beschrieben. Nachstehend sind die beschriebenen Klassen der Conchifera mit der Anzahl der bisher bekannten Arten angeführt (Mizzaro-Wimmer & Salvini-Plawen 2001):

- ◆ Monoplacophora (Tryblidia - Urmützenschnecken, Napfschaler)
ca. 20 Arten
- ◆ Klasse Gastropoda (Schnecken)
ca. 43 000 Arten
- ◆ Klasse Cephalopoda (Kopffüßer)
ca. 650 Arten
- ◆ Klasse Scaphopoda (Grabfüßer)
ca. 600 Arten
- ◆ **Klasse Bivalvia (Muscheln)**
ca. 10 000 Arten



I.2. Die Klasse Bivalvia Linné, 1758

Die Bivalvia (Muscheln) sind Conchifera mit seitlich zusammengedrücktem Weichkörper und einer Schale, die in der Rückenmitte längsgeteilt ist. Die Schale besteht meist aus gleichseitigen Klappen mit einer Gelenkregion (Schloß), und die Oberfläche kann stark skulpturiert, bunt gefärbt und mit Zeichnungsmustern versehen sein. Grundsätzlich ist die Schale sehr fest und robust, bei Schlammbewohnern hingegen kann sie auch dünn und zerbrechlich sein. Die Schlundregion mit Radula und Kiefer ist rückgebildet. Die Mehrzahl der Bivalvia gräbt mit Hilfe des oft weit vorstreck-baren Fußes im Untergrund, die Herzmuscheln (Cardiidae) können mit ihrem genickten Fuß springen, die Kammuscheln (Pectinidae) öffnen und schließen die beiden Klappen und schwimmen dadurch vermittels Rückstoß in schwankender Bewegung. Mit ihrer Größe von 0,5 bis 50cm zählen sie grundsätzlich zur Makrofauna der Tierwelt. Bewohner des Hartbodens und manche Sandbodenbewohner verankern sich mit Hilfe von Byssusfäden oder verwachsen mit einer Schalenhälfte am Untergrund. Einige Arten vermögen auf mechanische oder chemische Weise im Gestein oder im Holz zu bohren.

Die nachstehende Abbildung 3 (Kükenthal 1991) zeigt einen Mediosagittalschnitt durch eine formolgehärtete Miesmuschel *Mytilus edulis* (Mytilidae, Pteriomorpha). Die abgebildeten anatomisch-morphologischen Charakteristika von *Mytilus edulis* sollen hier stellvertretend für die Bivalvia, und hier in erster Linie für die Pteriomorpha (Bivalvia, Mollusca) stehen.

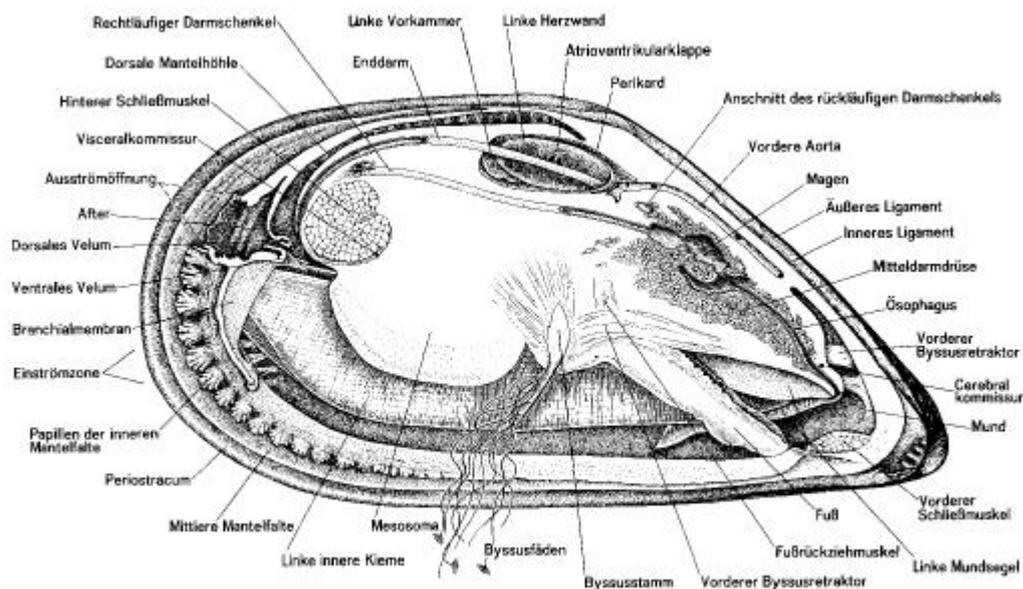


Abb. 3: Mediosagittalschnitt durch eine formolgehärtete Miesmuschel (*Mytilus edulis*, Mytilidae, Pteriomorpha). Aus Kükenthal (1991, p. 162).



I.2.1. Allgemeine Charakteristika

Weichkörper, Fuß, Mundöffnung, Schalenhälften

Der *Weichkörper* ist beiderseits ganz von herabhängenden Mantelfalten umhüllt, die Mantelränder beinhalten oft Taster oder auch Augen (z.B. bei den Pectinidae). Die Ränder können aber auch verwachsen sein und lediglich Öffnungen der Siphonen und für den Fuß aussparen. Die Mantelhöhle ist beiderseits langgestreckt (peripedal) und darin befinden sich die Kiemen. Bei grabenden und bohrenden Arten ist der hintere Mantelabschnitt zu zwei oder (durch Verwachsung) einer langen, vorstreckbaren Röhre (Sipho) ausgezogen.

Der ventrale *Fuß* ist austreckbar und kann eine beil-, zungen- oder wurmförmige Form annehmen, wobei sich bei festsitzenden und schwimmenden Arten der Fuß in Rückbildung befindet. An der hinteren Basis bleibt bei den Pteriomorpha oftmals das erstarrte Festheftungssekret (Byssus - „Bart“) zeitlebens erhalten.

Die *Mundöffnung* ist meist von Anhangsorganen (Lappen, Palpen) umgeben.

Die *Schalenhälften* sind gleich oder ungleichklappig (inaequivalve), abgerundet, eiförmig bis elliptisch, keilförmig, schnabelförmig ausgezogen („geschnäbelt“) oder lang scheidenförmig. Dorsomedian sind die Klappen durch ein elastisches Band (Ligament) verbunden. Der innere Rückenrand der Klappen ist in der Regel zu einer Schloßplatte verbreitert, die meist mit zahnartigen Fortsätzen oder Leisten versehen ist. Diese können gleichartig oder verschieden sein. Im letzteren Fall wird der unter dem Wirbel der rechten Schale gelegene Fortsatz als Zentralzahn bezeichnet, der meist von zwei Hauptzähnen und einer bogenförmigen Lamelle der linken Schale umschlossen wird. An diese schließen sich vorne und hinten oft leistenartige Seitenzähne an. Seitlich unterscheidet man die oft vorgewölbten Wirbel (Umbonen), von denen das Schalenwachstum durch Anwachsstreifen ausgeht. Bei den Kammuscheln (z.B. *Pecten jacobaeus* - Pilgermuschel, Pectinidae, Pteriomorpha) befinden sich zu beiden Seiten des Wirbels blattförmige Verbreiterungen (Ohren). Die Schalenoberfläche ist entweder glatt oder parallel zum Schalenrand (konzentrisch) bzw. senkrecht dazu (radial) skulpturiert. Die Innenseite ist mit „Narben“ der Muskelansätze versehen, vor allem jener der Schalenschließmuskeln (Adduktoren) welche ursprünglich aus zwei gleichstarken Muskeln bestehen. Parallel zum Schalenrand verläuft als Ansatzstelle der Mantelmuskel die Mantellinie, die bei siphonaten Formen hinten stark gebuchtet ist.

Alter, Fortpflanzung, Ernährung, Freißfeinde

Bivalvia sind mehrjährige Organismen, die sehr unterschiedliche *Lebensalter* erreichen können. So weisen z.B. Austern (Ostreidae, Pteriomorpha) eine Lebensspanne von 20 Jahren auf, Flußperlmuscheln (Margaritiferidae, Palaeoheterodonta) sowie Seedatteln (*Lithophaga* sp., Mytilidae, Pteriomorpha) können ein Alter von über 60 Jahren erreichen und bei den Riesenmuscheln (Tridacnidae, Heterodonta) konnten Individuen gefunden werden, die über 100 Jahre alt waren. Das Wachstum der Muscheln ist an den Zuwachsstreifen der Schalen erkennbar.

Bezüglich der *Fortpflanzung* handelt es sich bei den Bivalvia meist um getrenntgeschlechtliche Tiere, denn Zwitter werden selten festgestellt. Die Keimzellen (Eier und Samen) werden frei ins Wasser abgegeben. Die Nachkommenzahl kann enorm groß sein (*Ostrea* sp. – Auster ca. 1 Million), wobei der



Großteil während des pelagischen Larvenlebens zugrunde geht.

Die *Ernährung* ist zumeist filtrierend und erfolgt mit Hilfe der großflächigen Kiemen, wobei winziges Plankton, kleinste Grundbewohner und schwebende Detritusteilchen aufgenommen werden können. Ausnahmen stellen die Nuculanoidea und die Septibranchia dar. Erstere ernähren sich mittels großer Mundlappen mit tasterartigem Anhang von Plankton, und die Septibranchia sind carnivor; durch Pumpbewegungen eines horizontal liegenden Septums der Kiemenbasen wird das Einsaugen bewirkt.

Als typische *Freßfeinde* der Bivalvia sind größere Seesterne, Krebse, Fische, Küstenvögel und räuberische Schnecken bekannt. Weiters sind Muscheln häufig Zwischenwirte von Trematoden- und Cestodenlarven. Als Kommensale lebt in der Steckmuschel (z.B. *Pinna nobilis*, Pinnidae, Pteriomorpha) die Krabbe *Pinnotheres pisum* (Decapoda, Brachyura).

Entwicklung, Verbreitung

Bei den Ctenidiobranchia (Nuculanoidea) findet eine ursprüngliche *Entwicklung* mit walziger Pericalymma-Larve statt. Die Larve besteht aus dem inneren Imaginalkörper und einer äußeren, großzelligen Hüllglocke mit Wimpernschopf und 3 Wimpernkränzen. Die Hüllglocke wird im Zuge der Ontogenie abgeworfen und die juvenile Muschel lebt benthisch. Bei den übrigen Bivalvia ist oft ein zunächst Pseudotrochophora-ähnliches Stadium vorhanden, das am Rücken zuerst eine einheitliche Schalenkappe ausbildet. In weiterer Folge entwickelt sich daraus oder auch direkt - analog dem Veliger der Schnecken - die Veliconcha mit bereits zweiklappiger Larvialschale. Während des 1-4 wöchigen pelagischen Lebens ernährt sich die Larve von Kleinstplankton. Durch Vorwölbung entsteht bauchseits der Fuß (Pediveliger – *Mytilus* sp.) und nach Verlust des Velums beginnt die benthische Lebensweise.

Gegenwärtig sind etwa 10 000 Arten bekannt, die überwiegend den marinen Lebensraum besiedeln, einige Familien leben auch im Süßwasser. Das *Vorkommen* ist benthisch, d.h. auf allen Böden der Gezeitenzone bis in die Tiefsee, besonders artenreich sind Sedimentböden (Sand, Schlamm). Häufig bilden sich unter nahrungsreichen Wasserschichten regelrechtes Massenvorkommen. Nur die Larven und Planctomya leben meist kurze Zeit pelagisch.

Artbestimmung

Neben zahlreichen Weichkörpermerkmalen werden vor allem Schalenmerkmale und die Kiemenform für die Lösung von systematischen Fragestellungen herangezogen.

Kommerzielle Bedeutung (Beispiele) von Muscheln:

Pteriomorpha

- ◆ Miesmuscheln (z.B. Miesmuschel *Mytilus edulis* - Mytilidae)
- ◆ Seedatteln (z.B. Steindattel *Lithophaga lithophaga* - Mytilidae)
- ◆ Austern (z.B. Tafel-Auster *Ostrea edulis* - Ostreidae)
- ◆ Kammuscheln (z.B. Pilgermuschel *Pecten jacobaeus* - Pectinidae)
- ◆ Archenmuscheln (z.B. Arche Noah *Arca noae* - Arcidae)

Heterodonta

- ◆ Venusmuscheln (z.B. Warzige Venusmuschel *Venus verrucosa* - Veneridae)
- ◆ Herzmuscheln (z.B. Gemeine Herzmuschel *Cerastoderma edule* - Cardiidae)



I.2.2. Die Unterklassen der Bivalvia im Überblick

Für die hier vorliegende Arbeit wird folgende systematische Klassifizierung verwendet, die in der Literatur gegenwärtig am häufigsten zu finden ist (z.B. Campbell 1998, 2000; Salvini-Plawen 1983; Waller 1990, 1998).

UNTERKLASSE PROTOBRANCHIA	Pectinoidea
Ordnung Ctenidobranchia	Pinnoidea
Überfamilie Nuculanoidea	Plicatuloidea
Ordnung Palaeobranchia	Pterioidea
Überfamilie Solemyoidea	Ordnung Heterodonta
UNTERKLASSE AUTOBRANCHIA	Überfamilie Veneroidea
Ordnung Pteriomorpha	Myoidea
Unter-Ordnung Arcina	Ordnung Anomalodesmata
Überfamilie Arcoidea	Überfamilie Pandoroidea
Unter-Ordnung Mytilina	Ordnung Septibranchia
Überfamilie Mytiloidea	Überfamilie Poromyoidea
Unter-Ordnung Pteriina	Cuspidarioidea
Überfamilie Anomioidea	Ordnung Palaeoheterodonta
Limoidea	Überfamilie Trigonioidea
Ostreoidea	Unionoidea

Waller (1978) hat in seiner umfassenden Studie zur Klassifikation der Pteriomorpha die Über-Ordnung Pteriomorpha Beurlen, 1944 [*emend.*] eingeführt, zu der er die Ordnungen Pterioidea Newell, 1965 [*emend.*], Limoida (neue Ordnung) sowie Ostreoida Férussac, 1822 [*emend.*], nicht aber die Ordnungen Mytiloidea Férussac, 1822 [*emend.*] und Arcoidea Stoliczka, 1871 zählte. Im Zuge von späteren Arbeiten änderte Waller dies jedoch (vgl. Waller 1990 und 1998). In der vorliegenden Arbeit wird allerdings die Ordnung Pteriomorpha Beurlen, 1944 auch weiterhin als solche geführt.



I.2.3. Wichtige Merkmale der Großgruppen der Bivalvia (Salvini-Plawen 1983)

Ctenidiobranchia (Protobranchia partim, Palaeotaxodonta)

Kiemen: doppelt blättrig-gefiederte Kiemen (Ctenidien), dienen nur der Atmung (Abb. 4)

Ernährung: mittels großer Mundlappen, welche einen langen, tasterartigen Anhang besitzen

Nuculanoidea

Palaeobranchia (Protobranchia partim, Cryptodonta)

Kiemen: doppel blättrig-gefiederte, blattförmig senkrecht ausgerichtete Kiemen; dienen auch der filtrierenden Ernährung (Abb. 4)

Solemyoidea

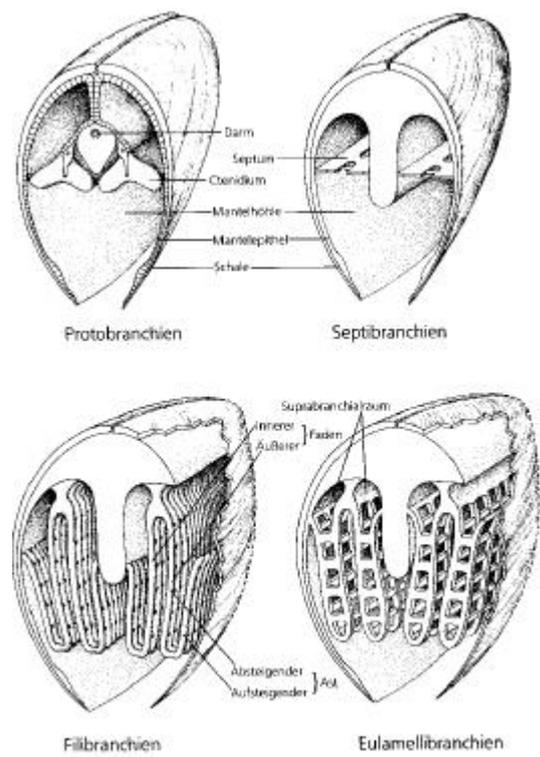
Autobranchia (Lamellibranchia)

Kiemen: sind durch Verlängerung der Achse fadenförmig ausgezogene, dicht angeordnete Seitenfieder, die zu zwei Paar blattförmigen Organen umgebildet sind; dienen auch der filtrierenden Ernährung

Andere Merkmale: Mundlappen klein; primär Formen des oberen Litorals; Larven mit Exkretionsorganen

Abb. 4: Kiemen-Typen bei den Bivalvia (Mollusca).
Aus Westheide & Rieger (1996, p. 322)

- ◆ Ctenidiobranchia
 - doppelfiedrige Kiemen
 - protobranch
- ◆ Septibranchia
 - einfaches, durchbrochenes Querseptum
 - septibranch
- ◆ Pteriomorpha
 - fädig ausgezogene Kiemen
 - filibranch
- ◆ Heterodonta
 - netzartige Blattkiemen
 - eulamellibranch



Pteriomorpha (Filibranchia i.w.S.) – Abb. 4

Kiemen: Kiemenfäden sind untereinander nur durch Wimpern lose miteinander verbunden (wenige Gewebebrücken) und einfach-einschenkelig oder umgebogen-zweischenkelig bzw. gefaltet und ungleichartig ausgebildet

Andere Merkmale: ohne Siphonen; mit Osphradien und Abdominal-Sinnesorganen; meist mit Byssus und epibenthisch lebend



Mytilina

Mytiloidea (Isofilibranchia)

Schale: gleichklappig und nach vorne verjüngt, innere Schalenschicht perlmuttrig

Schloßrand: meist zahnlos (dysodont) – Abb. 5

Schließmuskel: vorderer Schließmuskel kleiner bis fehlend

Fuß: fingerförmig

Kiemenfäden: einfach (filibranch)

Zementation: mit mehrfädigem Byssus angeheftet und/oder in Kalkstein ätzend

Arcina

Arcoidea (Eu- oder Neotaxodonta, Pseudoctenodonta)

Schale: meist gleichklappig, innere Schalenschicht ohne Perlmutter

Schloßrand: zahlreiche, kammartig zueinander parallel reihig angeordnete Zähne (taxodont) – Abb. 5

Schließmuskel: zumeist wenig verschieden voneinander

Kiemenfäden: einfach

Zementation: Byssus einfach oder fehlend

Pteriina (Pseudolamellibranchia i.w.S., Anisomyaria partim, Leptodonta partim)

Schale: verschieden-gestaltig, teils ungleichklappig (inaequivalve); innere Schalenschicht ohne oder mit Perlmutter

Schloßrand: meist zahnlos (Abb. 5)

Schließmuskel: vorderer Schließmuskel in Rückbildung oder fehlend

Kiemenfäden: einfach oder gefaltet/ungleichartig

Zementation: meist mit Byssus oder durch Kalkabscheidung festsitzend

Anomioidea, Limoidea, Ostreoidea, Pectinoidea,

Pinnoidea, Plicatuloidea, Pterioidea

Heterodonta (Eulamellibranchia partim) – Abb. 4

Schloßrand: zahnarm mit wenigen, wechselständigen Haupt- und Seitenzähnen (heterodont) oder zahnlos (Abb. 5)

Schließmuskel: meist gleichstark ausgebildet

Kiemen: Kiemenfäden sind zwisehenkelig und zu beiderseits zwei durchbrochenen netzartigen Blattkiemen verwachsen

Andere Merkmale: oft mit äußerem Ligament und mit Siphonen

Veneroidea (Heterodonta i.e.S.)

Schale: gut ausgebildet und gleichklappig



Schloßrand: typisch heterodont mit meist vorderen und hinteren Seitenzähnen (Abb. 5)

Andere Merkmale: vielfach mit Byssus, Siphonen meist frei

Myoidea (Adapedonta)

Schale: dünnwandig mit schwach entwickelter bis fehlender Schloßplatte; keine Perlmutter-schicht

Andere Merkmale: Siphonen vereinigt, meist mit gemeinsamer Bedeckung; grabende und bohrende Tiere

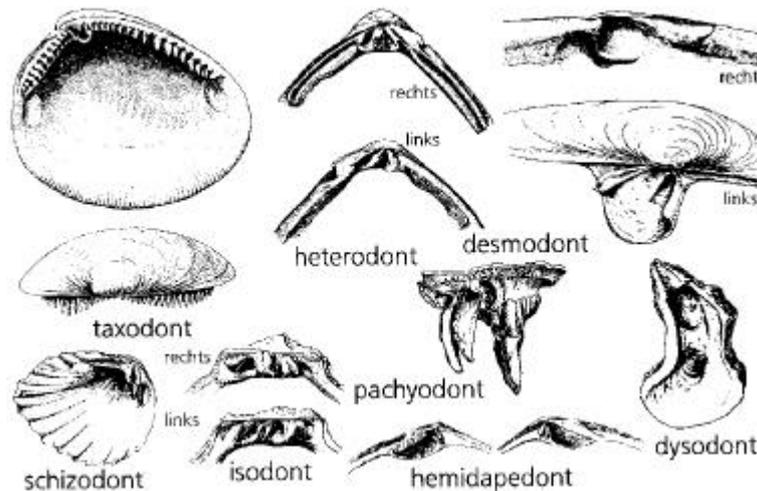


Abb. 5: Beschriebene Scharniertypen (Schloßränder) bei den Bivalvia (Mollusca). Aus Westheide & Rieger (1996, p. 321).

Anomalodesmata (Eulamellibranchia partim) – Abb. 4

Kiemen: netzartige Blattkiemen (eulamellibranch), die selten durch ihre septumartige seitliche Anheftungsmembran ersetzt sind (pseudo-septibranch)

Schale: zumeist ungleichklappig und dünn; meist mit innerer Perlmutter-schicht *Schloßrand*: zahnarm bis zahnlos (Abb. 5)

Schließmuskel: annähernd gleich groß

Andere Merkmale: Ligament meist mit innerem Knorpel (Resilium), der einen leistenartigen Schalenfortsatz (Lithodesma) enthält; mit Siphonen und Mantelbucht; teils mit Byssus

Pandoroidea

Septibranchia (Verwachsenkiemer) – Abb. 4

Kiemen: ohne echte Kiemen

Schale: gleichklappig; mit oder ohne Perlmutter

Schloßrand: zahnarm oder zahnlos (Abb. 5)

Andere Merkmale: Mantelraum ist mit einem cerebral (!) innervierten, horizontal durchlöcherten Septum versehen, welches durch Pumpbewegungen die Nahrung einbringt; mit zumeist kurzen Siphonen; Carnivoren

Poromyoidea



Cuspidarioidea

Palaeoheterodonta

Trigonoidea

Unionoidea

I.2.4. Die Großgruppen der Pteriomorpha im Überblick

Die Nomenklatur sowie der taxonomische Rang wie auch die exakte Zusammensetzung von manchen Gruppen der Pteriomorpha variieren in der Literatur. Für die Bivalvia im Allgemeinen und die Pteriomorpha im Speziellen ist es oftmals sehr schwierig, das traditionelle Konzept der systematischen Klassifikation von Ordnung (-ida) – Unterordnung (-ina) – Überfamilie²⁾ (-oidea) Familie (-idae) – Gattung – Art festzulegen. Für die vorliegende Arbeit wurde versucht, die systematische Klassifikation möglichst genau zu standardisieren, um spätere Vergleiche mit den Daten aus der vorhandenen Literatur zu erleichtern.

- ◆ Arcoidea
 - Arcidae
 - Glycymerididae
 - Neotiidae
- ◆ Mytiloidea
 - Modiolinae
 - Mytilinae
 - Crenellinae
 - Lithophaginae
 - Bathymodiolinae
- ◆ Anomioidea
 - Anomiidae
 - Dimyidae
- ◆ Ostreoidea
 - Gryphaeidae
 - Ostreidae
- ◆ Pectinoidea
 - Pectinidae
 - Spondylidae
- ◆ Pinnoidea
 - Pinnidae
- ◆ Plicatuloidea
 - Plicatulidae
- ◆ Pterioidea
 - Isognomonidae
 - Malleidae
 - Pteriidae
- ◆ Limoidea
 - Limidae

²⁾ Statt dem Begriff „Überfamilie“ wird auch die Bezeichnung „Familiengruppe“ verwendet (siehe Kapitel II.1.).



I.3. Phylogenie der Pteriomorpha

I.3.1. Glossar für die phylogenetische Methode

Art

- ◆ Reale, überindividuelle Einheit in der Natur. Eine Art umfaßt alle Individuen, die zusammen einen Genpool bilden und die von anderen Arten reproduktiv isoliert sind. Arten entstehen in der Regel durch Artspaltungsprozesse; sie erlöschen entweder durch weitere Artspaltungsprozesse oder durch Aussterben.

Stammart

- ◆ Art, die sich durch Speziation (Artspaltung) in zwei Folgearten auflöst (= Schwesternarten) und damit aufhört zu existieren. Aus den Folgearten können durch Spaltungen weitere Arten hervorgehen. Die Stammart kann aber auch - mehr oder weniger identisch - weiterhin bestehen, sodaß aus einer isolierten Population eine zweite Art entsteht.

Außengruppe

- ◆ Umfaßt alle rezenten und fossilen Taxa außerhalb der betrachteten Gruppe.

Anagenese

- ◆ Transformation von Merkmalseigenschaften in Evolutionslinien. Im Gegensatz zur Cladogenese, die den Prozeß der Entstehung neuer Merkmalseigenschaften oder neuer Merkmale in der Folge von Artspaltung bezeichnet.

Homologie

- ◆ Übereinstimmung in Merkmalen bei unterschiedlichen Taxa, die nicht zufällig ist, sondern sich auf die genetische Information in einer gemeinsamen Stammart zurückführen läßt.

Radiation (adaptive)

- ◆ Vielfache Abwandlung eines Grundmusters durch relativ schnell aufeinander folgende Artspaltungen und Anpassungen an verschiedene Nischen.

Schwesterngruppe (Adelphotaxon)

- ◆ Zwei Taxa, die eine nur ihnen gemeinsame Stammart besitzen, sind Schwestergruppen.

Taxon, pl. Taxa

- ◆ Gruppe von Organismen von beliebiger Größe und Rang, die sich von anderen Gruppen unterscheiden läßt und die eine auf Verwandtschaft beruhende Einheit und damit ein Element im System der Natur bilden. Jedes Taxon ist ein Monophylum.

Apomorphie

- ◆ Abgeleitetes Merkmal (oder Merkmalsausprägung), d.h. evolutiv neue Eigenschaft oder Struktur, ein Spezialhomologon einer Gruppe bzw. Art, oder ein sekundär fehlendes Merkmal.

Autapomorphie

- ◆ Abgeleitetes Merkmal, das auf ein Taxon bzw. eine Gruppe beschränkt ist. Monophyla werden durch mindestens eine Autapomorphie begründet.

Synapomorphie

- ◆ Abgeleitetes, homologes Merkmal, das nur in den Teilgruppen eines Monophylums auftritt. Einzeltaxa sind durch Synapomorphien einem Monophylum zugehörig. Diese Einzeltaxa werden als Schwestergruppen (Adelphotaxa) bezeichnet.



Plesiomorphie

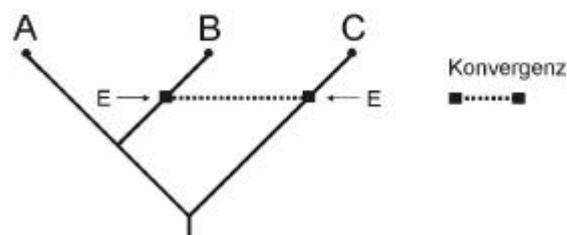
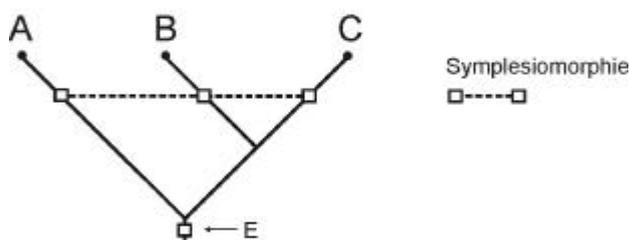
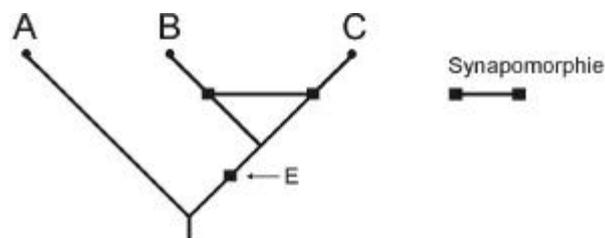
- ◆ Ursprüngliches Merkmal (oder Merkmalsausprägung), d.h. evolutiv alte Eigenschaft oder Struktur, das nicht auf ein Taxon bzw. eine Gruppe beschränkt ist. Ein homologes Merkmal, das schon längst existiert.

Symplesiomorphie

- ◆ Ursprüngliches Merkmal, das auch außerhalb eines Monophylums auftritt. Es kann nicht zur Phylogenieforschung herangezogen werden, da es alle Taxa der untersuchten Gruppe besitzen.

Konvergenz

- ◆ Übereinstimmung in Merkmalen bei unterschiedlichen Taxa, die sich nicht auf die genetische Information in einer gemeinsamen Stammart zurückführen lassen, d.h. die unabhängig voneinander entstanden sind.



E = Merkmalsentstehung



Monophylie

- ◆ In einer monophyletischen Gruppe sind alle Nachfahren einer gemeinsamen Stammart enthalten. Die darin enthaltenen Teilgruppen sind durch *synapomorphe* Merkmale gegenüber den anderen Gruppen abgegrenzt.

Paraphylie

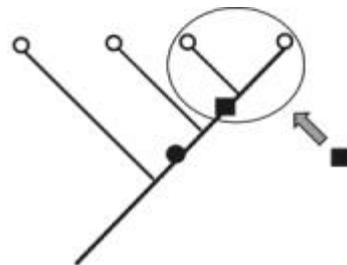
- ◆ Paraphylie liegt vor, wenn eine Gruppe gebildet wurde, die gleiches organisatorisches Niveau und *symplesiomorphe* Merkmale besitzt. Eine paraphyletische Stadiengruppe enthält nicht alle Nachfahren einer Stammart.

Polyphylie

- ◆ Polyphyletische Gruppen sind nicht durch homologe, synapomorphe, sondern durch *konvergente* Merkmale gekennzeichnet. Die Gruppierung erfolgt nicht nach den Regeln der phylogenetischen Methode und spiegelt daher nicht die Verwandtschaftsverhältnisse wieder.

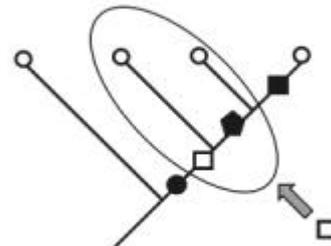
Monophylie

Alle Nachkommen einer Ausgangsgruppe.



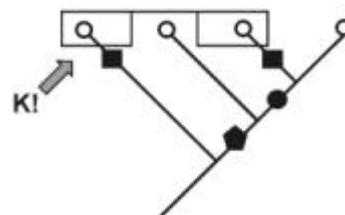
Paraphylie

Enthält nicht alle Gruppen eines gemeinsame Vorfahrens.



Polyphylie

Das gemeinsame Merkmal ist konvergent, d.h. unabhängig voneinander zweimal entstanden.





I.3.2. Molekulare Phylogenien der Pteriomorpha

Der Ursprung der Bivalvia scheint auf spezielle Formen der Monoplacophora zurückzugehen (Carter et al. 2000), aber deren weitere Differenzierung der Unterklassen und Ordnungen ist nach wie vor nicht zur Gänze geklärt. Runnegar & Pojeta (1974) postulierten, daß aus der aus dem Kambrium bekannten Bivalve *Fordilla troyensis* zuerst die Palaeoheterodonta und in weiterer Folge die Pteriomorpha hervorgegangen sind. Die Entwicklung von filibranchen Kiemen war gegen Ende des Kambriums ein Meilenstein in der Evolution der Autolamellibranchia (Autobranchia), da nun das vorhandene Nahrungsangebot der ordovizischen Ozeane, u.a. von den Pteriomorpha, besser genutzt werden konnte (Cope 2000).

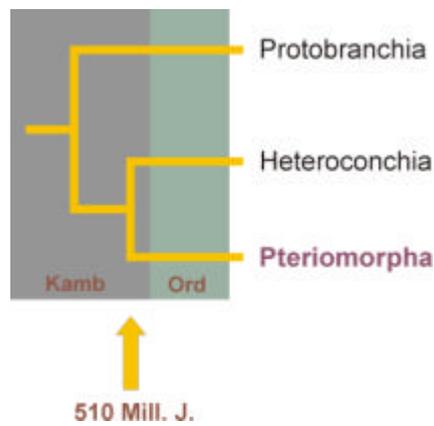


Abb. 6: Radiation der Bivalvia im Kambrium. Vereinfacht nach Waller (1998). Kamb Kambrium (580-510 Mill. J.); Ord Ordovizium (510-445 Mill. J.). Ungefähre Dauer der Perioden Kambrium und Ordovizium nach Cox & Moore (1987).

Die fossilen Befunde zeigen weiters, daß die Pteriomorpha im frühen Ordovizium, d.h. vor ca. 510 Millionen Jahren, zum ersten Mal in Erscheinung traten, nachdem sie sich von den Heteroconchia³⁾ abgespalten hatten (Abb. 6). Die ältesten Pteriomorpha dürften mytiloide, arcoide und pterioide Formen gewesen sein, die weitere Radiationen im späten Devon sowie in der Trias und im Paläozän durchliefen (Carter 1990) (Tab. 1 und Abb. 7).

Die phylogenetische Analyse von Salvini-Plawen & Steiner (1996) beruhend auf 42 morphologischen Merkmalen ergab eine monophyletische Situation für die Palaeotaxodonta, und die Pteriomorpha bilden eine Schwestergruppe zu den Trigonioidea (Palaeoheterodonta), welche an der Basis der Autolamellibranchia steht. Die Re-Analyse dieses Datensatzes durch Carter et al. (2000) ergab folgendes Bild: Die Palaeotaxodonta sind paraphyletisch, bilden aber ebenfalls eine basale Schwestergruppe zu den Autolamellibranchia. Die Tetratomie innerhalb der Autolamellibranchia in Salvini-Plawen & Steiner (1996) wurde aufgelöst, und die Septibranchia stehen an der Basis der Autolamellibranchia.

³⁾ Cope 2000: Heteroconchia = Heterodonta plus Palaeoheterodonta (ohne Trigonioidea); Waller (1998): die Anomalodesmata werden miteinbezogen; Campbell (2000): Trigonioidea werden miteinbezogen.

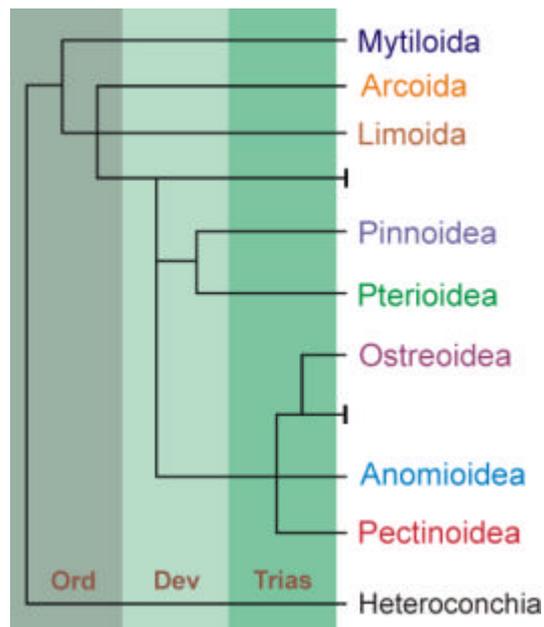


Abb. 7: Die Radiationen der Autobranchia im Ordovizium (510-445 Mill. J.), Devon (405-345 Mill. J.) und in der Trias (225-190 Mill. J.) unter besonderer Berücksichtigung der Pteriomorpha. Ausgestorbene Linien enden mit einem Querbalken. Ord Ordovizium; Dev Devon; Modifiziert nach Waller (1998). Ungefähre Dauer der Perioden Ordovizium, Devon, Trias sowie der Periode Paläozän nach Cox & Moore (1987).

Zeitalter	Periode	Epoche	Ungefähre Dauer in Mill. Jahren	Ungefährer Beginn vor Mill. Jahren
Känozoikum	Quartär	Pleistozän	1,6	1,6
		Pliozän	3,4	5
	Tertiär	Miozän	17,5	22,5
		Oligozän	14,5	37
		Eozän	17	54
		Paläozän*	11	65
Mesozoikum	Kreide		70	135
	Jura		55	190
	Trias*		35	225
Paläozoikum	Perm		55	280
	Karbon	Oberkarbon	45	325
		Unterkarbon	20	345
	Devon*		60	405
	Silur		40	445
	Ordovizium*		65	510
	Kambrium		70	580
Eozoikum			500	1080
Auftreten der ersten Eukaryonten vor ungefähr 1500 Mill. Jahren				
Bildung der Erdkruste vor ungefähr 4600 Mill. Jahren				

Tabelle 1: Die erdgeschichtlichen Zeitalter nach Cox & Moore (1987). Mit * sind jene Perioden bzw. Epochen bezeichnet, in denen Radiationen der Pteriomorpha stattgefunden haben (vgl. auch Abb. 7).



Das Potential für phylogenetische Studien, das molekularen Merkmalen innewohnt, ergibt sich u.a. aus der Tatsache, daß Nukleotidsequenzen eine große Anzahl von Merkmalen bereitstellen. Meist sind die ermittelten DNA⁴⁾-Sequenzen hunderte, wenn nicht sogar tausende von Basenpaaren (bp) lang. Daraus ergeben sich Datensätze, die unabhängig von morphologischen Daten sind und gänzlich anderen Selektionskriterien unterliegen: DNA-Sequenzen, vor allem jene von ribosomalen Genen, unterliegen einem niedrigeren Selektionsdruck bezüglich Habitat und Lebensweise als phänotypische Merkmale. Diese Vorteile sind vor allem bei den Bivalvia von Bedeutung, da hier die Homologieentscheidungen für zahlreiche morphologische Merkmale durch konvergente und/oder parallele Evolution deutlich erschwert werden. Die Sequenzen der kern-codierten kleinen, wie auch der großen ribosomalen Untereinheit (18S bzw. 28S rDNA) werden immer häufiger herangezogen, um inter- und intraspezifische Beziehungen von Phyla zu untersuchen (z.B. Riutort et al. 1993; Philippe et al. 1994; Winnepenninckx et al. 1994, 1995; Mackey et al. 1996; Aguinaldo et al. 1997). Die Hauptgründe für die Beliebtheit z.B. des 18S rDNA-Gens und dessen Vorteile werden in Winnepenninckx et al. (1994) diskutiert, und umfassen u.a. die wechselnde Abfolge von variablen und hoch konservierten Regionen auf diesem DNA-Abschnitt. Weiters ist es mittlerweile methodisch einfach, diese Gene zu vervielfältigen sowie deren Basenabfolge zu ermitteln. Die Analysen zeigen weiters, daß das phylogenetische Signal der 18S und 28S rDNA verschiedene systematische Ebenen abdecken kann.

Die ersten 18S rDNA-Sequenzen von Bivalven wurden für Untersuchungen der Beziehungen der Mollusca zu anderen Phyla sowie für die Aufklärung von inter- und intrafamiliären Verhältnissen bei den Klassen der Mollusken herangezogen (Field et al. 1988, Winnepenninckx et al. 1994, 1996). Studien der Phylogenie von Bivalven beruhend auf 18S rDNA-Sequenzen wurden erstmals von Littlewood et al. (1991), Rice et al. (1993) und Kenchington et al. (1994, 1995) durchgeführt, wobei die Familien Ostreidae, Mactridae, Pectinidae und Mytilidae im Mittelpunkt des Interesses standen. Weitere vollständige 18S rDNA-Sequenzen wurden von Steiner & Müller (1996), Frischer et al. (1998), Maruyama et al. (1998), Canapa et al. (1999), Campbell (2000), Distel (2000) und Distel et al. (2000) ermittelt und einer phylogenetischen Analyse zugeführt. Adamkewicz et al. (1997) und Campbell et al. (1998) hingegen stützten ihre Analysen hauptsächlich auf partielle 18S rDNA-Sequenzen.

Bei phylogenetischen Analysen beruhend auf 28S rDNA-Sequenzen standen bislang nur die Familien Gryphaeidae, Ostreinae, Lophinae und Crassostreinae der Ostreoidea (Littlewood 1994; Ó Foighil & Taylor 2000) sowie einige Familien der veneriden Heterodonta (Park & Ó Foighil 2000) im Mittelpunkt des Interesses.

Die Monophylie der Bivalvia wurde nur in der Arbeit von Frischer et al. (1998) und - mittels einer Re-Analyse der Ergebnisse von Steiner & Müller (1996) - durch Giribet & Carranza (1999), sowie Steiner (1999) unterstützt. Die übrigen Untersuchungen zeigten eine Situation, wo Gastropoda oder Polyplacophora zwischen den Pteriomorpha und Heteroconchia positioniert sind. Eine mögliche Erklärung für diese eher unkonventionelle Topologie könnten die höheren Substitutions-raten bei den Heterodonta und Gastropoda sein, denn das phylogenetische Signal für die Gruppe („clade“) der

⁴⁾ Die genetische Information von Pro- und Eukaryonten ist in Riesenmolekülen der Desoxyribonukleinsäure (DNS, international DNA – Desoxyribonucleic Acid) gespeichert.



Bivalvia war nahezu gleich stark wie jenes für die anderen großen Clades (Steiner & Müller 1996). Bezüglich der interspezifischen Beziehungen der höheren Taxa der Bivalvia gibt es Unstimmigkeiten innerhalb der molekularen Arbeiten, obwohl die Protobranchia im Allgemeinen an der Basis der Bivalvia stehen. So zeigten Frischer et al. (1998) mit einem reduzierten Datensatz, daß die Pteriomorpha eine Schwesterngruppe zu den Heterodonta bilden, weiters fanden Adamkewicz et al. (1997) und Campbell et al. (1998) eine paraphyletische Situation für die Pteriomorpha. Im ersten Fall bilden sowohl die Heterodonta wie auch die Palaeoheterodonta zusammen mit den Pteriomorpha eine polyphyletische Gruppe, und innerhalb der Pteriomorpha nehmen die Ostreoidea, Pinnoidea und Pterioidea eine basale Position ein. Die Pectinoidea sind die Schwesterngruppe zu den Heteroconchia und die Anomalodesmata bilden zusammen mit den Protobranchia eine basale Polytomie (Abb. 8). Im Gegensatz dazu findet sich bei Campbell et al. (1998), der andere Taxa analysiert hat, daß die Pectinoidea den ersten Ast der Gruppe der Autobranchia, sowie die Pterioidea, Ostreoidea und Heterodonta eine Polytomie bilden. Die Heterodonta sind somit inmitten der Pteriomorpha positioniert. In Campbell (2000), wo diesmal vollständige 18S rDNA-Sequenzen von Bivalvia verwendet wurden, stellen sich die Autobranchia als monophyletische Gruppe dar und innerhalb der Pteriomorpha bilden die Ostreoidea eine Schwesterngruppe zu den Pterioidea.

Hinsichtlich der phylogenetischen Analysen beruhend auf 28S rDNA-Sequenzen wurden in den bisherigen Arbeiten vorwiegend inter- und intrafamiliäre Beziehungen innerhalb einiger Unter-Ordnungen der Bivalvia untersucht. In Littlewood (1994) wurden die Domänen I-III der 28S rDNA von acht Vertretern der Familie Ostreidae sequenziert. Die Analyse ergab u.a., daß das phylogenetische Signal ausreicht, um systematische Beziehungen zwischen Großgruppen bis hin zum Familienniveau auflösen zu können. Park & Ó Foighil (2000) verfolgten den gleichen Ansatz und untersuchten mehrere Familien der Veneroidea (Heterodonta). Mit Hilfe der 28S rDNA-Sequenzen konnten sie feststellen, daß die beiden Über-Familien der Süßwasser-Heterodonta (Dreissenoidea und Corbiculoidea) ihren Ursprung in marinen Vorfahren haben. In der Arbeit von Ó Foighil & Taylor (2000) wurde einerseits die Monophylie der Ostreidae bestätigt und andererseits aber interessante Aspekte über den Fortpflanzungszyklus bzw. das Fortpflanzungsverhalten bei dieser Familie der Pteriomorpha gewonnen.

Ähnlich der oben skizzierten Arbeiten beruhend auf molekularen Daten unterscheiden sich auch jene phylogenetischen Hypothesen voneinander, die basierend auf morphologischen Befunden aufgestellt wurden. Auch in den sechs vorgeschlagenen Phylogenien der Bivalvia beruhend auf morphologischen Merkmalen (Abb. 8) ist eine deutliche Variation bezüglich der Position der Pteriomorpha sowie deren Schwesterngruppenverhältnisse erkennbar. Die Pteriomorpha scheinen bei Cope (1996) und Waller (1998) monophyletischen Ursprungs zu sein; die Phylogenie von Morton (1996) ergibt eine vergleichbare Situation, obwohl in diesem Fall die Unionida innerhalb der Pteriomorpha positioniert sind. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse bei Carter (1990) und Starobogatov (1992). Hier ergibt sich für die Pteriomorpha eine polyphyletische Situation, wobei bei Carter (1990) die Mytiloidea einen getrennten Ursprung im Vergleich zu den übrigen Pteriomorpha haben. Bei Starobogatov (1992) sind sowohl die Unionida als auch Heterodonta innerhalb der Pteriomorpha positioniert und spalten diese so in zwei



Gruppen. Bei Salvini-Plawen & Steiner (1996) bilden die Pteriomorpha eine Schwestergruppe zu den Trigonioidea (Palaeoheterodonta) und stehen an der Basis der monophyletischen Autolamellibranchia.

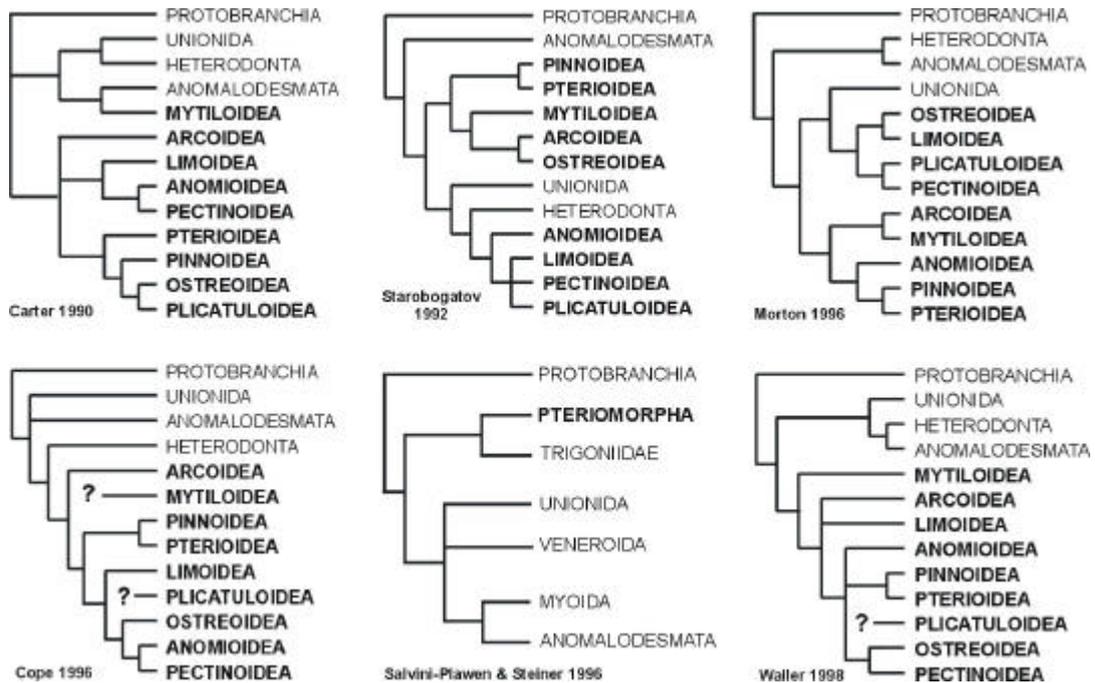


Abb. 8: Sechs Hypothesen zur Phylogenie der Pteriomorpha beruhend auf morphologischen Merkmalen aus Steiner & Hammer (2000) bzw. vgl. auch Adamkewicz et al. (1997).



I.3.3. Verwendete molekulare Marker: 18S und 28S rDNA

Ribosomale Gene spielen bei der Expression von proteinkodierenden Genen bzw. bei der anschließenden Proteinbiosynthese in jedem Organismus eine entscheidene Rolle. Jene Organellen in der Zelle, an welchen die Übersetzung der zuvor im Zellkern transkribierten messenger-RNA (mRNA = Boten-RNA) stattfindet, werden als Ribosomen bezeichnet. Diese sind entweder mit der äußeren Membran des rauhen Endoplasmatischen Reticulums (ER) assoziiert oder frei im Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Ribosomen sind komplex aufgebaute Strukturen, die aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten bestehen, an deren Aufbau sowohl Proteine wie auch ribosomale RNA⁵⁾ beteiligt sind (Abb. 9): Die große 60S⁶⁾ Untereinheit wird von drei rRNAs (28S, 5.8S und 5S), sowie insgesamt 49 Proteinen gebildet, wohingegen die kleine 40S Untereinheit aus nur einer rRNA (18S) und 33 Proteinen aufgebaut ist.

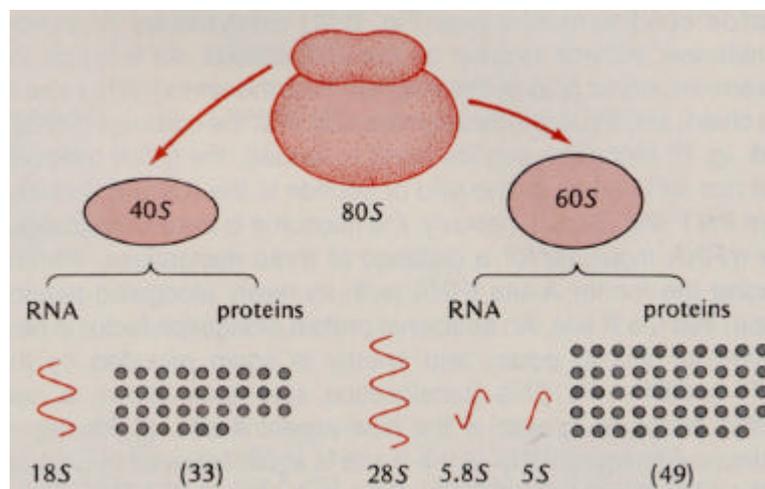


Abb. 9: Organisation und Struktur der Ribosomen von Eukaryonten aus Strickberger (1985, p. 560).

Jene Gene, die für die verschiedenen ribosomalen RNAs kodieren, sind auf den Chromosomen im Zellkern lokalisiert, man spricht auch von nukleären oder kernkodierten Genen im Gegensatz zu jenen Genen, die z.B. auf dem mitochondrialen Genom lokalisiert sind. Jene DNA-Abschnitte, die als Vorlage für die ribosomalen RNAs dienen, werden korrespondierend mit dem jeweiligen Genprodukt (= rRNA) als 18S-, 5S-, 5.8S- und 28S-rDNA bezeichnet. Die Gene für die 18S-, 5.8S- und 28S-rRNAs bilden einen sogenannten „Gen-Cluster“, der in mehrfachen Kopien vorliegt, welche wiederholt nacheinander angeordnet sind (Abb. 10). Man bezeichnet diese Abfolge von Genen auch als „Tandem Repeats“, da sich eine gleichbleibende Reihenfolge von Genen mehrmals wiederholt. Die ribosomalen Gene selbst zählen zu der Klasse der sogenannten „multi copy Gene“, da jedes ribosomale Gen in mehrfacher Kopie im Genom vorliegt. Sie werden von der DNA-abhängigen RNA Polymerase I transkribiert, und die so entstandenen Primärtranskripte müssen im Anschluß daran noch einen spezifischen Umwandlungsprozeß durchlaufen, um ihre eigentliche Funktionalität als rRNAs zu erhalten (Abb. 10).

⁵⁾ Ribonukleinsäure (RNS, international RNA – Ribonucleic Acid)

⁶⁾ Die S-Zahl – Svedberg-Einheiten – gibt d. Sedimentationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von d. Zentrifugalbeschleunigung an.



Hierzu zählt zum Einen das Spleißen, wobei die ETS- und ITS-Regionen entfernt werden, und zum Anderen die komplexen Faltungsvorgänge der RNA-Stränge. Letztere führen zu jenen Sekundärstrukturen der verschiedenen rRNAs (Abb. 11 und 12), die - zusammen mit den ribosomalen Proteinen - für den funktionellen dreidimensionalen Aufbau eines Ribosoms verantwortlich sind.

Die ETS- und ITS-Regionen enthalten zwar nicht-codierende DNA, sind aber für die Funktionalität der rRNA-Gene bzw. für deren Expression sicher von Bedeutung. In Arbeiten der jüngeren Vergangenheit wurden diese DNA-Abschnitte für populationsgenetische Untersuchungen von z.B. Süßwassermuscheln (King et al. 1999) oder auch Milben (Navajas et al. 1998) herangezogen.

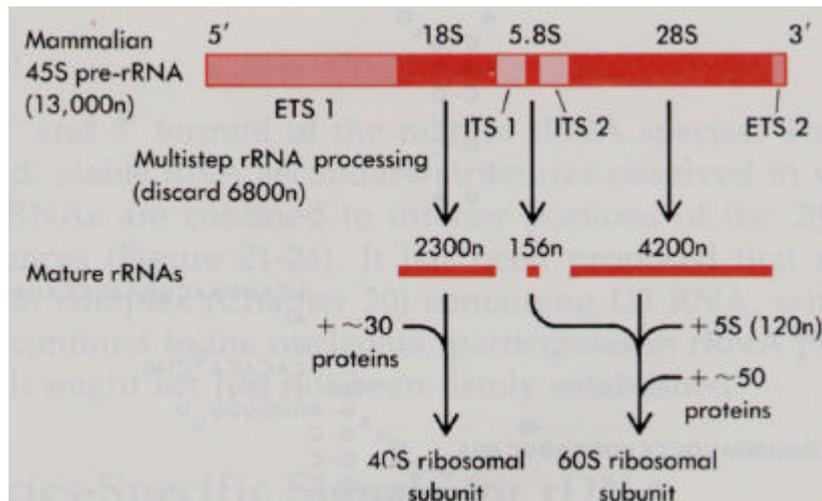


Abb. 10: Organisation des ribosomalen Gen-Clusters auf der genomischen DNA von Eukaryonten (hier: Mammalia) aus Watson et al. (1987, p. 699). Nähere Erläuterungen siehe Text. ITS-1, ITS-2 „internal transcribed spacer regions“; ETS-1, ETS-2 „external transcribed spacer regions“; n Nucleotide

Sekundärstruktur der 18S und 28S rRNA

In den beiden nachstehenden Abbildungen ist zum Einen die Sekundärstruktur der 18S rRNA des Plattwurmes, *Calicophoron calicophoron* (Plathelminthes), als exemplarisches Beispiel für die kleine ribosomale Untereinheit⁷⁾ der Metazoa dargestellt (Van de Peer et al. 2000; Wuyts et al. 2000) (Abb. 11). Sie wurde folgender Datenbank entnommen: <http://rrna.uia.ac.be>. Weiters ist die Sekundärstruktur der 28S rRNA des Hefepilzes, *Saccharomyces cerevisiae*, als Beispiel für die 28S rRNA von Eukaryonten abgebildet (De Rijk 1995; Wuyts et al. 2001) (Abb. 12). Sie ist unter der Internet-adresse <http://uiam3.uia.ac.be/~peter/doctoraat/index.html> zu finden.

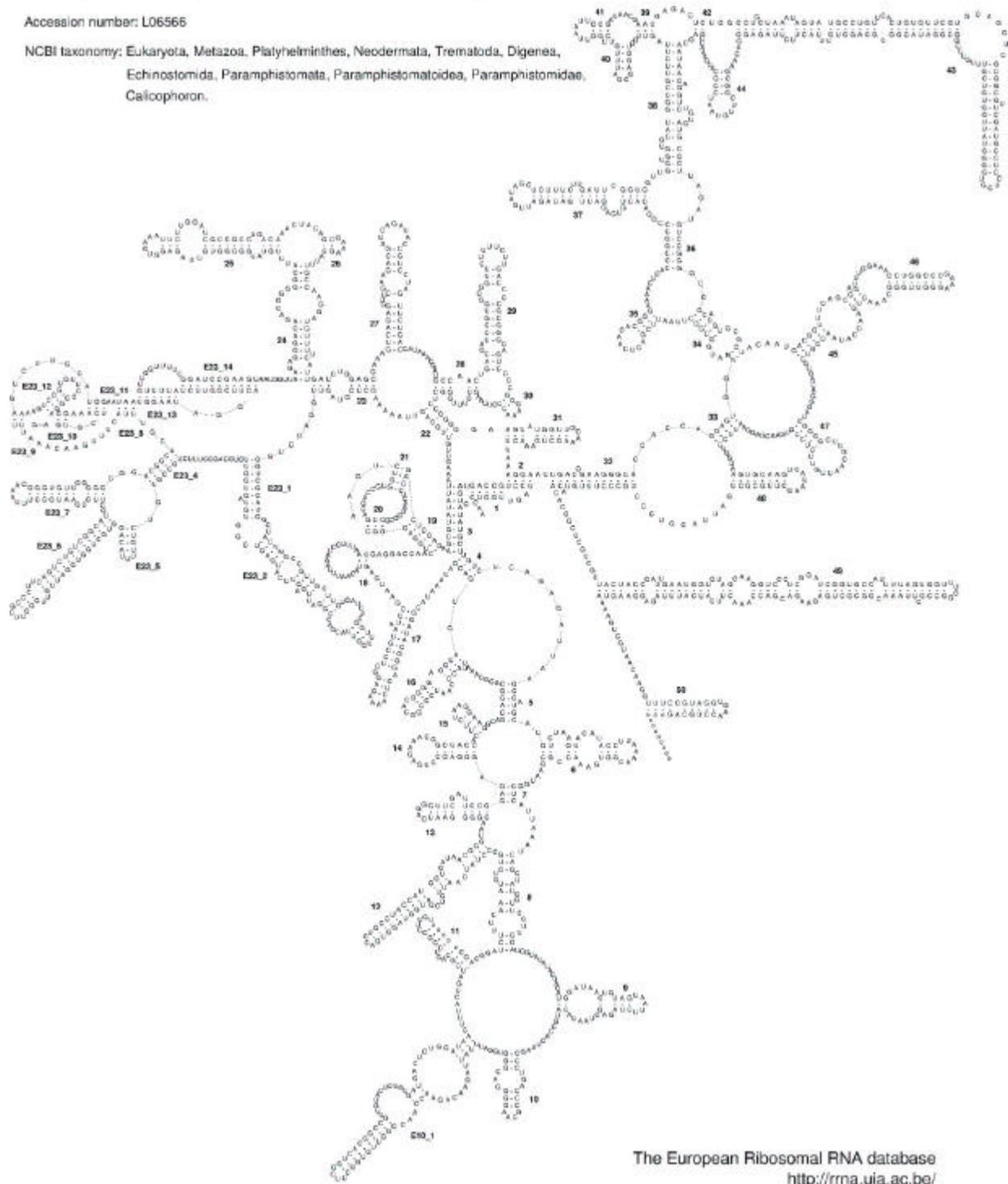
⁷⁾ Die kleine ribosomale Untereinheit (18S rRNA) wird im englischen Sprachgebrauch als SSU rRNA (= small subunit ribosomal RNA) bezeichnet (Abb. 11). Im Vergleich dazu wird die große ribosomale Untereinheit mit LSU rRNA (= large subunit ribosomal RNA) abgekürzt.



Calicophoron calicophorum SSU rRNA secondary structure model

Accession number: L06566

NCBI taxonomy: Eukaryota, Metazoa, Platyhelminthes, Neodermata, Trematoda, Digenea, Echinostomida, Paramphistomata, Paramphistomatoidea, Paramphistomidae, *Calicophoron*.



The European Ribosomal RNA database
<http://rma.uia.ac.be/>

Abb. 11: Sekundärstruktur der 18S rRNA des Plattwurmes *Calicophoron calicophorum* (Plathelminthes).

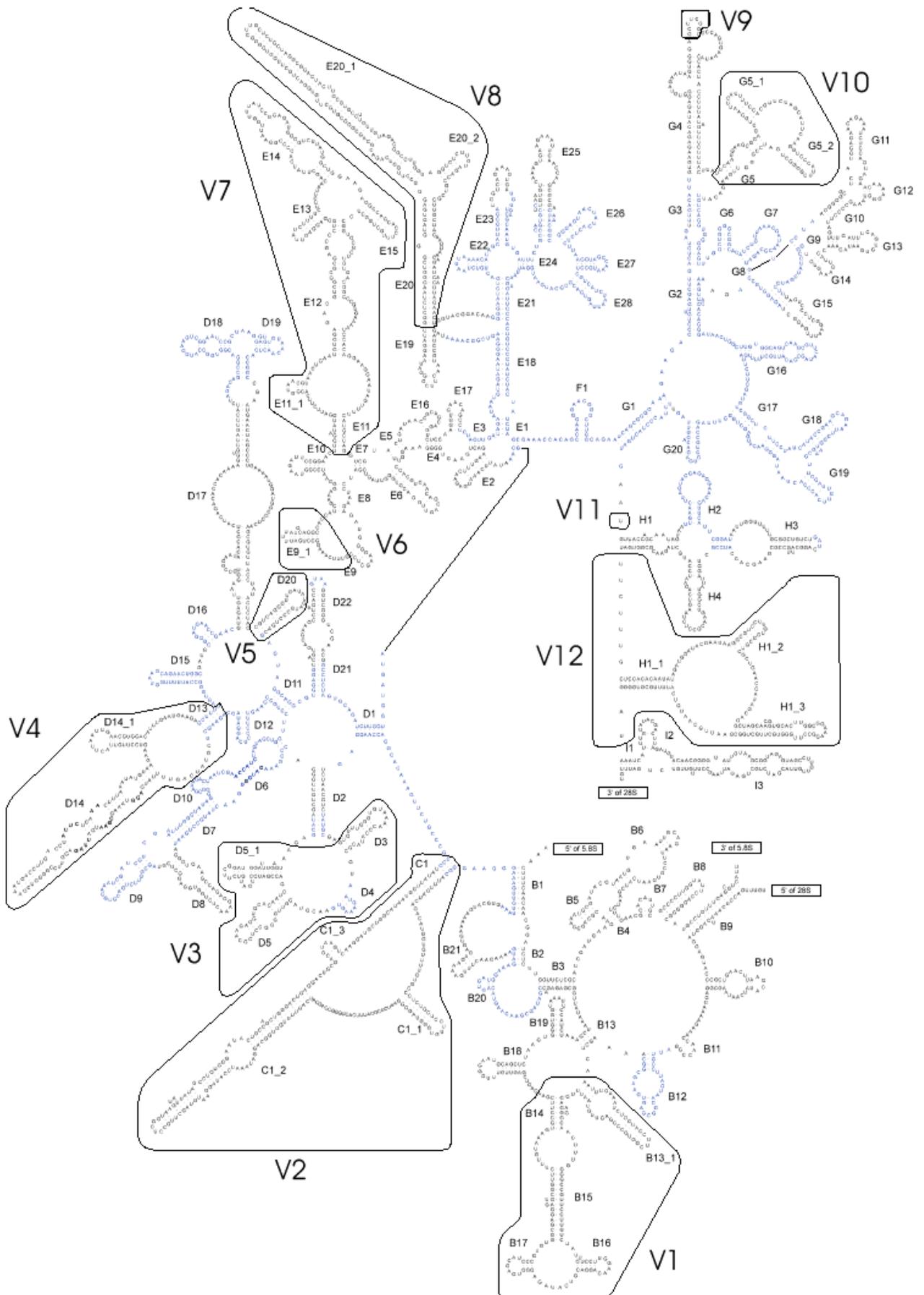


Abb. 12: Sekundärstruktur der 28S rRNA des Hefepilzes, *Saccharomyces cerevisiae*, als exemplarisches Beispiel für die 28S rRNA von Eukaryonten.



I.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Untersuchung ist die Erstellung eines Datensatzes, bestehend aus 18S und 28S rDNA-Sequenzen, der mindestens zwei Vertreter aller wichtigen Großgruppen der Pteriomorpha (Bivalvia, Mollusca) beinhaltet (Abb. 13). Zusätzlich sollen auch die 18S und 28S rDNA-Sequenzen von je einem Vertreter folgender Ordnungen der Bivalvia ermittelt werden: Protobranchia, Heterodonta wie auch Anomalodesmata, da diese als mögliche Schwesterngruppen der Pteriomorpha angenommen werden müssen (Carter 1990; Starobogatov 1992; Morton 1996; Cope 1996; Salvini-Plawen & Steiner 1996; Waller 1998).

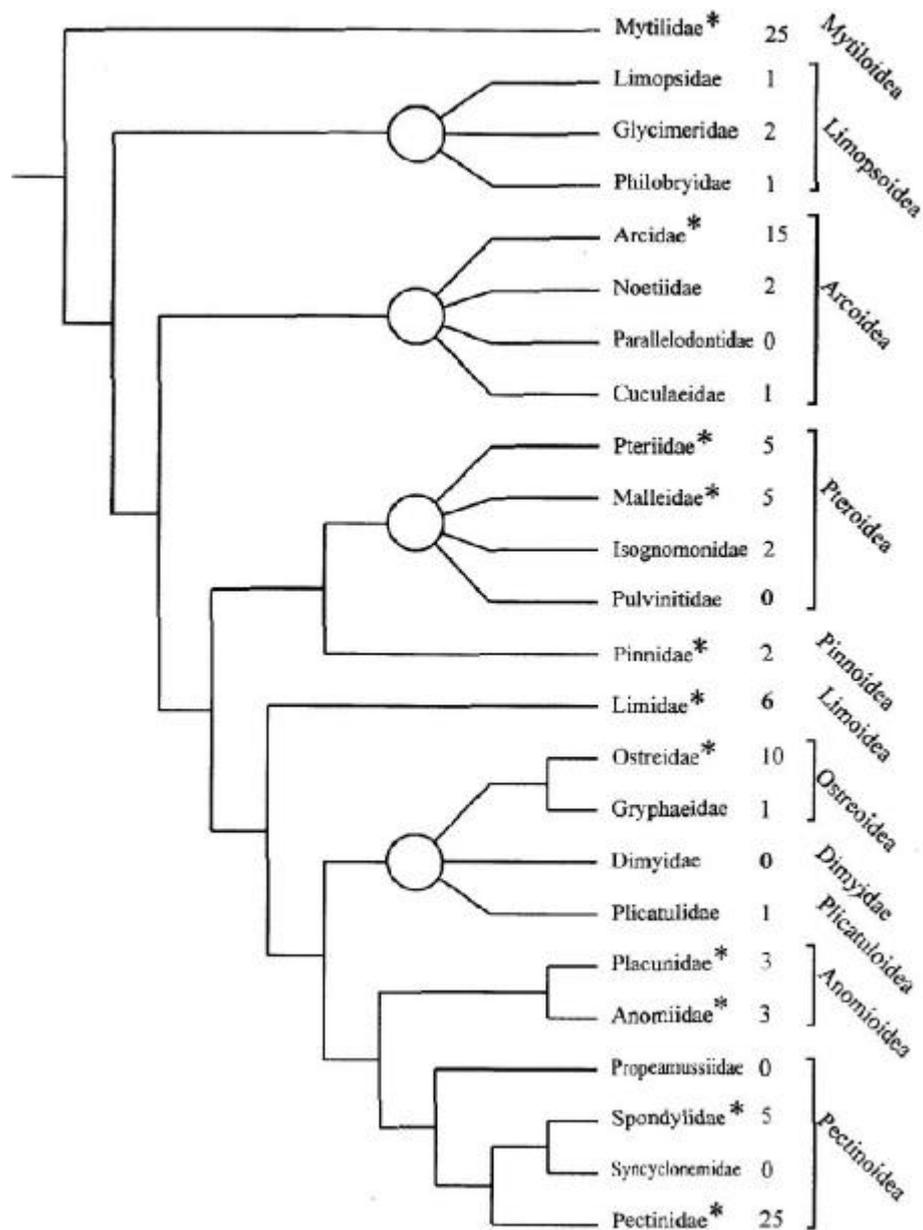


Abb. 13: Cladogramm der Familien und Über-Familien der Pteriomorpha (Bivalvia, Mollusca) vereinfacht nach Waller (1978, 1990) von G. Steiner. Die Ziffern neben den Familien und Über-Familien geben die maximale Anzahl der Arten an, die in den Sammelgebieten Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien) und Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten) zu erwarten sind. Die mit * markieren jene Familien und Über-Familien, die bevorzugt besammelt wurden.



Von der durchgeführten phylogenetischen Rekonstruktion mittels verschiedener baumrekonstruierender Algorithmen (Parsimony, Maximum-Likelihood) wird erhofft, neue Erkenntnisse bezüglich der Schwestergruppenverhältnisse innerhalb der Bivalvia (Mollusca) gewinnen zu können. Weiters sollen von den errechneten Stammbäumen Szenarien hinsichtlich des phylogenetischen Ursprungs der Pteriomorpha abgeleitet werden. Die Beziehungen zwischen und innerhalb der Großgruppen der Pteriomorpha stehen jedoch im Vordergrund der vorliegenden Arbeit. Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- ◆ Haben die Pteriomorpha einen monophyletischen Ursprung?
- ◆ Welche Position nehmen die Heteroconchia ein?
- ◆ Wie sehen die phylogenetischen Beziehungen innerhalb und zwischen den Großgruppen der Pteriomorpha aus?
- ◆ Gibt es eine Kongruenz der molekularen Daten (18S und 28S rDNA)?

Ausgehend von den ermittelten Phylogenien und Gruppierungen innerhalb der Stammbäume sollen die verwendeten molekularen Markersysteme (18S und 28S rDNA) auf ihre Eignung für die Beantwortung von phylogenetischen Fragestellungen überprüft werden. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Frage, für welchen Zeitrahmen (erdgeschichtliche Periode) eine bestimmte Nukleotidsequenz ein verlässliches phylogenetisches Signal liefert. Es soll weiters das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen im Hinblick auf das Auftreten von nicht aufgelösten Polytomien diskutiert werden sowie das Ausmaß und der Einfluß der Absättigung der Gene mit Mutationen (Saturierung). Folgende Fragestellungen sollen diskutiert werden:

- ◆ In welchem Ausmaß unterscheiden sich die Evolutionsraten zwischen den verwendeten molekularen Markern und zwischen den erhaltenen Gruppierungen?
- ◆ Ab welchem Zeitpunkt sind die verwendeten molekularen Marker saturiert?
- ◆ Innerhalb welcher Zeitspanne liefern die molekularen Marker verlässliche Phylogenien?
- ◆ Sind die nicht aufgelösten Bereiche der Stammbäume das Resultat von a) Saturierung, b) jungen oder c) raschen Radiationen?

Abschließend sollen die ermittelten Stammbäume auch dazu verwendet werden, um bestimmte morphologische Merkmale darauf zu plotten (vgl. Steiner & Hammer 2000; Malchus in press). Auf diese Weise können die molekularen Phylogenien mit den Topologien und Gruppierungen der morphologischen Stammbäume verglichen werden. Diese Vorgangsweise soll einerseits gewährleisten, Konvergenzen und mögliche Fälle von Parallelevolution detektieren zu können, sowie andererseits gemeinsame genetische und/oder temporäre Muster von raschen Artbildungsprozessen zu charakterisieren.



II. MATERIAL UND METHODEN



First the lab manager quit, then they ran out of restriction enzymes, and it's just been downhill since then.

II.1. Untersuchte Tiere	36
II.2. Sequenzierung der 18S rDNA	40
II.2.1. DNA-Extraktion mittels Chelex [®] 100 Resin	40
II.2.2. Amplifikation der 18S rDNA mittels PCR	41
II.2.3. Sequenzierung	44
II.3. Sequenzierung der 28S rDNA	45
II.3.1. DNA-Extraktion nach dem CTAB-Protokoll	45
II.3.2. Amplifikation der 28S rDNA mittels PCR	46
II.3.3. Klonierung der 28S rDNA	47
II.4. Phylogenetische Analyse	51
II.4.1. Verwendete Programme und Parameter	51
II.4.2. Verwendete Taxa in der phylogenetischen Analyse	53
II.4.2.1. 18S rDNA-Datensatz	53
II.4.2.2. 28S rDNA-Datensatz	56
II.4.2.3. 18S+28S rDNA-Datensatz	57



II.1. Untersuchte Tiere

Insgesamt wurden 33 Vertreter der Ordnung Pteriomorpha, sowie 7 Vertreter aus weiteren Ordnungen der Bivalvia (Heterodonta, Protobranchia und Septibranchia) für diese Arbeit ausgewählt. Zusätzlich wurden 3 Scaphopoda (Mollusca) und ein Vertreter des Stammes Sipuncula (Sipunculida indet.) als weitere Außengruppen in die Untersuchungen einbezogen. Die untersuchten Bivalvia, Scaphopoda und Sipuncula stammten aus folgenden Gebieten (Abb. 14):

- ◆ Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten)
- ◆ Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien)
- ◆ Trondheim Fjord (Atlantik, Norwegen)
- ◆ Ägäisches Meer, Griechenland
- ◆ Charleston (Atlantik, South Carolina, USA)
- ◆ National Museum von Neuseeland – NMNZ (Pazifik, Neuseeland)
- ◆ Taboga Island (Golf von Panama, Panama)

Die Tiere wurden bei Tauchgängen (SCUBA diving) oder durch Dredschen gewonnen, und anschließend entweder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren oder in 96%igem Ethanol konserviert. Nachdem die Proben an das Institut für Zoologie (Universität Wien) gebracht wurden, erfolgte die Artbestimmung durch Dr. Gerhard Steiner. In weiterer Folge wurden die Proben bei -20°C oder in 96%igem Ethanol gelagert.



Abb. 14: Sammelorte der untersuchten Taxa. Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten – *grün*), Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien – *violett*), Trondheim Fjord (Atlantik, Norwegen – *rot*), Ägäisches Meer (Griechenland – *blau*), Charleston (Atlantik, South Carolina, USA – *gelb*), National Museum von Neuseeland – NMNZ (Pazifik, Neuseeland – *schwarz*), Taboga Island (Golf von Panama, Panama – *orange*).



Ordnung	Familiengruppe	N
Pteriomorpha	Anomioidea	3
	Arcoidea	3
	Limoidea	2
	Mytiloidea	4
	Ostreoidea	4
	Pectinoidea	7
	Pinnoidea	2
	Plicatuloidea	1
	Pterioidea	7
Heterodonta		
	Lucinoidea	3
Protobranchia		
	Nuculanoidea	2
	Solemyoidea	1
Septibranchia		
	Cuspidarioidea	1
Klasse	Ordnung	N
Scaphopoda	Denaliida	3
Stamm	Art	
Sipuncula	Sipunculida indet.	1
Insgesamt		44

Tabelle 2: Untersuchte Innengruppen (Pteriomorpha, Bivalvia) und Außengruppen (Heterodonta, Protobranchia, Septibranchia, Scaphopoda, Sipuncula) im Überblick. N Anzahl der untersuchte Arten

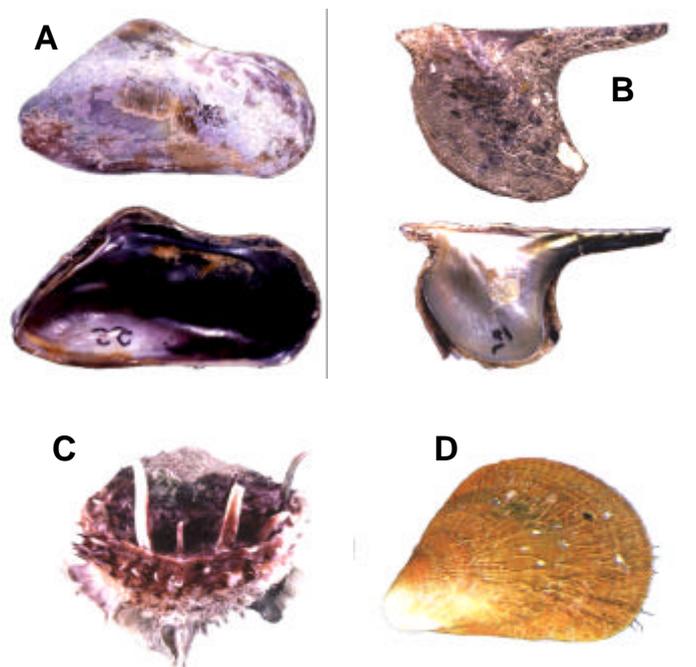


Abbildung 15: Schalen von einigen untersuchten Pteriomorpha (Bivalvia). A *Modiolus auriculatus* (Mytiloidea); B *Pteria macroptera* (Pterioidea); C *Spondylus crassisquamatus* (Pectinoidea); D *Septifer bilocularis* (Mytiloidea)



Gattung	Art	Familie	Familiengruppe	Erstbeschreibung	Sammelort
<i>Acar</i>	<i>plicata</i>	Arcidae	Arcoidea	(Dillwyn, 1817)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Arca</i>	<i>noae</i>	Arcidae	Arcoidea	Linné, 1758	Rovinj, Nördliche Adria (HR)
<i>Glycymeris</i>	<i>pedunculus</i>	Glycymerididae	Arcoidea	(Linné, 1758)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Modiolus</i>	<i>auriculatus</i>	Modiolinae	Mytiloidea	Krauss, 1848	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Brachidontes</i>	<i>variabilis</i>	Mytilinae	Mytiloidea	(Krauss, 1848)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Septifer</i>	<i>cf. bilocularis</i>	Mytilinae	Mytiloidea	(Linné, 1758)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Gregariella</i>	<i>coarctata</i>	Mytilinae	Mytiloidea	(Carpenter, 1856)	Taboga Island, Golf von Panama (P)
<i>Ctenoides</i>	<i>annulatus</i>	Limidae	Limoidea	(Lamarck, 1819)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Lima</i>	<i>lima</i>	Limidae	Limoidea	(Linné, 1758)	Rovinj, Nördliche Adria (HR)
<i>Hytotissa</i>	<i>cf. hyotis</i>	Gryphaeidae	Ostreoidea	(Linné, 1758)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Hytotissa</i>	<i>cf. numisma</i>	Gryphaeidae	Ostreoidea	(Lamarck, 1819)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Saccostrea</i>	<i>cucullata</i>	Ostreidae	Ostreoidea	(Born, 1778)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Lopha</i>	<i>cristagalli</i>	Ostreidae	Ostreoidea	(Linné, 1758)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Mimachlamys</i>	<i>varia</i>	Pectinidae	Pectinoidea	(Linné, 1758)	Rovinj, Nördliche Adria (HR)
<i>Aequipecten</i>	<i>opercularis</i>	Pectinidae	Pectinoidea	(Linné, 1758)	Rovinj, Nördliche Adria (HR)
<i>Pedum</i>	<i>spondyloideum</i>	Pectinidae	Pectinoidea	(Gmelin, 1791)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Excellichlamys</i>	<i>spectabilis</i>	Pectinidae	Pectinoidea	(Reeve, 1853)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Flexopecten</i>	<i>glaber</i>	Pectinidae	Pectinoidea	(Linné, 1758)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Spondylus</i>	<i>hystrix</i>	Spondylidae	Pectinoidea	Röding, 1798	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Spondylus</i>	<i>crassisquamatus</i>	Spondylidae	Pectinoidea	Lamarck, 1819	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Pinna</i>	<i>muricata</i>	Pinnidae	Pinnoidea	Linné, 1758	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Atrina</i>	<i>pectinata</i>	Pinnidae	Pinnoidea	(Linné, 1767)	Rovinj, Nördliche Adria (HR)
<i>Isognomon</i>	<i>legumen</i>	Isognomidae	Pteroidea	(Gmelin, 1791)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Malvifundus</i>	<i>regulatus</i>	Malleidae	Pteroidea	(Forsskal, 1775)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Vulsella</i>	sp.	Malleidae	Pteroidea	—	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Pteria</i>	<i>macroptera</i>	Pteriidae	Pteroidea	(Lamarck, 1819)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Electroma</i>	<i>alacorvi</i>	Pteriidae	Pteroidea	(Dillwyn, 1817)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Pinctada</i>	<i>margheritifera</i>	Pteriidae	Pteroidea	(Linné, 1758)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Pulvinites</i>	<i>exempla</i>	Pteriidae	Pteroidea	(Hedley, 1914)	East Cape, Pazifik (NZ)
<i>Plicatula</i>	<i>plicata</i>	Plicatulidae	Plicatuloidea	(Linné, 1767)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Dimyaria</i>	<i>maoria</i>	Dimyidae	Anomioidea	(Powell, 1937)	Kawhia, Pazifik (NZ)
<i>Pododesmus</i>	<i>caelata</i>	Anomiidae	Anomioidea	(Reeve, 1859)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Anomia</i>	<i>ephippium</i>	Anomiidae	Anomioidea	Linné, 1758	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)

Tabelle 3: Untersuchte Pteriomorpha (Bivalvia, Mollusca) mit Erstbeschreibung und Sammelorten. ET Ägypten; HR Kroatien; NZ Neuseeland; P Panama



Gattung	Art	Familie	Familiengruppe	Ordnung	Erstbeschreibung	Sammelort
<i>Cardiolucina</i>	<i>semperiana</i>	Lucinidae	Lucinoidea	Heterodonta	(Issel, 1869)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Ctena</i>	<i>divergens</i>	Lucinidae	Lucinoidea	Heterodonta	(Philippi, 1850)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Diplodonta</i>	<i>cf. subrotundata</i>	Ungulinidae	Lucinoidea	Heterodonta	Issel, 1850	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Nuculana</i>	<i>pella</i>	Nucoloidae	Nuculanoidea	Protobranchia	(Linné, 1767)	Rovinj, Nördliche Adria (HR)
<i>Yoldiella</i>	<i>nana</i>	Nucoloidae	Nuculanoidea	Protobranchia	(Sars M., 1865)	Trondheim Fjord, Atlantik (N)
<i>Solemya</i>	<i>togata</i>	Solemyoidae	Solemyoidea	Protobranchia	(Poli, 1795)	Ägäisches Meer (GR)
<i>Tropidomya</i>	<i>abbreviata</i>	Cuspidariidae	Cuspidarioidea	Septibranchia	(Forbes, 1843)	Trondheim Fjord, Atlantik (N)

Gattung	Art	Familie	Ordnung	Klasse	Erstbeschreibung	Sammelort
<i>Antalis</i>	<i>perinvoluta</i>	Dentaliidae	Dentaliida	Scaphopoda	(Ludbrook, 1954)	Safaga Bay, Rotes Meer (ET)
<i>Antalis</i>	<i>inaequicostata</i>	Dentaliidae	Dentaliida	Scaphopoda	(Dautzenberg, 1891)	Rovinj, Nördliche Adria (HR)
<i>Antalis</i>	<i>dentalis</i>	Dentaliidae	Dentaliida	Scaphopoda	(Linné, 1758)	Rovinj, Nördliche Adria (HR)

Gattung	Art	Stamm	Erstbeschreibung	Sammelort
Sipunculida	indet.	Sipuncula	—	Charleston, Atlantik (USA)

Tabelle 4: Untersuchte Heterodonta, Protobranchia und Septibranchia (alle Bivalvia, Mollusca) sowie Scaphopoda (Mollusca) mit Erstbeschreibung und Sammelorten. N Norwegen; ET Ägypten; GR Griechenland; HR Kroatien; USA Vereinigte Staaten von Amerika



II.2. Sequenzierung der 18S rDNA

II.2.1. DNA-Extraktion mittels Chelex® 100 Resin

Für die Extraktion der genomischen DNA wurden entweder der Adduktormuskel, die Kiemen, oder, wie bei vielen verhältnismäßig kleinen Arten, der gesamte Weichkörper der Tiere herangezogen. Die Extraktion wurde nach dem Chelex-Protokoll (Walsh et al. 1991) durchgeführt, allerdings wurde es für die DNA Extraktion bei Bivalven ein wenig modifiziert.

1. Ein kleines Probenstück (ca. 500mg) in möglichst kleine Stückchen zerteilen und in ein sogenanntes Eppendorf-Reaktionsgefäß geben. Anschließend 15mg Chelex® 100 Resin, 200µl steriles Aqua dest., 25µl Proteinase K (→ 2,5mg/ml), 10µl RNase A (→ 25µg/ml), und 10µl DTT (→ 50mM) zugeben.
2. Die Proben in einem Wasserbad bei 65°C unter horizontalem Schütteln (150rpm) solange inkubieren, bis das Gewebe vollständig aufgelöst (lysiert) ist.
3. Anschließend das Lysat 5 Sekunden auf höchster Stufe vortexen.
4. Proben in einem Wasserbad bei ca. 90-100°C für 8-15 Minuten inkubieren (optional).
5. Anschließend das Lysat 5 Sekunden auf höchster Stufe vortexen (optional).
6. Proben 2 Minuten bei 14 000rpm zentrifugieren und anschließend den Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen. Optional: DNA-Fällung mit Ethanol oder Isopropanol, anschließend DNA in 50-100µl Aqua dest. (steril) aufnehmend.
7. Probenlysate bei -20°C lagern und mehrmaliges Auftauen und Einfrieren vermeiden. Optional: Aufbewahrung bei 4°C während der laufenden Experimente.
8. Je nach Qualität und Quantität der extrahierten genomischen DNA werden zwischen 1 und 5µl (≤1µg) in der PCR eingesetzt. Gegebenenfalls muß die DNA verdünnt werden.

Genomische DNA →

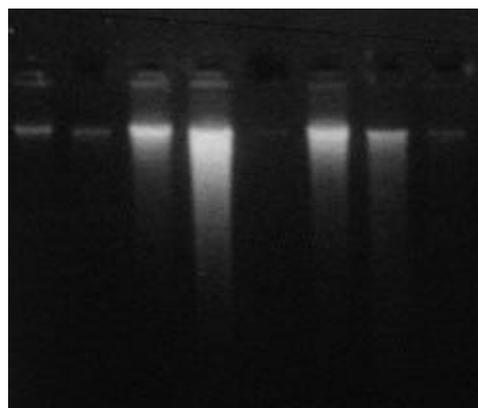


Abb. 16: (4.5.1999) Extrahierte genomische DNA (je 5µl aus 50µl nach DNA-Fällung mit Isopropanol); von links nach rechts: *Anomia ephippium*, *Acar plicata*, *Arca noae*, *Pododesmus caelata*, *Septifer cf. bilocularis*, *Spondylus crassisquamatus*, *Spondylus hystrix*, *Vulsella* sp.



II.2.2. Amplifikation der 18S rDNA mittels PCR

Schritt 1: Vervielfältigung (Amplifikation) der kompletten 18S rDNA

Die kleine ribosomale Untereinheit wird als 18S rDNA bezeichnet, und in der vorliegenden Arbeit wurde nahezu die gesamte 18S rDNA mit den Primern F und R in einer Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase Chain Reaction“ – PCR)⁸⁾ amplifiziert (Saiki et al. 1987). Die Primer⁹⁾ haben folgende Zusammensetzung (Steiner & Müller 1996):

a) Verwendete Primer

F¹⁰⁾ (30mer)

5' CCG AAT TCG TCG ACA ACC TGG TTG ATC CTG 3'

R¹¹⁾ (39mer)

5' CCC GGG ATC CAA GCT TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC 3'

b) PCR-Reaktionsansatz

	18S rDNA vollständig
DNA Menge	≤1 µg
10x PCR-Puffer	2,5 µl
10x dNTP Mix [2mM]	2,5 µl
MgCl ₂ [25mM]	1 µl
Primer F [100pM/µl]	0,25 µl
Primer R [100pM/µl]	0,25 µl
Taq DNA Polymerase [5U/µl]	0,25 µl
Aqua dest. (steril)	Rest auf 25 µl

mit 3-4 Tropfen Mineral Öl überschichten

c) Temperatur Profil auf dem RoboCycler 96 Gradient (Stratagene)

1x [94°C(2')]

5x [94°C(40") - 50°C(40") - 72°C(60")]

35x [94°C(40") - 61°C(40") - 72°C(60")]

1x [72°C(10')] - 6°C (∞)

⁸⁾ Die PCR ist patentrechtlich geschützt für Hoffmann-La Roche.

⁹⁾ Primer sind synthetisch hergestellte kurze DNA-Stücke (10-40 Nukleotide), die als Ausgangspunkte für die Vervielfältigung der DNA mittels PCR dienen. Die Bezeichnung z.B. 34mer gibt die Anzahl der Nukleotide an.

¹⁰⁾ F steht für „forward“, d.h. in Syntheserichtung der DNA-Polymerase (5'→3')

¹¹⁾ R steht für „reverse“, d.h. entgegen der Syntheserichtung der DNA-Polymerase (3'→5')



18S rDNA (ca. 1800bp) —→

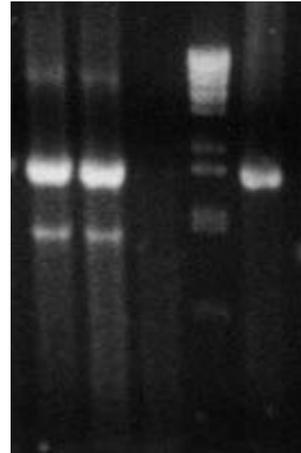


Abb. 17: (12.10.1999) PCR-Produkte der vollständigen 18S rDNA (je 5µl); von links nach rechts: *Pinctada margaritifera* (2x), Negativkontrolle, Low-Range I DNA Molecular Marker, *Aequipecten opercularis*

Schritt 2: 18S rDNA Nested PCR

Die eigentliche Sequenzierung der 18S rDNA erfolgte durch die direkte Sequenzierung von zwei überlappenden Fragmenten. In einer sogenannten „nested PCR“ wurden diese beiden Fragmente mit den Primernpaaren F*-T3/R2-STI2 und F2-STI2/R*-T3 reamplifiziert (Abb. 18 und 19). Die ursprünglichen Primer F und R wurden dahingehend modifiziert, daß sie einerseits verkürzt und andererseits ein paar Nukleotide nach innen versetzt wurden („nested primers“). Die für die Re-PCR verwendeten Primer wurden jeweils am 5'-Ende mit einer kurzen Nukleotidsequenz, sogenannten „Tags“ oder „Tails“ (T3 und STI2), versehen. An diesen Tags binden später die T3- und STI2-Sequenzierprimer, wodurch die beiden überlappenden Fragmente der 18S rDNA direkt sequenziert werden können, ohne den Umweg über einen Klonierungsschritt gehen zu müssen (siehe Kapitel II.3).

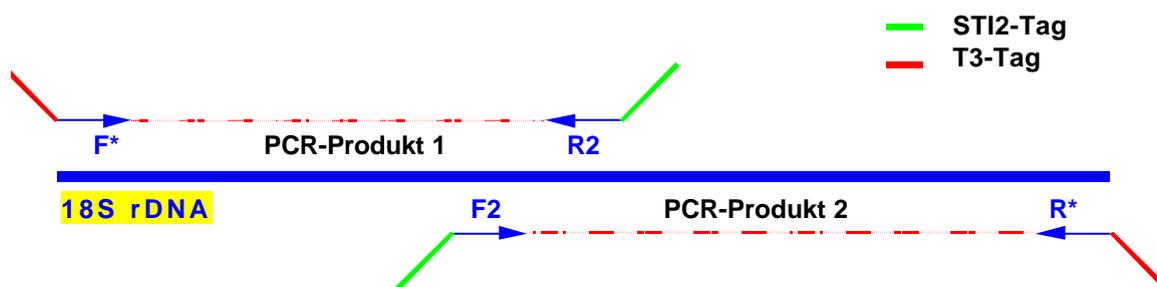


Abb. 18: Strategie der 18S rDNA nested PCR. F* und F2 forward Primer, R* und R2 reverse Primer; STI2 und T3 „Tags“ oder „Tails“.



a) Verwendete Primer¹²⁾

PCR-Produkt 1: ca. 1050bp

F*-T3 (34mer)

5' attaaccctcactaaagCAA CCT GGT TGA TCC TG 3'

R2-STI2 (34mer)

5' cgatgaagaacgcagcgAGA ACT RCG ACG GTA TC 3'

PCR-Produkt 2: ca. 900bp

F2-STI2 (34mer)

5' cgatgaagaacgcagcgTCA GAG GYT CGA AGA CG 3'

R*-T3 (37mer)

5' attaaccctcactaaagCCT TCT GCA GGT TCA CCT AC 3'

b) PCR-Reaktionsansatz

	Produkt 1	Produkt 2
DNA Menge	PCR aus Schritt 1 1:250 verdünnen → 3µl einsetzen	
10x PCR-Puffer	7,5µl	7,5µl
10x dNTP Mix [1,5mM]	7,5µl	7,5µl
MgCl ₂ [25mM]	3µl	3µl
Primer 1 [50pM/µl]	1,5µl [F2-STI2]	1,5µl [R2-STI2]
Primer 2 [50pM/µl]	0,75µl [R*-T3]	0,75µl [F*-T3]
Taq DNA Polymerase [5U/µl]	0,75µl	0,75µl
Aqua dest. (steril)	Rest auf 75µl	Rest auf 75µl
Mit 3-4 Tropfen Mineral Öl überschichten		

c) Temperatur Profil auf dem RoboCycler 96 Gradient (Stratagene)

1x [94°C(2')]

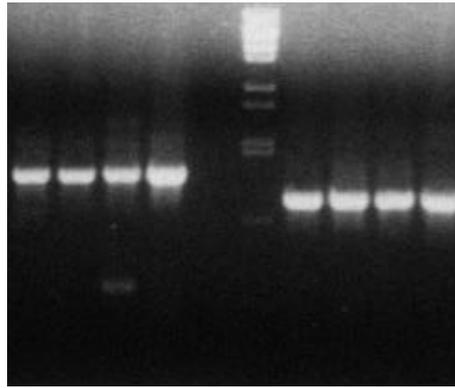
35x [94°C(40") - 52°C(40") - 72°C(60")]

1x [72°C(10') - 6°C (∞)]

¹²⁾ Die Kleinbuchstaben geben die Basenabfolge der Tags an. Diese Primer wurden in Zusammenarbeit mit Mag. Robert Felber (VBC Genomics Bioscience Research GmbH) entwickelt.



PCR-Produkt 1 (ca. 1050bp)



PCR-Produkt 2 (ca. 900bp)

Abb. 19: (11.6.1998) 18S rDNA PCR-Produkte 1 und 2 (je 7µl); von links nach rechts: *Lima lima*, *Aequipecten opercularis*, *Pteria macroptera*, *Lopha cristagalli*, Negativkontrolle, Low-Range I DNA Molecular Marker, *Aequipecten opercularis*, *Pteria macroptera*, *Lima lima*, *Lopha cristagalli*

II.2.3. Sequenzierung

a) DNA-Fällung mit Polyethylenglykol

Um die PCR-Produkte von den nicht umgesetzten Bestandteilen des Reaktionsansatzes zu trennen und zu konzentrieren wurde eine DNA-Fällung mit Polyethylenglykol (PEG) durchgeführt.

1. Zu 75µl PCR-Reaktionsansatz 75µl PEG-Lösung zugeben, gut durchmischen und mindestens 10 Minuten bei 37°C inkubieren.
2. DNA-PEG-Lösungsgemisch bei 4°C und mindestens 15 000rpm 40 Minuten zentrifugieren, sodaß die DNA am Boden des Reaktionsgefäßes einen Niederschlag bildet (=pelletiert).
3. Überstand abheben und das DNA-Pellet mit 500µl 80%igem eiskalten Ethanol waschen und trocknen.
4. DNA in 10µl Aqua dest. (steril) aufnehmen.

b) Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden zusammen mit 3µl 1x Ladepuffer Typ III auf einem 1%igen Agarose-Gel, das mit Ethidiumbromid gefärbt wurde, unter Verwendung eines 0,5x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffers aufgetrennt. Als Längenmarker diente eine 1kb-DNA-Leiter oder der Low-Range I DNA Molecular Marker. Anschließend wurden die gewünschten Fragmente (PCR-Produkt 1 und 2) mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß übergeführt. Für die Aufreinigung der DNA-Fragmente werden folgende Reinigungssysteme empfohlen: Cleanmix, GenElute™, QIAquick. Die direkte Sequenzierung der 18S rDNA mittels T3- und STI2-Sequenzierprimer wurde von der Firma VBC GENOMICS Bioscience Research GmbH auf einem automatischen Sequenzierer (LI-COR 4000 IR2 System) durchgeführt.



II.3. Sequenzierung der 28S rDNA

II.3.1. DNA-Extraktion nach dem CTAB-Protokoll

Für die Extraktion der genomischen DNA wurden entweder der Adduktormuskel, die Kiemen, oder, wie bei vielen verhältnismäßig kleinen Arten, der gesamte Weichkörper der Tiere herangezogen. Es wurde das sogenannte „CTAB-Protokoll“ (Navajas et al. 1998) angewendet, wobei einige Adaptationen durchgeführt wurden, um eine bessere Qualität der genomischen DNA zu erhalten.

1. Ein kleines Probenstück (ca. 500mg) in möglichst kleine Stückchen zerteilen. 380µl Extraktionspuffer (CTAB-Lösung), 20µl Proteinase K und 10µl DTT zugeben.
2. Die Proben in einem Wasserbad bei 65°C unter horizontalem Schütteln (150rpm) solange inkubieren, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hat (5-30 Minuten, oder länger).
3. Anschließend 30 Sekunden bei 12 000rpm zentrifugieren, um die Zelldebris zu pelletieren.
4. Den Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen; 1 Volumen Phenol zugeben und vortexen.
5. 4 Minuten bei 12 000rpm zentrifugieren.
6. Die obere, wässrige Phase (enthält die DNA) vorsichtig abheben (die Interphase soll nicht zerstört werden) und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen; 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugeben und vortexen.
7. 4 Minuten bei 12 000rpm zentrifugieren.
8. Die obere, wässrige Phase (enthält die DNA) vorsichtig abheben (die Interphase soll nicht zerstört werden) und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen; 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugeben und vortexen.
9. 4 Minuten bei 12 000rpm zentrifugieren, die obere, wässrige Phase (enthält die DNA) vorsichtig abheben und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
10. 0.1 Volumen (ca. 40µl) 3 M Na-Acetat und 2 Volumen (ca. 800µl) eiskalten 96% Ethanol (oder 100% Ethanol) zugeben → DNA-Fällung.
11. DNA-Fällung bei -80°C für 20 Minuten (oder 2 Stunden bis über Nacht bei -20°C) durchführen.
12. Anschließend die Proben 20 Minuten bei 12 000rpm zentrifugieren, um die DNA zu pelletieren.
13. Ethanol abnehmen und DNA-Pellet mit 1ml 80%igem eiskalten Ethanol waschen und trocknen.
14. DNA in 50-100µl Tris-HCl (pH 8.0) oder Aqua dest. (steril) resuspendieren.
15. Je nach Qualität und Quantität der extrahierten genomischen DNA, werden 1-2µl ($\leq 1\mu\text{g}$) in der PCR eingesetzt. Gegebenenfalls muß die DNA verdünnt werden.



II.3.2. Amplifikation der 28S rDNA mittels PCR

Die große ribosomale Untereinheit wird als 28S rDNA bezeichnet, und ein ca. 1300bp großer Bereich, der die Domänen D1-D3 umfaßt, wurde in einer PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer haben folgenden Zusammensetzung (Littlewood 1994):

a) Verwendete Primer

LSU5 – forward (18mer)

5' ACC CGC TGA AYT TAA GCA 3'

LSU3 – reverse (18mer)

5' TCC TGA GGG AAA CTT CGG 3'

b) PCR-Reaktionsansatz

	<u>28S rDNA vollständig</u>
DNA Menge	≤1µg
10x PCR-Puffer	5µl
10x dNTP Mix [2mM]	5µl
MgCl ₂ [25mM]	2µl
Primer LSU5 [100pM/µl]	0,5µl
Primer LSU3 [100pM/µl]	0,25µl
Taq DNA Polymerase [5U/µl]	0,5µl
Aqua dest. (steril)	Rest auf 50µl
mit 3-4 Tropfen Mineral Öl überschichten	

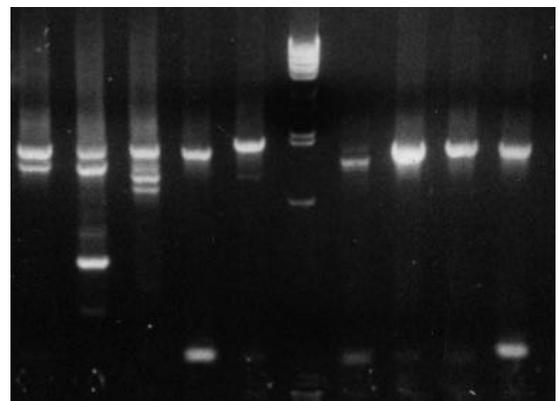
c) Temperatur Profil auf dem RoboCycler 96 Gradient (Stratagene)

1x [94°C(2')]

35x [94°C(40") - 55°C(40") - 72°C(75")]

1x [72°C(10')] - 6°C (∞)

Abb. 20: (24.1.00) Coamplifikate bei der 28S rDNA PCR (je 5µl); von links nach rechts: *Parilimya maoria*, *Pulvinites exempla*, *Hytissa hyotis*, *Hytissa numisma*, *Ctenoides annulatus*, Low-Range I DNA Molecular Marker, *Diplodonta cf. subrotundata*, *Plicatula plicata*, *Vulsella sp.*, *Dimyaria maoria*. Nur *Ctenoides annulatus*, *Plicatula plicata* sowie *Vulsella sp.* zeigen eine diskrete singuläre Bande.





II.3.3. Klonierung¹³⁾ der 28S rDNA

Da bei zahlreichen Proben in der PCR-Reaktion Coamplifikate auftraten (Abb. 20), wurde bei allen Proben auf die direkte Sequenzierung verzichtet und das gewünschte 28S rDNA-Fragment subkloniert. Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning® System (Invitrogen) herangezogen, welches sich vor allem durch ein einfaches Protokoll und eine sehr hohe Transformationseffizienz auszeichnet. In diesem System wird als Vektor das Plasmid pCR®2.1-TOPO (Abb. 21) verwendet und damit die kompetenten Zellen, *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10, transformiert.

Das Auffinden der positiven Transformanden erfolgte mittels traditioneller Blau/Weiß Selektion („Screening“). Hierbei wird den LB-Platten der Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galactopyranosid (X-Gal) zugesetzt, welcher von der β-Galactosidase, die auf dem Vektor kodiert ist, umgesetzt werden kann. Dies führt zu einer Blaufärbung der Kolonien (→ negative Transformanden). Die erfolgreiche Insertion eines DNA-Fragments (hier das 28S rDNA PCR-Produkt) in den Vektor zerstört (disruptiert) den Leserahmen (ORF – Open Reading Frame) des β-Galactosidase-Gens und daher kann von den *E. coli*-Bakterien kein X-Gal umgesetzt werden. Dies resultiert in einer Weißfärbung der Kolonien (→ positive Transformanden).

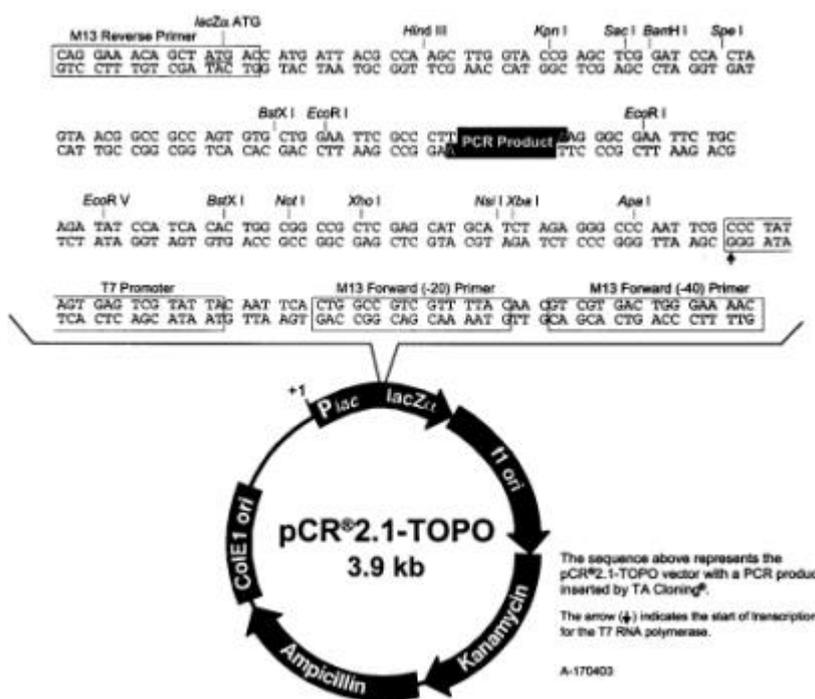


Abb. 21: pCR® 2.1 TOPO Vektor (TOPO TA Cloning® Instruction Manual, Vers. J). LacZα gene (β-Galactosidase Gen) mit „Multiple cloning site“ (Excision des Inserts z.B. mit *EcoRI*), Phage f1 Origin, ColE1 Origin, Kanamycin- und Ampicillin-Resistenzgen, T7 RNA Polymerase Transkriptions-initiationsstelle, T7 RNA Polymerase Promotor, Bindungsstellen für pUC/M13 forward (-20, -40) und reverse Sequenzierprimer

¹³⁾ Unter Klonierung versteht man die gezielte Vermehrung von spezifischen DNA-Abschnitten (meistens handelt es sich um Gene) mittels eines Wirts-Vektorsystems. In der vorliegenden Arbeit werden *Escherichia coli*-Bakterien als Wirte und das pCR® 2.1. TOPO Plasmid als Vektorsystem verwendet.



a) Vorbereitung der PCR-Produkte für die Klonierung

Von den PCR-Reaktionen wurden jeweils ein 5µl Aliquot zusammen mit 3µl 1x Ladepuffer Typ III auf einem 1%igen Agarose-Gel, das mit Ethidiumbromid eingefärbt wurde, unter Verwendung eines 0,5x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffers aufgetrennt. Als Längenmarker diente eine 1kb-DNA-Leiter oder der Low-Range I DNA Molecular Marker. Bei manchen Proben traten in der PCR-Reaktion Coamplifikate auf (Abb. 20), sodaß das gewünschte 28S rDNA-Fragment aus dem Agarose-Gel aufgereinigt (eluiert) werden mußte (siehe II.2.3.b.). Da bei der Elution des DNA-Fragments aus dem Agarose-Gel meist die für eine erfolgreiche Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO Vektor notwendigen überhängenden Adeninnukleotide (dATPs) verloren gehen, mußten für die Transformationsreaktion wieder Adeninnukleotide an das 5'- und 3'-Ende des DNA-Fragment ligiert werden.

Ligation der Adeninnukleotide („A-Tailing“)

10x PCR Puffer	1µl
MgCl ₂ [25mM]	1µl
10x dATP [2mM]	1µl
Taq DNA Polymerase [5U/µl]	1µl
PCR Produkt	≤6µl
Aqua dest.	Rest auf 10µl

→ Proben bei 70-72°C für 15-30 Minuten inkubieren und danach auf –20°C geben.

b) Transformation

1. Die kompetenten *E. coli* Zellen langsam auf Eis auftauen lassen. Aus dem Ligationsansatz 2µl zu den Zellen dazupipettieren und vorsichtig mischen - nicht auf- und abpipettieren!
2. Transformationsansatz 20 Minuten auf Eis inkubieren.
3. Anschließend Transformationsansatz 40 Sekunden auf 42°C inkubieren → Hitze-Schock der *E. coli* Zellen
4. Transformationsansatz auf Eis zurückstellen, 250µl SOC-Medium zugeben und 1 Stunde bei 37°C in einem Wasserbad unter horizontalem Schütteln (120rpm) inkubieren.
5. 50-100µl des Transformationsansatzes auf eine LB/Amp-Platte ausplattieren, die Platten umdrehen und mindestens 24 Stunden bei 37°C in einem Brutschrank inkubieren.
6. Danach Platten mit einem Parafilm verschließen, um sie vor Austrocknung zu schützen, und auf 4°C legen. Auf diese Weise können die Platten einige Wochen gelagert werden.

Ligationsansatz

PCR Produkt oder aus „A-Tailing“	≤4µl
Salz Lösung	1µl
pCR [®] 2.1 TOPO [10ng/µl]	1µl
Aqua dest.	Rest auf 6µl

→ Ligationsansatz maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und danach auf Eis stellen.



Kompetente Zellen

Escherichia coli TOP10

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mrcBC*), Φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL* (Str^R), *endA1*, *nupG*

LB/Amp-Platten (Komponenten siehe Kapitel V.2.1.)

1. Zu 100ml LB-Medium 1,5g Agar-Agar zugeben und aufkochen (Lösung sollte klar sein).
2. LB-Agar-Agar Lösung auf Handwärme abkühlen lassen und 100µl Ampicillin (Amp) oder Kanamycin (Kan) zugeben. Achtung: Ist die Lösung zu heiß, wird das Antibiotikum inaktiviert!
3. Ca. 30ml der Lösung unter semi-sterilen Bedingungen in eine Petri-Schale gießen und erstarren lassen. Mit 100ml LB-Medium können je nach Größe der Petri-Schalen 3-4 Platten gegossen werden.
4. Danach 40µl der X-Gal-Lösung auf jede Platte aufbringen und die Platten auf 37°C zum Equilibrieren inkubieren.

c) Übernacht-Kulturen und Plasmidisolierung

Je eine weiße Kolonie wurde in 3ml flüssiges LB-Medium (+ 3µl Kanamycin oder Ampicillin) unter semi-sterilen Bedingungen inokuliert und in einem Wasserbad bei 37°C unter Schütteln (120rpm) über Nacht inkubiert. Die Isolation der Plasmide aus der Übernacht-Kultur von *E. coli* wurde nach dem Protokoll der Alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim & Doly 1979) durchgeführt. Vor dem Beginn der Plasmidisolierung, sind unter semi-sterilen Bedingungen 850µl von der Bakterienkultur entnommen, mit 150µl Glycerin (steril) gut vermischt und bei -80°C eingefroren worden. Auf diese Weise können Bakterienkulturen für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

1. 2ml der Übernacht-Kultur werden unter semi-sterilen Bedingungen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übergeführt und bei 12 000rpm für 2 Minuten zentrifugiert, um die *E. coli* Zellen zu pelletieren.
2. Der Überstand wird verworfen und die *E. coli* Zellen werden in 100µl gekühlter Lösung I resuspendiert.
3. Zu den resuspendierten *E. coli* Zellen werden 200µl frisch (!) bereitete Lösung II zugegeben und vorsichtig gemischt – nicht auf- und abpipettieren → Lyse der *E. coli* Zellen
4. Es werden 5µl RNase A-Lösung zugegeben, um die RNA der *E. coli* abzubauen. Der RNase-Verdau wird bei 37°C 15 Minuten inkubiert.
5. Anschließend werden 150µl gekühlte Lösung III zugegeben, um eine Deproteinierung durchzuführen. Die Proben wieder vorsichtig mischen und 2 Minuten auf Eis inkubieren.
6. Danach die Proben bei 4°C und 12 000rpm 5 Minuten zentrifugieren und den Überstand in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
7. 500µl PEG-Lösung zugeben, gut mischen und mindestens 10 Minuten bei 37°C inkubieren.
8. Plasmid-PEG-Lösungsgemisch bei 4°C und mindestens 15 000rpm 40 Minuten zentrifugieren.
9. Überstand abheben und das DNA-Pellet mit 500µl 80%igem eiskalten Ethanol waschen und trocknen.
10. Plasmid-DNA in 30µl Aqua dest. (steril) aufnehmen.



d) Restriktionsanalyse zur Excision des Inserts

Die isolierten Plasmide werden vor der Sequenzierung darauf überprüft, ob sie auch tatsächlich die Domänen D1-D3 der 28S rDNA als Insert beinhalten. Da die „Multiple Cloning Site“ des Vektors die Erkennungssequenz¹⁴⁾ für das Restriktionsenzym *EcoRI* enthält, wird dieses Enzym für die Kontrollrestriktionsanalyse (Restriktionsverdau) verwendet.

Restriktionsansatz

Plasmid-DNA	1µl
10x Reaktionspuffer	2µl
<i>EcoRI</i> [10units/µl]	2µl
Aqua dest.	15µl

→ Restriktionssansatz über Nacht bei 37°C inkubieren.

Anschließend wird der Reaktionsansatz zusammen mit 3µl 1x Ladepuffer Typ III auf einem 1%igen Agarose-Gel, das mit Ethidiumbromid gefärbt wurde, unter Verwendung eines 0,5x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffers aufgetrennt. Als Längenmarker diente eine 1kb-DNA-Leiter oder der Low-Range I DNA Molecular Marker (Abb. 22).

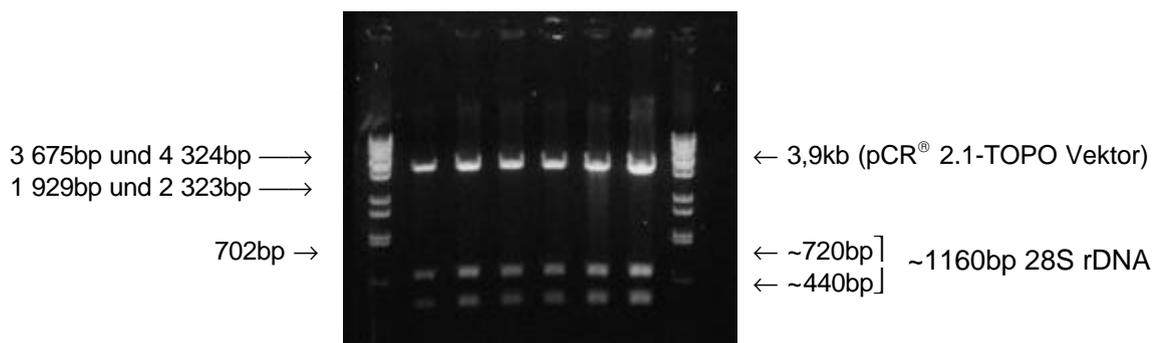


Abb. 22: (18.11.99) Restriktionsanalyse der Plasmide mit *EcoRI*; von links nach rechts: je 2 Klone von *Arca noae*, *Pteria macroptera*, *Malvifundus regulatus*, Low-Range I DNA Molecular Marker

e) Sequenzierung

Die Sequenzierung der Domänen D1-D3 der 28S rDNA mittels T7- und M13-Sequenzierprimer, wurde von der Firma VBC GENOMICS Bioscience Research GmbH auf einem automatischen Sequenzierer (LICOR 4000 IR2 System) durchgeführt.

¹⁴⁾ Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *EcoRI* ist G↓AATTC.



II.4. Phylogenetische Analyse

II.4.1. Verwendete Programme und Parameter

SEQUENZ-ALIGNMENT

- ◆ Manuell (DCSE) De Rijk & De Wachter 1993
- ◆ Computer-unterstützt (Clustal W) Thompson et al. 1994

PARSIMONIE (UNGEWICHTET)

Algorithmus

- ◆ PAUP* 4.0b2 für Microsoft Windows Swofford 1998
- ◆ PAUP* 4.d65 für UNIX Swofford 1998

Parameter

- ◆ Lücken („Gaps“) treated as missing
- ◆ Search = heuristic
- ◆ addseq = random
- ◆ Nrep = 50
- ◆ Keep = all
- ◆ Swap = TBR (tree-bisection-reconnection)
- ◆ Multrees = yes (= Mulpars)
- ◆ nchuck = 100 (Schritt I) nchuck = 0 (Schritt II)
- ◆ chuckscore = 1 (Schritt I)
- ◆ start = current (Schritt II)

Robustheit

- ◆ Bootstrap
 - 1000 Wiederholungen
 - Nrep = 5
 - Swap = TBR
 - Keep = 50
- ◆ Bremer Decay index
 - TreeRot Sorenson 1996
 - Nrep = 10
 - Swap = TBR
 - Keep = 100
- ◆ PUZZLE 4.0 Strimmer & von Haeseler 1996

MAXIMUM-LIKELIHOOD (ML) (ITERATIV)

Algorithmus

- ◆ PAUP* 4.0b2 für Microsoft Windows Swofford 1998
- ◆ PAUP* 4.d65 für UNIX Swofford 1998

Parameter

- ◆ start = current („strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse)
- ◆ Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85)-Modell Hasegawa et al. (1985)
- ◆ gamma distribution



- ◆ ncat = 4
- ◆ gamma shape parameter (berechnet vom jeweiligen Datensatz)
- ◆ transition/transversion ratio (berechnet vom jeweiligen Datensatz)
- ◆ pinvar = estimate
- ◆ swap = NNI (nearest-neighbour-interchange)

Algorithmus

- ◆ fastDNAML 1.0.6 Olsen et al. 1994

Parameter

- ◆ ncat = 4
- ◆ Substitutionsparameter von PAUP*
- ◆ 5 branch rearrangements

NEIGHBOUR-JOINING

Algorithmus

- ◆ PAUP* 4.0b2 für Microsoft Windows Swofford 1998
- ◆ PAUP* 4.d65 für UNIX Swofford 1998

Parameter

- ◆ Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85)-Modell Hasegawa et al. (1985)
- ◆ gamma distributed rate heterogeneity

RELATIVE RATE TEST

- ◆ LINTREE Takezaki et al. 1995

BAUMDARSTELLUNG

- ◆ TREEVIEW Page 1996

INFILE-KONVERTIERUNG

- ◆ FORCON Raes & Van de Peer 1999

HOMOPLASIE-INDIZES

Diese Indizes können berechnet werden, um das vorhandene Ausmaß der Homoplasie¹⁵⁾ in einem Datensatz abzuschätzen. Homoplasie ist die Ursache für den Unterschied zwischen beobachteten Sequenzunterschieden („Rauschen“) im Vergleich zu dem tatsächlich vorhandenen Ausmaß der Sequenzdivergenz („Signal“ und „Rauschen“) (Werman et al. 1996). Für das Auftreten von Homoplasie können Konvergenz, Parallels substitutionen, Rückmutationen sowie Mehrfachsubstitutionen („multiple hits“) verantwortlich sein (Swofford et al. 1996).

Consistency-Index (CI)

- ◆ $CI = m/s$ (m = minimale Schritte, s = beobachtete Schritte)
 - $m = s \Rightarrow CI = 1 \Rightarrow$ keine Homoplasie vorhanden
 - $s > m \Rightarrow CI < 1 \Rightarrow$ Homoplasie vorhanden

¹⁵⁾ Homoplasie kann einerseits für die Analyse von jungen Radiationen ein Problem darstellen, andererseits aber auch den Vergleich von weit entfernten Taxa erschweren.



Homoplasie-Index (HI)

$$\diamond HI = 1 - CI$$

Retention-Index (RI)

- ◆ RI = $g - s / g - m$ (g = maximale Schritte, s = beobachtete Schritte, m = minimale Schritte)
 - RI hoch \Rightarrow Merkmalstransitionen auf interne Knotenpunkte des Baumes konzentriert
 - RI niedrig \Rightarrow viele Autapomorphien vorhanden

Rescaled-Consistency-Index (RC)

- ◆ RC = CI \times RI
 - Je höher CI und RI, desto geringer die Homoplasie und desto besser die Daten

II.4.2. Verwendete Taxa in der phylogenetischen Analyse

In den nachstehenden Kapiteln II.4.2.1.-II.4.2.3. sind jene Datensätze angeführt, die in den jeweiligen phylogenetischen Analysen verwendet wurden.

II.4.2.1. 18S rDNA-Datensatz

Systematische Position	Art, Erstbeschreibung Sammelort	DDBJ ¹⁶⁾ /EMBL ¹⁷⁾ /GENBANK ¹⁸⁾ Accession Number
BIVALVIA		
Pteriomorpha		
Arcoidea		
Arcidae	<i>Arca noae</i> Linné, 1758	X90960
	<i>Acar plicata</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ389630
	<i>Barbatia virescens</i> (Reeve, 1844)	X91974
Noetiidae	<i>Striarca lactea</i> (Linné, 1758)	AF120531
Glycymerididae	<i>Glycymeris pedunculus</i> (Linné, 1758) §	AJ389631
	<i>Glycymeris glycymeris</i> (Linné, 1758) ['sp.']	X91978
Mytiloidea		
Modiolinae	<i>Modiolus auriculatus</i> Krauss, 1848 §	AJ389644
		AF117735
	<i>Modiolus americanus</i> (Leach, 1815)	AF229624
	<i>Modiolus modiolus</i> (Linné, 1758)	AF124210
Mytilinae	<i>Brachidontes variabilis</i> (Krauss, 1848) §	AJ389643
	<i>Brachidontes exustus</i> (Linné, 1758)	AF229623
	<i>Septifer</i> cf. <i>bilocularis</i> (Linné, 1758) §	AJ389645 , AF229622
	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819	L33451, L33452
	<i>Mytilus californianus</i> Conrad, 1837	L33449
	<i>Mytilus edulis</i> (Linné, 1758)	L24489
	<i>Mytilus trossulus</i> Gould, 1850	L33453-55
	<i>Geukensia demissa</i> (Dillwyn, 1817)	L33450
	<i>Hormomya domingensis</i> (Keen, 1971 =	
	<i>Brachidontes domingensis</i> Lamarck, 1819)	AF117736
Crenellinae	<i>Musculus discors</i> (Linné, 1767)	AF124206
	<i>Musculus senhousei</i> (Benson, 1842)	AF124207
Lithophaginae	<i>Lithophaga lithophaga</i> (Linné, 1758)	AF120530, AF124208

¹⁶⁾ National Institute of Genetics - DDBJ DNA Data Bank (<http://www.nig.ac.jp/home.html>)

¹⁷⁾ European Bioinformatics Institute - EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk>)

¹⁸⁾ National Centers for Bioinformation - GenBank Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



	<i>Lithophaga nigra</i> (d'Orbigny, 1842)	AF124209
Bathymodiolinae	<i>Bathymodiolus thermophilus</i> Kenk & Wilson, 1985	AF221638
	<i>Bathymodiolus heckerae</i> Turner, Gustafson, Lutz & Vrijenhoek, 1998	AF221639
	<i>Bathymodiolus puteoserpentis</i> von Cosel, Metiviere & Hashimoto, 1994	AF221640
	<i>Bathymodiolus childressi</i> Gustafson, Turner, Lutz & Vrijenhoek, 1998	AF221641
	<i>Tamu fisheri</i> Gustafson, Turner, Lutz & Vrijenhoek, 1998	AF221642
	<i>Idas macdonaldi</i> Gustafson, Turner, Lutz & Vrijenhoek, 1998	AF221647
	<i>Idas washingtonia</i> (Bernard, 1978)	AF221645
	<i>Idas arcuatilis</i> ¹⁹⁾	AF221643
	<i>Adipicola arcuatilis</i> Dell, 1995	AF221644
	<i>Benthomodiolus lignicola</i> Dell, 1987	AF221648
	<i>Myrina pacifica</i> ²⁰⁾	AF221646
Pinnoidea		
Pinnidae	<i>Pinna muricata</i> Linné, 1758 §	AJ389636
	<i>Atrina pectinata</i> (Linné, 1767)	X90961
Pterioidea		
Pteriidae	<i>Pteria macroptera</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389637
	<i>Pteria hirundo</i> (Linné, 1758)	AF120532
	<i>Pinctada margaritifera</i> (Linné, 1758) §	AJ389638
	<i>Electroma alacorvi</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ389641
Isognomonidae	<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1791) §	AJ389639
Malleidae	<i>Malvifundus regulatus</i> (Forsskal, 1775) §	AJ389640
	<i>Vulsella</i> sp. §	AJ389642
Ostreoidea		
Gryphaeidae	<i>Hyotissa</i> cf. <i>hyotis</i> (Linné, 1758) §	AJ389632
	<i>Hyotissa</i> cf. <i>numisma</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389633
Ostreidae		
Ostreinae	<i>Ostrea edulis</i> Linné, 1758	L49052, U88709
Lophinae	<i>Lopha cristagalli</i> (Linné, 1758) §	AJ389635
Crassostreinae	<i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791)	Z29549
	<i>Saccostrea cucullata</i> (Born, 1778) §	AJ389634
Anomioidea		
Anomiidae	<i>Anomia ehippium</i> Linné, 1758 †	AJ389661
	<i>Pododesmus caelata</i> (Reeve, 1859) §	AJ389650
Plicatuloidea		
Plicatulidae	<i>Plicatula plicata</i> (Linné 1767) §	AJ389651
Limoidea		
Limidae	<i>Lima lima</i> (Linné, 1758) §	AJ389652
	<i>Limaria hians</i> (Gmelin, 1791)	AF120534
	<i>Ctenoides annulatus</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389653
Pectinoidea		
Spondylidae	<i>Spondylus crassisquamatus</i> Lamarck, 1819 §	AJ389646
	<i>Spondylus hystrix</i> Röding, 1798 §	AJ389647
Pectinidae	<i>Pecten maximus</i> (Linné, 1758)	L49053
	<i>Placopecten magellanicus</i> (Gmelin, 1791)	X53899

¹⁹⁾ Leider keinen Eintrag gefunden.²⁰⁾ Genus-Status in Revision.



	<i>Flexopecten glaber</i> (Linné, 1758) †	AJ389662
	<i>Argopecten irradians</i> (Lamarck, 1819)	L11265
	<i>Argopecten gibbus</i> (Linné, 1758)	AF074389
	<i>Adamussium colbecki</i> (Smith, 1902)	AJ242534
	<i>Aequipecten opercularis</i> (Linné, 1758) †	AJ310482
	<i>Chlamys islandica</i> (Müller O.F., 1776)	L11232
	<i>Chlamys hastata</i> (Sowerby, 1843)	L49049
	<i>Mimachlamys varia</i> (Linné, 1758)	L49051
	<i>Crassadoma gigantea</i> (Gray, 1825)	L49050
	<i>Excellichlamys spectabilis</i> (Reeve, 1853) §	AJ389648
	<i>Pedum spondyloideum</i> (Gmelin, 1791) §	AJ389649
Protobranchia		
Solemyida		
Solemyidae	<i>Solemya togata</i> (Poli, 1795) #	AJ389658
	<i>Solemya reidi</i> Bernard, 1980	AF117737
Nuculida		
Nuculanidae	<i>Yoldiella nana</i> (Sars M., 1865) †	AJ389659
	<i>Nuculana pella</i> (Linné, 1767) †	AJ389665
Heteroconchia		
Unionoidea		
Unionidae	<i>Elliptio complanata</i> (Lightfoot, 1786)	AF117738
Lucinoidea		
Lucinidae	<i>Cardiolucina semperiana</i> (Issel, 1869) §	AJ389655
	<i>Ctena divergens</i> (Philippi, 1850) §	AJ389656
Ungulinidae	<i>Diplodonta</i> cf. <i>subrotundata</i> Issel, 1869 §	AJ389654
Veneroidea		
Veneridae	<i>Venus verrucosa</i> Linné, 1758	AJ007614
	<i>Callista chione</i> (Linné, 1758)	AJ007613
Arcticidae	<i>Arctica islandica</i> (Linné, 1767)	U93555
Galeommatidae	<i>Galeomma takii</i> Kuroda, 1945	X91969
Mactridae	<i>Mactromeris polynyma</i> (Stimpson, 1860)	L11230
	<i>Mulinia lateralis</i> (Say, 1822)	L11268
Myoidea		
Myidae	<i>Mya arenaria</i> Linné, 1758	AF117739
Anomalodesmata		
Cuspidariidae	<i>Tropidomya abbreviata</i> (Forbes, 1843) †	AJ389657
CAUDOFOVEATA		
Limifossoridae	<i>Scutopus ventrolineatus</i> Salvini-Plawen, 1968	X91977
POLYPLACOPHORA		
Ischnochitonina		
Chitonidae	<i>Liolophura japonica</i> (Lischke, 1873)	X70210
GASTROPODA		
Neritopsina		
Neritidae	<i>Nerita albicilla</i> Linné, 1758	X91971
Vetigastropoda		
Trochidae	<i>Monodonta labio</i> (Linné, 1758)	X94271
Caenogastropoda		
Muricidae	<i>Thais clavigera</i> (Kuster, 1860)	X91979
Nassariidae	<i>Nassarius siquinjorensis</i> (A. Adams) = <i>crematus</i> (Hinds, 1844)	X94273
	<i>Bursa rana</i> (Linné, 1758)	X94269
Tonniidae		
SCAPHOPODA		
Dentaliida		



Dentaliidae	<i>Antalis vulgaris</i> (Da Costa, 1778) <i>Antalis inaequicostata</i> (Dautzenberg, 1891) ‡ <i>Antalis perinvoluta</i> (Ludbrook, 1954) § <i>Antalis dentalis</i> (Linné, 1758) ‡	X91980 AJ389660 AJ389663 diese Arbeit
-------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------

SIPUNCULA

Sipunculida indet. ||**AJ389664**

Tabelle 5: Taxa, die in der phylogenetischen Analyse der 18S rDNA verwendet wurden, mit Erstbeschreibung, Sammelort und jener Zugriffsnummer (Accession Number), mit der sie in den DDBJ-, EMBL- und GenBank-Datenbanken hinterlegt sind. Taxa, die im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurden, sind fettgedruckt. Fußnoten korrespondieren mit folgenden Sammelorten: # Ägäisches Meer (Griechenland); † Trondheim Fjord (Atlantik Norwegen); ‡ Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien); § Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten); || Charleston (Atlantik, USA).

II.4.2.2. 28S rDNA-Datensatz

Systematische Position	Art, Erstbeschreibung Sammelort	DDBJ/EMBL/GENBANK Accession Number
BIVALVIA		
Pteriomorpha		
Arcoidea		
Arcoidea	<i>Arca noae</i> Linné, 1758 ‡	AJ307563
	<i>Acar plicata</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ307533
Glycymerididae	<i>Glycymeris pedunculus</i> (Linné, 1758) §	AJ307534
Mytiloidea		
Modiolinae	<i>Modiolus auriculatus</i> Krauss, 1848 §	AJ307537
Mytilinae	<i>Mytilus edulis</i> (Linné, 1758)	Z29550
	<i>Brachidontes variabilis</i> (Krauss, 1848) §	AJ307536
	<i>Gregariella coarctata</i> (Carpenter, 1856) &	AJ307538
Lithophaginae		
Pinnoidea		
Pinnidae	<i>Atrina pectinata</i> (Linné, 1767) ‡	AJ307557
Pterioidea		
Pteriidae	<i>Pteria macroptera</i> (Lamarck, 1819) §	AJ307548
	<i>Pinctada radiata</i> (Leach, 1814)	AF137032
	<i>Electroma alacorvi</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ307549
	<i>Pulvinites exempla</i> (Hadley, 1914) *	AJ307540
Isognomonidae	<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1791) §	AJ307551
	<i>Isognomon alata</i> (Gmelin, 1791)	AF137033
Malleidae	<i>Malvifundus regulatus</i> (Forsskal, 1775) §	AJ307547
Ostreioidea		
Gryphaeidae	<i>Hytissa</i> cf. <i>hyotis</i> (Linné, 1758)	AF137036
	<i>Hytissa</i> cf. <i>numisma</i> (Lamarck, 1819)	AF137035
	<i>Neopycnodonte cochlear</i> (Poli, 1795)	AF137034
Ostreidae		
Ostreinae	<i>Ostrea edulis</i> Linné, 1758	AF137047, Z29551
Lophinae	<i>Lopha cristagalli</i> (Linné, 1758)	AF137038
Crassostreinae	<i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791)	AF137050, Z29549
	<i>Saccostrea cucullata</i> (Born, 1778) §	AJ344329 , Z29553
Anomioidea		
Anomiidae	<i>Anomia ehippium</i> Linné, 1758 ‡	AJ307556
	<i>Pododesmus caelata</i> (Reeve, 1859) §	AJ307555
Dimyidae	<i>Dimyaria maoria</i> (Powell, 1937) *	AJ307541



Plicatuloidea			
Plicatulidae	<i>Plicatula plicata</i> (Linné 1767) §		AJ307539
Limoidea			
Limidae	<i>Lima lima</i> (Linné, 1758) §		AJ307558
	<i>Ctenoides annulatus</i> (Lamarck, 1819) §		AJ307550
Pectinoidea			
Spondylidae	<i>Spondylus crassisquamatus</i> Lamarck, 1819 §		AJ307542
Pectinidae	<i>Flexopecten glaber</i> (Linné, 1758) †		AJ307545
	<i>Aequipecten opercularis</i> (Linné, 1758) †		AJ307543
	<i>Mimachlamys varia</i> (Linné, 1758) †		AJ307546
	<i>Excellichlamys spectabilis</i> (Reeve, 1853) §		AJ307544
Protobranchia			
Solemyida			
Solemyidae	<i>Solemya togata</i> (Poli, 1795) #		AJ307552
Nuculida			
Nuculanidae	<i>Nuculana pella</i> (Linné, 1767) †		AJ307553

Tabelle 6: Taxa, die in der phylogenetischen Analyse der 28S rDNA verwendet wurden, mit Erstbeschreibung, Sammelort und jener Zugriffsnummer (Accession Number), mit der sie in den DDBJ-, EMBL- und GenBank-Datenbanken hinterlegt sind. Taxa, die im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurden, sind fettgedruckt. Fußnoten korrespondieren mit folgenden Sammelorten: # Ägäisches Meer (Griechenland); † Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien); § Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten); * National Museum von Neuseeland – NMNZ (Pazifik, Neuseeland); & Taboga Island (Golf von Panama, Panama)

II.4.2.3. 18S+28S rDNA-Datensatz

Systematische Position	Art, Erstbeschreibung Sammelort	DDBJ/EMBL/GENBANK Accession Number	
		18S rDNA	28S rDNA
BIVALVIA			
Pteriomorpha			
Arcoidea			
Arcidae	<i>Arca noae</i> Linné, 1758 †	X90960	AJ307563
	<i>Acar plicata</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ389630	AJ307533
Glycymerididae	<i>Glycymeris pedunculus</i> (Linné, 1758) §	AJ389631	AJ307534
Mytiloidea			
Modiolinae	<i>Modiolus auriculatus</i> Krauss, 1848 §	AJ389644	AJ307537
Mytilinae	<i>Mytilus edulis</i> (Linné, 1758)	L24489	Z29550
	<i>Brachidontes variabilis</i> (Krauss, 1848) §	AJ389643	AJ307536
	<i>Gregariella coarctata</i> (Carpenter, 1856) &	AJ414641	AJ307538
Lithophaginae			
Pinnoidea			
Pinnidae	<i>Atrina pectinata</i> (Linné, 1767) †	X90961	AJ307557
Pterioidea			
Pteriidae	<i>Pteria macroptera</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389637	AJ307548
	<i>Pinctada margaritifera</i> (Linné, 1758) §	AJ389638	
	<i>Pinctada radiata</i> (Leach, 1814)		AF137032
	<i>Electroma alacorvi</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ389641	AJ307549
	<i>Pulvinites exempla</i> (Hadley, 1914) *	AJ414640	AJ307540
Isognomonidae	<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1791) §	AJ389639	AJ307551
Malleidae	<i>Malvifundus regulatus</i> (Forsskal, 1775) §	AJ389640	AJ307547
Ostreoidea			
Gryphaeidae	<i>Hyotissa</i> cf. <i>hyotis</i> (Linné, 1758)	AJ389632	AF137036

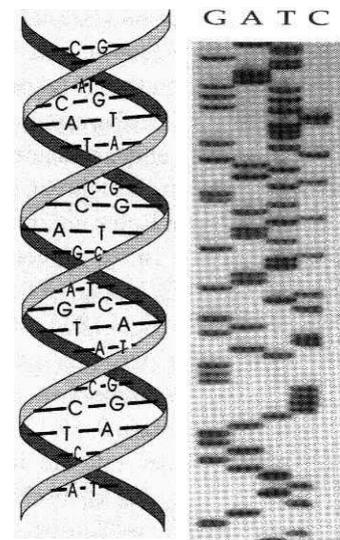


	<i>Hyotissa</i> cf. <i>numisma</i> (Lamarck, 1819)	AJ389633	AF137035
Ostreidae			
Ostreinae	<i>Ostrea edulis</i> Linné, 1758	L49052	AF137047
		U88709	Z29551
Lophinae	<i>Lopha cristagalli</i> (Linné, 1758)	AJ389635	AF137038
Crassostreinae	<i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791)	Z29549	AF137050
			Z29549
	<i>Saccostrea cucullata</i> (Born, 1778) §	AJ389634	AJ344329
			Z29553
Anomioidea			
Anomiidae	<i>Anomia ephippium</i> Linné, 1758 †	AJ389661	AJ307556
	<i>Pododesmus caelata</i> (Reeve, 1859) §	AJ389650	AJ307555
Plicatuloidea			
Plicatulidae	<i>Plicatula plicata</i> (Linné 1767) §	AJ389651	AJ307539
Limoidea			
Limidae	<i>Lima lima</i> (Linné, 1758) §	AJ389652	AJ307558
	<i>Ctenoides annulatus</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389653	AJ307550
Pectinoidea			
Spondylidae	<i>Spondylus crassisquamatus</i> Lamarck, 1819 §	AJ389646	AJ307542
Pectinidae	<i>Flexopecten glaber</i> (Linné, 1758) †	AJ389662	AJ307545
	<i>Aequipecten opercularis</i> (Linné, 1758) †	AJ310482	AJ307543
	<i>Mimachlamys varia</i> (Linné, 1758) †	L49051	AJ307546
	<i>Excellichlamys spectabilis</i> (Reeve, 1853) §	AJ389648	AJ307544
Protobranchia			
Solemyida			
Solemyidae	<i>Solemya togata</i> (Poli, 1795) #	AJ389658	AJ307552
Nuculida			
Nuculanidae	<i>Nuculana pella</i> (Linné, 1767) †	AJ389665	AJ307553

Tabelle 7: Taxa, die in der phylogenetischen Analyse der 18S rDNA zusammen mit der 28S rDNA verwendet wurden, mit Erstbeschreibung, Sammelort und jener Zugriffsnummer (Accession Number), mit der sie in den DDBJ-, EMBL- und GenBank-Datenbanken hinterlegt sind. Taxa, die im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurden, sind fettgedruckt. Fußnoten korrespondieren mit folgenden Sammelorten: # Ägäisches Meer (Griechenland); † Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien); § Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten); * National Museum von Neuseeland – NMNZ (Pazifik, Neuseeland); & Taboga Island (Golf von Panama, Panama)



III. ERGEBNISSE



III.1. 18S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia	60
III.1.1. Erhaltene 18S rDNA-Sequenzen.....	60
III.1.2. Phylogenetische Beziehungen höherer Taxa	61
III.1.3. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha	65
III.2. 28S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia	68
III.2.1. Erhaltene 28S rDNA-Sequenzen	68
III.2.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha	69
III.3. 18S+28S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia	73
III.3.1. Erhaltene 18S- und 28S rDNA-Sequenzen	73
III.3.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha	74



III.1. 18S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia

III.1.1. Erhaltene 18S rDNA-Sequenzen

Von den insgesamt 44 untersuchten Taxa konnten von 39 (40) die 18S rDNA-Sequenzen ermittelt werden, welche in den DDBJ-, EMBL- und GenBank-Datenbanken hinterlegt und bereits auch freigegeben worden sind. Die dafür vergebenen Zugriffsnummern (Accession Numbers) sind in Kapitel II.4.2.1. (Tab. 5) und Kapitel V.2.5. (Tab. 13) aufgeführt. Die Länge der 18S rDNA von den untersuchten Taxa umfaßt einen Bereich von 1533 Basenpaaren (*Solemya togata*, Protobranchia) bis zu 1798 Basenpaaren (*Tropidomya abbreviata*, Septibranchia). Bei *Gregariella coarctata* und *Pulvinites exempla* (beide Pteriomorpha) konnten leider nur ca. 50% der 18S rDNA beginnend vom 5'-Ende sequenziert werden. In Tabelle 8 sind alle untersuchten Taxa mit der jeweils erhaltenen Länge der 18S rDNA-Sequenz aufgeführt. Hinichtlich der Zusammensetzung des Datensatzes für die phylogenetische Analyse im Vergleich zu der Arbeit von Steiner & Hammer (2000) wurden folgende Veränderungen vorgenommen:

- ◆ Partielle 18S rDNA-Sequenzen wurden aus dem Datensatz exkludiert (Ausnahmen: *Gregariella coarctata* und *Pulvinites exempla*, deren Sequenzen zum damaligen Zeitpunkt noch nicht vorlagen). Von *Solemya togata* (Protobranchia) konnte die vollständige Sequenz der 18S rDNA ermittelt werden.
- ◆ Die in Distel et al. (2000) publizierten 18S rDNA-Sequenzen der Bathymodiolinae (Mytiloidea, Pteriomorpha) sowie weitere aus Distel (2000) und einige aus Campbell (2000) wurden dem Alignment hinzugefügt.
- ◆ Aufgrund der erhaltenen 18S rDNA-Sequenz und einer taxonomischen Nachbestimmung wurde das vermeintliche Taxon *Dentalium laqueatum* Verrill, 1885 (Dentaliida, Scaphopoda) nun als Sipunculida indet. (Sipuncula) klassifiziert.

Das Programm CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) wurde verwendet, um die erhaltenen 18S rDNA-Sequenzen mit bereits publizierten Sequenzen zu alignieren, wobei manuelle Korrekturen durchgeführt wurden, sofern Informationen bezüglich der Sekundärstruktur vorlagen. Nahezu alle vollständigen 18S rDNA-Sequenzen von Bivalven, die in den Datenbanken DDBJ, EMBL und GenBank hinterlegt sind, wurden in das Sequenzalignment miteinbezogen (vgl. auch Kapitel II.4.2.1.), um eine möglichst umfangreiche taxonomische Representation von Arten der Klasse Bivalvia zu erzielen (Lecointre et al. 1993).

Jenes Alignment, das für die phylogenetische Analyse verwendet wurde, bestand aus 2083 Merkmalen (= Nukleotide, Basenpaare), von welchen 1093 konstant waren; 333 variable Merkmale waren nicht informativ („parsimony-uninformative“), 657 Merkmale waren informativ („parsimony-informative“).



Art	Länge in bp	Art	Länge in bp
<i>Acar plicata</i>	1738	<i>Malvifundus regulatus</i>	1722
<i>Aequipecten opercularis</i>	1720	<i>Modiolus auriculatus</i>	1735
<i>Anomia ephippium</i>	1662	<i>Nuculana pella</i>	1741
<i>Antalis inaequicostata</i>	1762	<i>Pedum spondyloideum</i>	1736
<i>Antalis perinvoluta</i>	1744	<i>Pinctada margaritifera</i>	1747
<i>Brachidontes variabilis</i>	1735	<i>Pinna muricata</i>	1736
<i>Cardiolucina semperiana</i>	1738	<i>Plicatula plicata</i>	1735
<i>Ctena divergens</i>	1738	<i>Pododesmus caelata</i>	1735
<i>Ctenoides annulatus</i>	1746	<i>Pteria macroptera</i>	1748
<i>Diplodonta cf. subrotundata</i>	1772	<i>Pulvinites exempla</i>	907 ^{‡)}
<i>Electroma alacorvi</i>	1745	<i>Saccostrea cucullata</i>	1712
<i>Exellichlamys spectabilis</i>	1738	<i>Septifer cf. bilocularis</i>	1737
<i>Flexopecten glaber</i>	1654	Sipunculida indet.	1754
<i>Glycymeris pedunculus</i>	1681	<i>Solemya togata</i>	1533
<i>Gregariella coarctata</i>	852 ^{‡)}	<i>Spondylus crassisquamatus</i>	1739
<i>Hytotissa cf. hyotis</i>	1740	<i>Spondylus hystrix</i>	1735
<i>Hytotissa cf. numisma</i>	1733	<i>Tropidomya abbreviata</i>	1798
<i>Isognomon legumen</i>	1718	<i>Vulsella sp.</i>	1750
<i>Lima lima</i>	1642	<i>Yoldiella nana</i>	1740
<i>Lopha cristagalli</i>	1697		

Tabelle 8: Auflistung jener Taxa, deren 18S rDNA im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurde mit der Länge der erhaltenen Sequenz. Bp Basenpaare. ^{‡)} 50% der 18S rDNA beginnend vom 5'-Ende sequenziert.

III.1.2. Phylogenetische Beziehungen höherer Taxa

Die Parsimonie-Analyse (heuristische Suche) mit dem Programm PAUP* ergab 106946 MPT („most parsimonious trees“ = sparsamste Bäume), wobei *Scutopus ventrolineatus* (Caudofoveata) als Außengruppe diente. Der „strict consensus“-Baum (Länge = 3413 Schritte) der Parsimonie-Analyse (Abb. 23) wurde als Ausgangsbaum für die Berechnung der Maximum-Likelihood-Parameter (PAUP*, fastDNAmI) mit anschließendem „branch swapping“ herangezogen. Der finale ML-Baum (Abb. 24a, b und 25) weist einen $-\ln$ likelihood-Wert von 21588,34462 auf. Die Transitions/ Transversions-Rate beträgt 1,202349 ($\kappa = 2,398834$) und der Gamma-Shape-Parameter $\alpha = 0,465545$. Der Consistency-Index (CI) hat einen Wert von 0,37 und der Rescaled-Consistency-Index (RC) = 0,26, wodurch der Homoplasie-Index (HI) 0,63 beträgt. Für die Beurteilung der Robustheit der Äste bzw. der Knoten der ermittelten Bäume wurden folgende Indizes berechnet (Abb. 23 und 24): Bootstrap-Werte (PAUP*), Bremer- oder Decay-Index (Bremer 1988, 1994), sowie Puzzle-Index (PUZZLE 4.0).

Auffallend sind vor allem die niedrigen Indizes der tiefen Knoten die – mit geringen Ausnahmen – unter 50% liegen (Bootstrap- und Puzzle-Indizes) bzw. ≤ 5 sind (Bremer- oder Decay-Index). Die Monophylie der Bivalvia ist nicht unterstützt, da einerseits *Lilophura japonica* (Polyplacophora) entweder innerhalb der Heterodonta oder an der Basis der Protobranchia positioniert ist. Andererseits ist jener Knoten, der die Gruppierung ((Pteriomorpha, Protobranchia) Heterodonta) von den Gastropoda trennt nur sehr gering unterstützt, was sich in den Werten 29/34/3²¹⁾ der Indizes bestätigt (Abb. 23 und 24). *Lilophura japonica* bildet in dem „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse (Abb. 23) eine

²¹⁾ Die Reihenfolge der Indizes ist: Bootstrap (in %) / Puzzle (in %) / Bremer- oder Decay-Index.



Schwesterngruppe zu den Protobranchia, ist aber hingegen in dem ML-Baum (Abb. 24a und 25) an der Basis der Gruppierung (Heterodonta, *Tropidomya abbreviata* – Anomalodesmata) positioniert. Im ML-Baum ist *Tropidomya abbreviata* die Schwesterngruppe zu den Lucinoidea, im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse hingegen formen *Tropidomya abbreviata* und *Galeomma takii* (Galeommatidae) eine Polytomie inmitten der Heterodonta. Sipunculida indet. (Sipuncula) bildet im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse mit *Scutopus ventrolineatus* (Caudofoveata – Außengruppe) an der Basis des Baumes eine Polytomie; im ML-Baum hingegen ist ebenfalls an der Basis des Baumes das Taxon Sipunculida indet. die Schwesterngruppe zu den Scaphopoda. Für die Gruppierung (Protobranchia, *Lilophura japonica*) ist mit 15/2/1 im Grunde keine Unterstützung gegeben; gleiches gilt auch für den Knoten ((Protobranchia, *Lilophura japonica*) Pteriomorpha) mit den Indizes <5/<1/1; im Gegensatz dazu sind die Pteriomorpha mit den Werten 70/30/5 gut unterstützt.

Die Verzweigung der Pteriomorpha hat eine deutlich höhere Unterstützung als jener der Heterodonta und spaltet sich in zwei Linien auf (Abb. 24a, b), wobei die beiden entsprechenden Knoten mit den Werten 21/26/1 bzw. 15/1/1 nur schwach unterstützt sind. Die eine Aufspaltung ist zusammengesetzt aus den Arcoidea an der Basis, gefolgt von den Anomioidea und *Plicatula plicata* (Plicatulidae) als Schwesterngruppe zu den Limidae und Pectinoidea. Die andere Linie würde sich wiederum in zwei Gruppen auftrennen, allerdings ist auch in diesem Fall eine eindeutige Absicherung der Gruppierung (Pinnidae (Pterioidea, Ostreoidea)) nicht gegeben (Abb. 24a, b). Anders ist die Situation für die Mytiloidea, da diese sowohl im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse als auch im ML-Baum mit 100/97/14 sehr gut unterstützt sind. Im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse zeigt die Linie ((Pinnidae (Pterioidea, Ostreoidea)) Mytiloidea) des ML-Baumes eine abweichende Topologie: Die Pinnidae und die Gruppe (Ostreoidea, Pterioidea) bilden eine Polytomie, die allerdings in beiden Fällen sehr robust abgesichert ist, und die Mytiloidea stehen solitär dazu in einem Schwesterngruppenverhältnis. Für die Pterioidea, Limidae, Gryphaeidae und Mytiloidea wurden Bremer-Indizes zwischen 14 und 21 ermittelt, wobei die Pterioidea mit 21 den höchsten Wert aufweisen. Die Bootstrap-Werte liegen bei 99 bzw. 100%. Bei den Pectinidae, Spondylidae, Anomiidae, Pinnidae, Arcoidea und Ostreidae wiederum konnten Bremer-Indizes von 7 bis 11 festgestellt werden, wobei die Ostreidae mit 7 den niedrigsten Wert aufweisen. Hier befinden sich die Bootstrap-Werte in einem Bereich von 96 bis 100%, wodurch die Familiengruppen der Pteriomorpha sehr gut unterstützt sind.

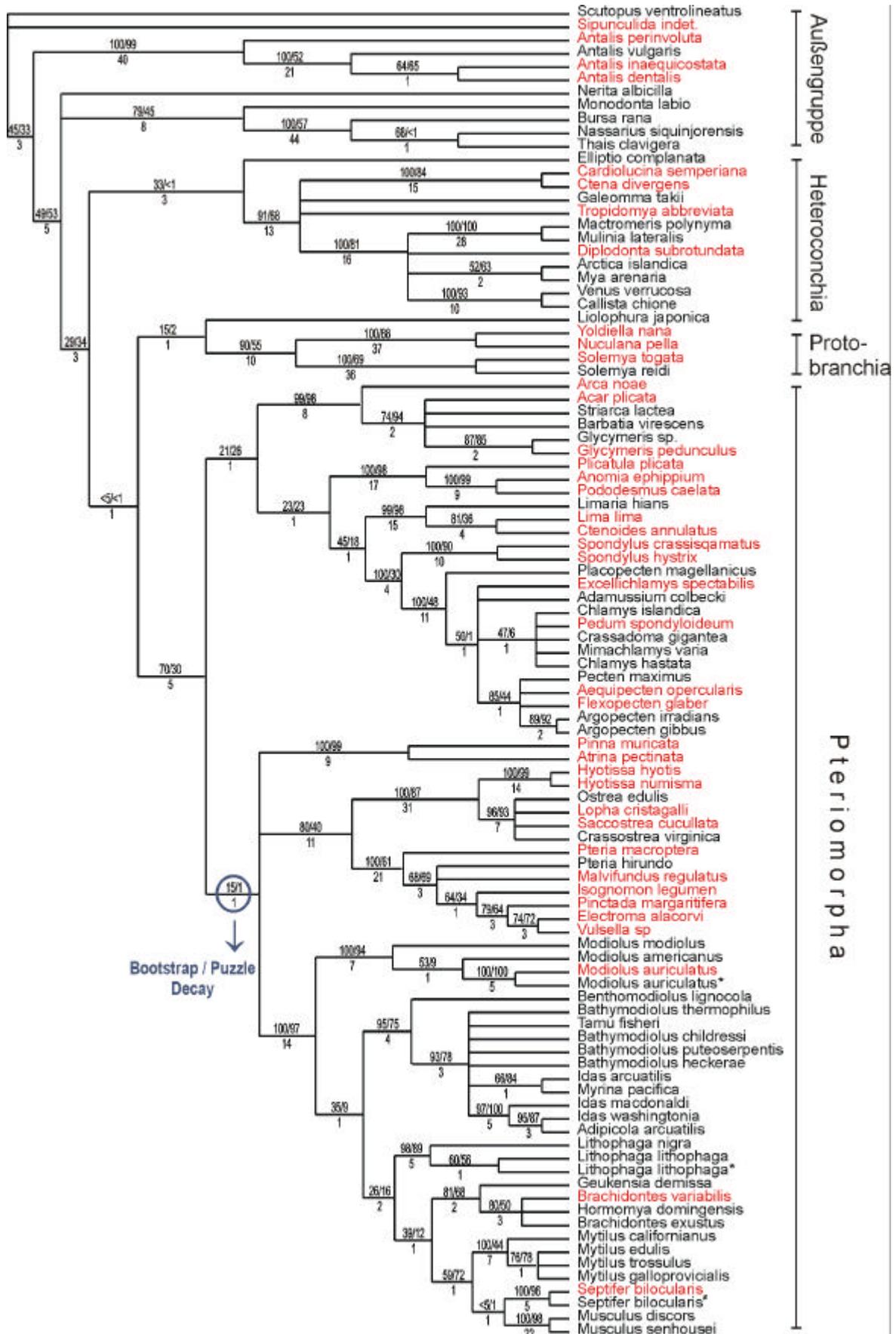


Abb. 23: „Strict Consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse des 18S rDNA-Datensatzes mit den berechneten Indizes Bootstrap (%), Puzzle (%) und Decay- (= Bremer-) Index. Die Lücken („gaps“) hatten den Merkmalszustand „fehlend“. Taxa, die im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurden. MPT = 106946, L = 3413, CI = 0,37, RC = 0,26. * Distel 2000; # Campbell 2000.

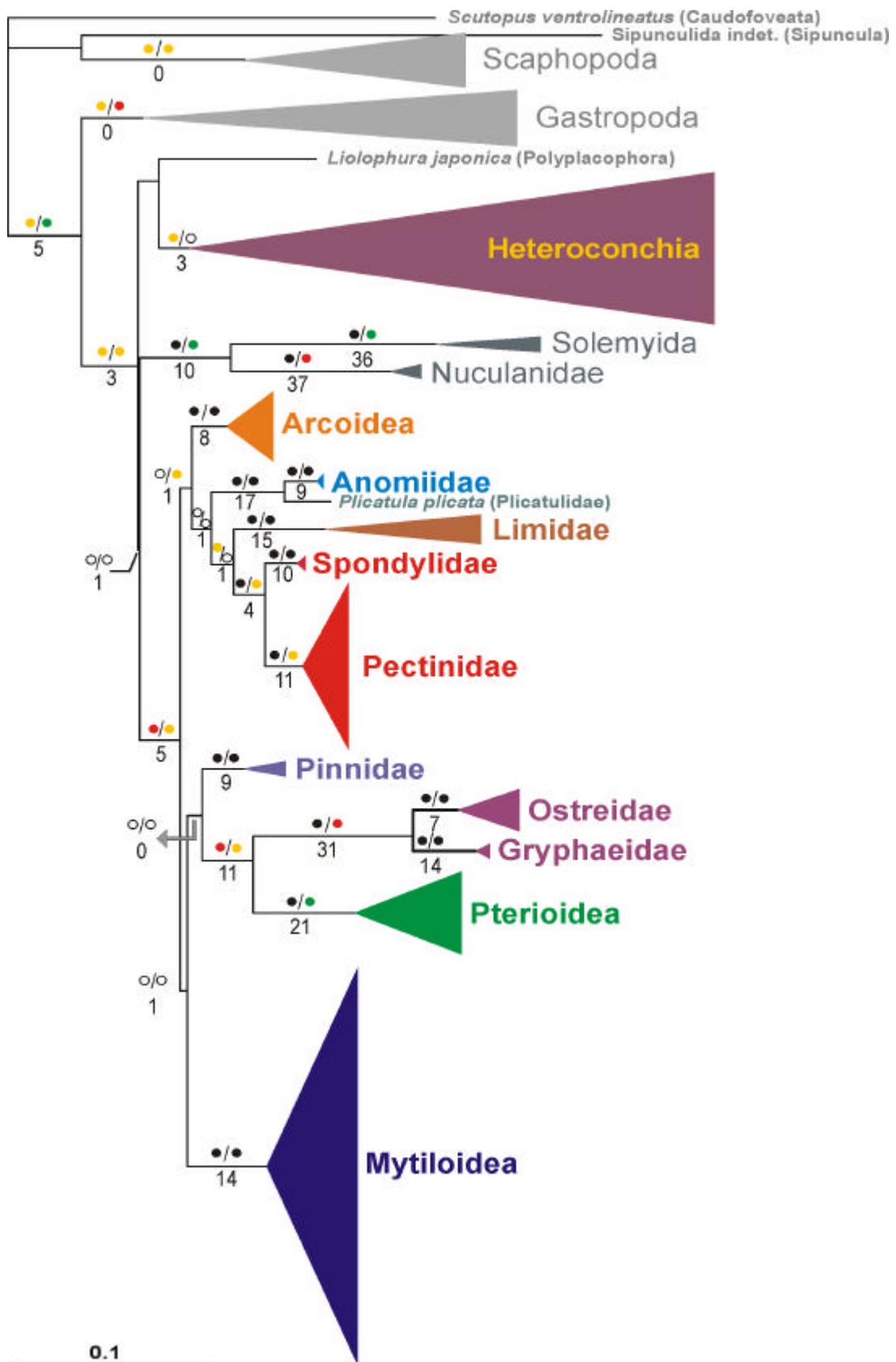


Abb. 24a: Maximum-Likelihood-Baum des 18S rDNA-Datensatzes mit den berechneten Indizes Bootstrap (%), Puzzle (%) und Decay- (= Bremer-) Index aus der Parsimonie-Analyse (Farbkodierung siehe Kapitel V.2.2.). Zum besseren Überblick sind die Großgruppen grafisch zusammengefaßt, wobei die Größe der Dreiecke die Anzahl der Taxa und die jeweiligen Astlängen repräsentiert. Die Details zeigt der ML-Baum in Abb. 24b und 25.



III.1.3. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha

Arcoidea

In beiden Analysen ist *Arca noae* (Arcidae) das basale Taxon der Arcoidea, jedoch sind die Arcidae nicht monophyletisch. Im Gegenteil, die beiden Arcidae, *Acar plicata* und *Barbatia virescens*, bilden zusammen mit *Striarca lactea* (Noetiidae) eine Polytomie (Abb. 23). Der „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse (Abb. 23) zeigt eine paraphyletische Situation für die Arcidae im Verhältnis zu *Striarca lactea* (Noetiidae) und den beiden Glycimerididae; im ML-Baum (Abb. 25) hingegen sind diese beiden Familien innerhalb der Arcidae positioniert, und die Astlängen lassen nicht unbedingt auf die oben erwähnte Polytomie schließen. Die basale Stellung von *Arca noae* hat mit 8 den höchsten Bremer-Index im Vergleich zu den übrigen internen Ästen der Arcoidea.

Pectinoidea (Spondylidae und Pectinidae)

Die beiden Spondylidae bilden eine gut unterstützte Schwesterngruppe zu den Pectinidae, jedoch sind die Bremer-Indizes innerhalb der Pectinidae mit Werten von 1 und 2 sehr niedrig. Die Topologie des „strict consensus“-Baumes der Parsimonie-Analyse ist mit jener des ML-Baumes durchaus vergleichbar. An der Basis des Astes der Pectinidae steht *Placopecten magellanicus* und am Ende die beiden Vertreter des Genus *Argopecten*. Die Anordnung der 10 übrigen von den 13 untersuchten Pectinidae ist im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse durch Polytomien gekennzeichnet und somit nicht vollständig aufgelöst (Bootstrap-Werte von 47, 50 und maximal 84%); diese Situation spiegelt sich auch in den sehr kurzen Astlängen des ML-Baumes wider.

Ostreoidea (Gryphaeidae und Ostreidae)

Das Schwesterngruppenverhältnis der Gryphaeidae und Ostreidae ist mit hohen Indizes (100/87/31) sehr gut unterstützt, obwohl der Bremer-Index für die Ostreidae mit 7 relativ niedrig ist. Dies drückt sich sowohl in der Polytomie der untersuchten Ostreidae (Ostreinae, Lophinae, Crassostreinae) im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse, wie auch in den kurzen Astlängen des ML-Baumes, aus.

Pterioidea

Keine der drei hier untersuchten Familien der Pterioidea (Pteriidae, Isognomonidae oder Malleidae) ist monophyletisch. Im ML-Baum bildet das Genus *Pteria* eine paraphyletische Ausgangsgruppe der Pterioidea, im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse hingegen bilden *Pteria hirundo* (Pteriidae) und *Malvifundus regulatus* (Malleidae) eine Polytomie. *Electroma alacorvi* (Pteriidae) und *Vulsella* sp. (Malleidae) bilden zusammen die Schwesterngruppe zu *Pinctada margaritifera* (Pteriidae). *Malvifundus regulatus* ist zwischen den beiden *Pteria*-Arten und dem einzigen Vertreter der Isognomonidae, *Isognomon legumen*, positioniert, wodurch sich die polyphyletische Situation für die Malleidae ergibt. Die Indizes innerhalb der Pterioidea sind mit Werten zwischen 64 und 79% (Bootstrap) bzw. 1 und 3 (Bremer-Index) relativ gering.

Mytiloidea

ML-Baum: Die Mytiloidea spalten sich sozusagen in zwei Clades auf. Die Lithophaginae stehen im ersten Clade basal zu den Mytilinae und Crenellinae, wobei letztere innerhalb der Mytilinae als



Schwesterngruppe zu *Septifer bilocularis* (Mytilinae) stehen. Die zweite Gruppe der Mytiloidea bilden die Modiolinae und Bathymodiolinae. Bei folgenden Taxa sind sehr kurze Astlängen festzustellen: a) Genus *Bathymodiolus* (inklusive *Tamu fisheri*) innerhalb der Bathymodiolinae; b) Genus *Brachidontes* (inklusive *Hormomya domingensis*) und c) Genus *Mytilus* innerhalb der Mytilinae. „Strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse: Die Modiolinae und Bathymodiolinae stehen ancestral zu der Gruppe (Lithophaginae, Mytilinae), wobei die Crenellinae am Ende der Mytilinae als Schwesterngruppe zu *Septifer bilocularis* positioniert sind. Die Modiolinae sind mit Indizes von 100/94/7, die Bathymodiolinae mit 95/75/4 und die Lithophaginae mit 98/89/5 gut unterstützt. Die (Mytilinae, Crenellinae)-Gruppe hingegen hat nur eine Unterstützung von 39/12/1. Folgende Polytomien konnten nicht aufgelöst werden: a) Genus *Bathymodiolus* (inklusive *Tamu fisheri*) innerhalb der Bathymodiolinae; b) Genus *Brachidontes* (inklusive *Hormomya domingensis*) und c) Genus *Mytilus* innerhalb der Mytilinae.

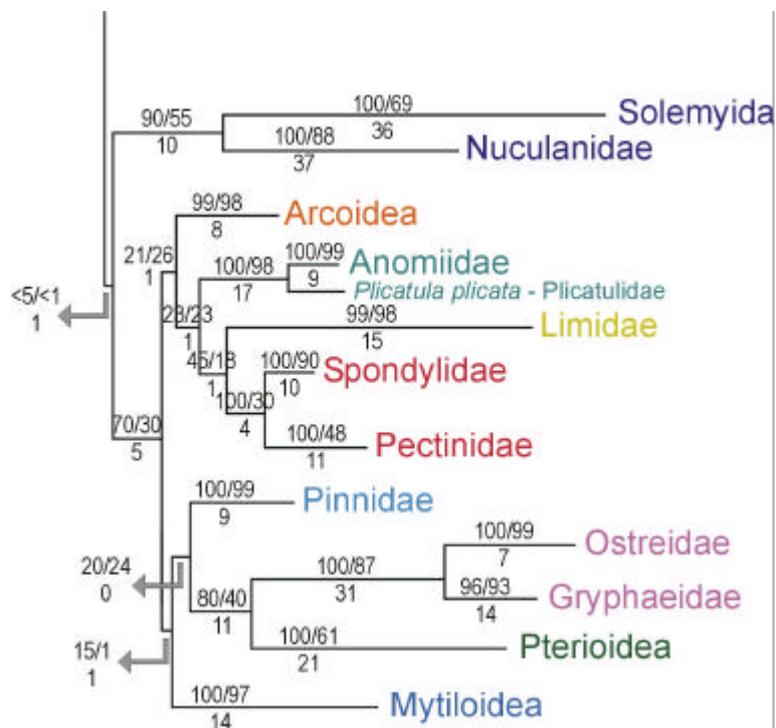
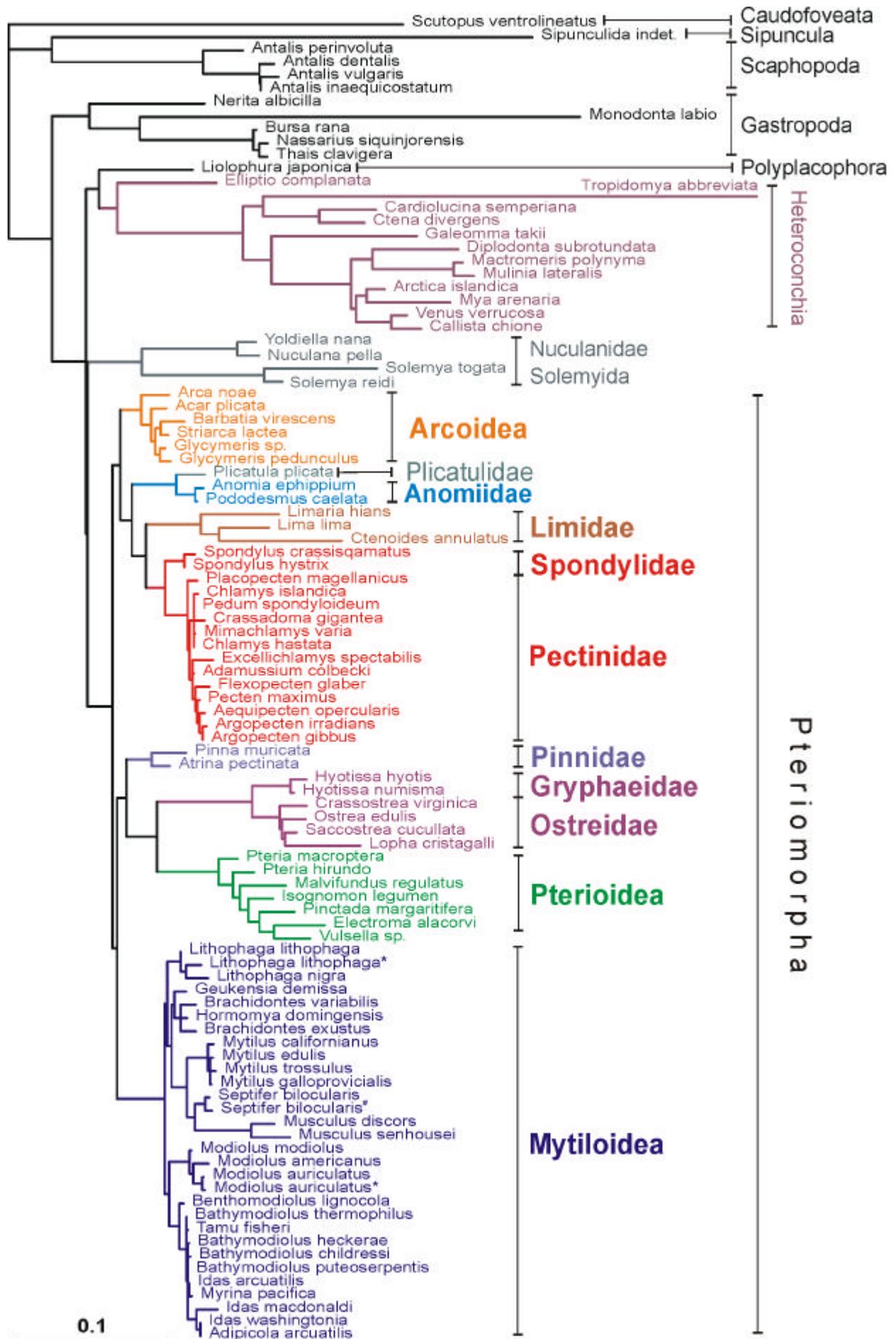


Abb. 24b: Detailansicht des Maximum-Likelihood-Baumes aus Abb. 24a für die Pteriomorpha. Mit den berechneten Indizes Bootstrap (%), Puzzle (%) und Decay- (= Bremer-) Index.

Abb. 25 (Seite 67): Maximum-Likelihood-Baum des 18S rDNA-Datensatzes ohne Angabe der berechneten Indizes. * Distel 2000; # Campbell 2000.





III.2. 28S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia

III.2.1. Erhaltene 28S rDNA-Sequenzen

Von den insgesamt 44 untersuchten Taxa konnten von 33 Proben die Sequenzen der Domänen I-III der 28S rDNA ermittelt werden, welche bereits in den DDBJ-, EMBL- und GenBank-Daten-banken hinterlegt wurden, aber noch nicht für die Öffentlichkeit zugänglich sind. Die dafür vergebenen Zugriffsnummern (Accession Numbers) sind in Kapitel II.4.2.2. (Tab. 6) und Kapitel V.2.5. (Tab. 13) angeführt. Die Länge des sequenzierten Abschnittes der 28S rDNA²²⁾ der untersuchten Taxa umfaßt einen Bereich von 1088 Basenpaaren (*Pedum spondyloideum*, Pectinidae, Pteriomorpha) bis zu 1239 Basenpaaren (*Ctenoides annulatus*, Limidae, Pteriomorpha). In Tabelle 9 sind alle untersuchten Taxa mit der jeweils erhaltenen Länge der 28S rDNA-Sequenz aufgeführt. Das Programm CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) wurde verwendet, um die erhaltenen 28S rDNA-Sequenzen mit bereits publizierten Sequenzen zu alignieren, wobei manuelle Korrekturen durchgeführt wurden, sofern Informationen bezüglich der Sekundärstruktur vorlagen. Nahezu alle 28S rDNA-Sequenzen von Bivalven, die in den Datenbanken DDBJ, EMBL und GenBank hinterlegt sind, wurden in das Sequenzalignment miteinbezogen, um eine möglichst umfangreiche taxonomische Representation von Arten der Ordnung Pteriomorpha zu erzielen (Lecointre et al. 1993).

Art	Länge in bp	Art	Länge in bp
<i>Acar plicata</i>	1138	<i>Malvifundus regulatus</i>	1140
<i>Aequipecten opercularis</i>	1142	<i>Mimachlamys varia</i>	1145
<i>Anomia ephippium</i>	1138	<i>Modiolus auriculatus</i>	1141
<i>Arca noae</i>	1155	<i>Nuculana pella</i>	1144
<i>Atrina pectinata</i>	1157	<i>Pedum spondyloideum</i>	1088
<i>Brachidontes variabilis</i>	1138	<i>Pinna muricata</i>	1156
<i>Ctena divergens</i>	1145	<i>Plicatula plicata</i>	1165
<i>Ctenoides annulatus</i>	1239	<i>Pododesmus caelata</i>	1136
<i>Dimyaria maoria</i>	1166	<i>Pteria macroptera</i>	1148
<i>Diplodonta cf. subrotundata</i>	1184	<i>Pulvinites exempla</i>	1148
<i>Electroma alacorvi</i>	1144	<i>Saccostrea cucullata</i>	1186
<i>Exellichlamys spectabilis</i>	1145	<i>Septifer cf. bilocularis</i>	1161
<i>Flexopecten glaber</i>	1144	<i>Solemya togata</i>	1151
<i>Glycymeris pedunculus</i>	1139	<i>Spondylus crassisquamatus</i>	1161
<i>Gregariella coarctata</i>	1171	<i>Spondylus hystrix</i>	1158
<i>Isognomon legumen</i>	1148	<i>Vulsella sp.</i>	1101
<i>Lima lima</i>	1201		

Tabelle 9: Auflistung jener Taxa, deren 28S rDNA im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurde mit der Länge der erhaltenen Sequenz. Bp Basenpaare.

²²⁾ Die Domänen I-III befinden sich am „Anfang“ der 28S rDNA (= 5'-Ende).



Jenes Alignment, das für die phylogenetische Analyse verwendet wurde, bestand aus 1021 Merkmalen (= Nukleotide, Basenpaare), von welchen 422 konstant waren; 155 variable Merkmale waren nicht informativ; 444 Merkmale waren informativ. Im Kapitel IV.1. wird eine Re-Analyse des 28S rDNA-Datensatzes präsentiert, die mit dem aktualisierten Datensatz aus Kapitel V.2.4. durchgeführt wurde und zusammen mit den hier dargestellten Ergebnissen diskutiert wird.

III.2.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha

Die Parsimonie-Analyse (heuristische Suche) mit dem Programm PAUP* ergab 2 MPT („most parsimonious trees“ = sparsamste Bäume), wobei *Solemy togata* und *Nuculara pella* (beide Protobranchia) als Außengruppe dienten. Der „strict consensus“-Baum (Länge = 1936 Schritte) der Parsimonie-Analyse wurde als Ausgangsbaum für die Berechnung der Maximum-Likelihood-Parameter (PAUP*, fastDNAmI) mit anschließendem „branch swapping“ herangezogen. Der finale ML-Baum (Abb. 26 und 27) weist einen $-\ln$ likelihood-Wert von 11737,18953 auf. Die Transitions/ Transversions-Rate beträgt 1,3921 ($\kappa = 2,84433$) und der Gamma-Shape-Parameter $\alpha = 0,5241$. Der Consistency-Index CI hat einen Wert von 0,45 und der Rescaled-Consistency-Index (RC) = 0,30, wodurch der Homoplasie-Index (HI) 0,55 beträgt. Für die Beurteilung der Robustheit der Äste bzw. der Knoten der ermittelten Bäume wurden folgende Indizes berechnet (Abb. 26 und 27): Bootstrap-Werte (PAUP*), Bremer- oder Decay-Index (Bremer 1988, 1994), sowie Puzzle-Index (PUZZLE 4.0).

Der „strict consensus“-Baum (Abb. 26), sowie der ML-Baum (Abb. 27) zeigen auch bei dieser Analyse, daß die Pteriomorpha und deren Familiengruppen solide unterstützt sind. Die Indizes für den gesamten Ast der Pteriomorpha betragen 53% (Bootstrap), 85% (Puzzle), der Bremer-Index beträgt allerdings nur 2. Im ML-Baum stehen die Mytiloidea an der Basis des Astes der Pteriomorpha und sind mit Werten von 100% (Bootstrap), 55% (Puzzle), sowie 11 (Bremer-Index) sehr robust unterstützt. Die übrigen Familiengruppen der Pteriomorpha bilden zwar einen eigenen Clade, dessen basaler Knoten mit einem Bremer-Index von 2 allerdings sehr schwach unterstützt ist. Innerhalb dieser Gruppierung ist eine Aufspaltung in zwei Linien erkennbar. Die Limidae sind die Schwesterngruppe zu den Pectinoidea und bilden zusammen mit der Gruppierung (Plicatulidae (Dimyidae, Anomioidea)) den einen Clade, demgegenüber die Arcoidea die basale Schwesterngruppe zu (Ostreoidea (Pinnidae, Pterioidea)) darstellen. Die basalen Knoten dieser beiden Linien sind ebenfalls nicht sehr gut unterstützt, da im ersten Fall die Bootstrap- und Puzzle-Werte unter 50% und der Bremer-Index bei 4 liegen; für den zweiten Clade beträgt der Bremer-Index sogar 0 und der Bootstrap-Wert ist niedriger als 25%. Diese Situation spiegelt sich auch im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse wider, denn alle Familiengruppen bilden eine Polytomie, da jene Äste, deren Unterstützung unter 50% liegt, kollabiert wurden. Sowohl im „strict consensus“-Baum als auch im ML-Baum weisen bei den Familiengruppen der Pteriomorpha die Mytiloidea und Pterioidea sowie die Limidae und die Pectinoidea mit 11 und 14 bzw. 9 die niedrigsten Bremer-Indizes auf; im Vergleich dazu sind die Anomioidea (plus Plicatulidae), die Arcoidea und die Ostreoidea mit Bremer-Indizes von 20, 24 und 50 äußerst robust unterstützt.

Mytiloidea

Sowohl im „strict consensus“-Baum als auch im ML-Baum steht *Modiolus auriculatus* (Modiolinae) an



der Basis der Mytiloidea, gefolgt von den drei Vertretern der Mytilinae. Das Schwesterngruppenverhältnis von *Brachidontes variabilis* (Mytilinae) zu den beiden anderen Mytilinae ist schlechter unterstützt als das Schwesterngruppenverhältnis zwischen denselbigen (Bremer-Indizes 5 bzw. 7). Die systematische Zuordnung von *Gregariella coarctata* zu den Mytilinae konnte bestätigt werden.

Anomioidea (plus Plicatulidae)

Die Gruppierung (Plicatulidae (Anomiidae, Dimyidae)) ist in beiden Bäumen (Abb. 26 und 27) mit einem Bremer-Index von 20 (100% – Bootstrap, 74% – Puzzle) gut unterstützt. *Plicatula plicata* (Plicatulidae) steht in in einem basalen Schwesterngruppenverhältnis zu den monophyletischen Anomiidae. Dieser Knoten ist mit einem Bootstrap-Wert von 83% (Puzzle-Index ist 78%) und mit einem Bremer-Index von 5 durchaus solide abgesichert.

Pectinoidea (Spondylidae und Pectinidae)

Spondylus crassisquamatus (Spondylidae) steht an der Basis der Pectinoidea und die Monophylie der Pectinidae ist mit sehr hohen Bootstrap-Werten (100%, Puzzle-Index ist 90%) und überzeugenden Bremer-Indizes im Bereich von 10, 14 und 29 sehr robust.

Arcoidea

Glycymeris pedunculus (Glycymerididae) steht im ML-Baum an der Basis der Arcoidea. Die Arcidae sind monophyletisch, aber das Schwesterngruppenverhältnis zwischen den beiden Vertretern der Arcoidea und *Glycymeris pedunculus* ist nur sehr schwach unterstützt (<50% – Bootstrap, <90% – Puzzle, 0 – Bremer-Index). Die Topologie des „strict consensus“-Baumes löst die intra-familiären Beziehungen der Arcoidea nicht auf, da eine Polytomie vorhanden ist.

Ostreoidea (Gryphaeidae und Ostreidae)

Die hohe Unterstützung für die Familiengruppe der Ostreoidea setzt sich auch bei der Höhe der Bremer-Indizes für das Schwesterngruppenverhältnis zwischen Gryphaeidae und Ostreidae mit 38 bzw. 18 fort. Innerhalb der Ostreidae sind in beiden Bäumen die Crassostreinae monophyletisch und die Ostreinae und die Lophinae sind Schwesterngruppen.

Pterioidea (plus Pinnidae)

Atrina pectinata, die einzige Vertreterin der Pinnidae in diesem Datensatz (vgl. dazu Kapitel IV.1.), steht im ML-Baum an der Basis der Pterioidea, jedoch ist die Unterstützung mit Werten von <24% (Bootstrap), <70% (Puzzle) und einem Bremer-Index von 0 nicht sehr robust, was sich auch in der Polytomie von *Atrina pectinata* im „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse zeigt. *Electroma alacorvi* (Pteriidae) steht an der Basis der Pterioidea, gefolgt von den drei übrigen Pteriidae, sowie *Malvifundus regulatus* (Malleidae) und den beiden Vertretern der Isognomonidae. Im „strict consensus“-Baum ist das Verhältnis zwischen *Pinctada radiata* (Pteriidae) und *Malvifundus regulatus* (Malleidae) nicht aufgelöst. Sehr interessant ist das in beiden Fällen überaus gut unterstützte Schwesterngruppenverhältnis zwischen den beiden Pteriidae, *Pulvinites exempla* und *Pteria macroptera*. Vergleichbare Bremer-Indizes in dieser Höhe (26) wurde nur bei den Pectinidae (29), den Gryphaeidae (38) oder den Arcoidea (24) gefunden. Die systematische Zuordnung von *Pulvinites exempla* zu den Pteriidae konnte bestätigt werden.

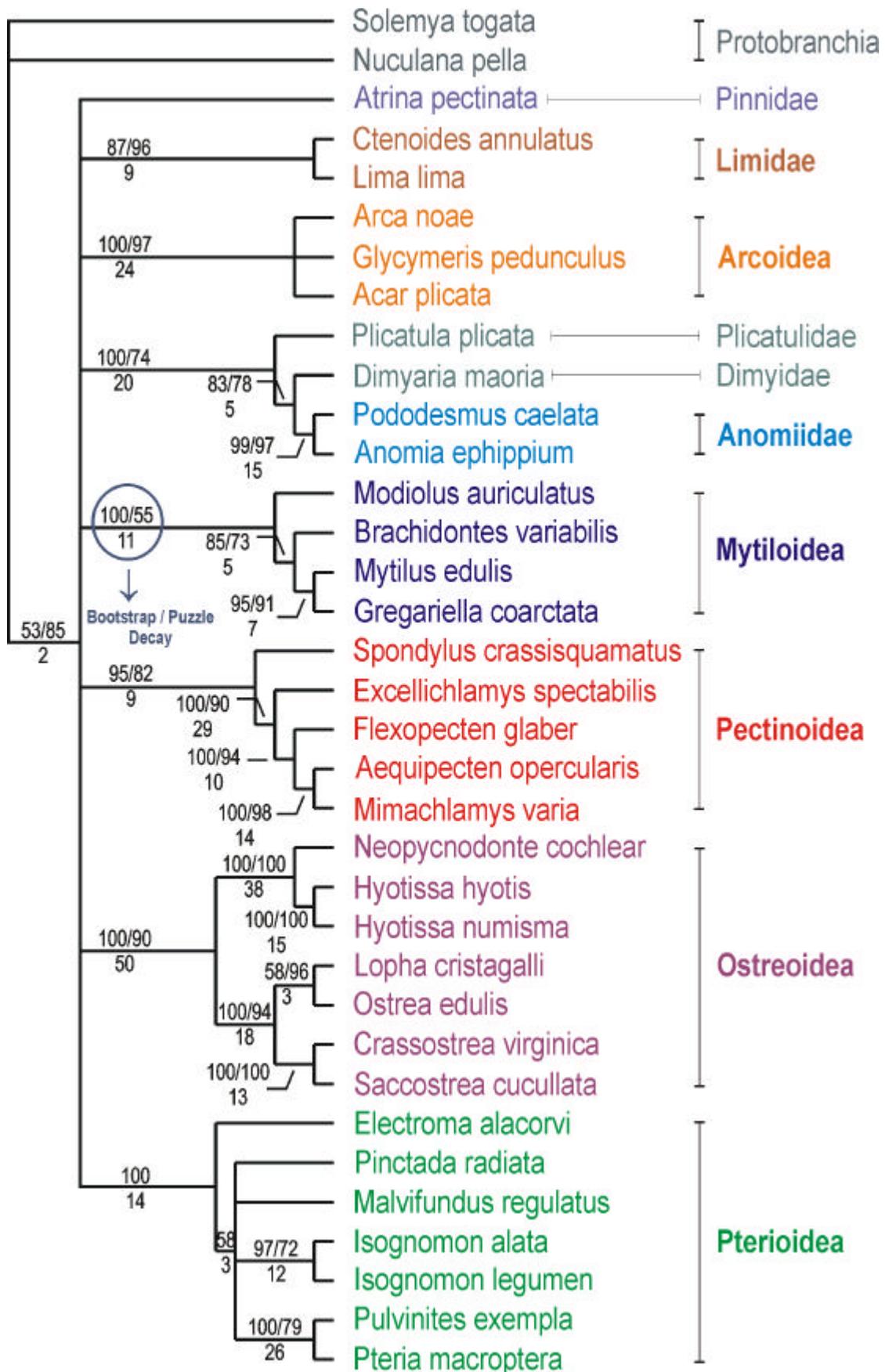


Abb. 26: „Strict Consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse des 28S rDNA-Datensatzes mit den berechneten Indizes Bootstrap (%), Puzzle (%) und Decay- (= Bremer-) Index. MPT = 2, L = 1936, CI = 0,45, RC = 0,30.



III.3. 18S+28S rDNA-Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia

III.3.1. Erhaltene 18S- und 28S rDNA-Sequenzen

Von den insgesamt 44 untersuchten Taxa wurde von 29 Taxa sowohl die 18S- wie auch die 28S rDNA-Sequenzen ermittelt, welche bereits in den DDBJ-, EMBL- und GenBank-Datenbanken hinterlegt wurden. Die dafür vergebenen Zugriffsnummern (Accession Numbers) sind in Kapitel V.2.5. (Tab. 13) angeführt. Die Länge der 18S+28S rDNA von den untersuchten Taxa umfaßt einen Bereich von 2684 Basenpaaren (*Solemya togata*, Protobranchia) bis zu 2985 Basenpaaren (*Ctenoides annulatus*, Pteriomorpha). In Tabelle 10 sind alle untersuchten Taxa mit der jeweils erhaltenen Länge der 18+28S rDNA-Sequenz aufgeführt. Für die phylogenetische Analyse wurden 32 Taxa ausgewählt, die im Kapitel II.4.2.3. (Tab. 7) aufgeführt sind, wobei 22 Taxa aus der vorliegenden Arbeit stammen. Die übrigen 10 der 18S+28S rDNA-Sequenzen wurden den Datenbanken DDBJ, EMBL und GenBank entnommen. Für die phylogenetische Analyse der ausgewählten Taxa wurden die beiden Sequenz-Alignments aus der 18S und 28S rDNA-Analyse kombiniert, wobei jene Lücken manuell entfernt wurden, die aufgrund des notwendigen Eliminierens von zahlreichen Taxa entstanden waren.

Jenes Alignment, das für die phylogenetische Analyse verwendet wurde, bestand aus 3121 Merkmalen (= Nukleotide, Basenpaare), von welchen 1988 konstant waren; 385 variable Merkmale waren nicht informativ, 748 Merkmale waren informativ.

Art	Länge in bp	Art	Länge in bp
<i>Acar plicata</i>	2876	<i>Modiolus auriculatus</i>	2876
<i>Aequipecten opercularis</i>	2862	<i>Nuculana pella</i>	2885
<i>Anomia ehippium</i>	2800	<i>Pedum spondyloideum</i>	2824
<i>Brachidontes variabilis</i>	2873	<i>Pinna muricata</i>	2892
<i>Ctena divergens</i>	2883	<i>Plicatula plicata</i>	2900
<i>Ctenoides annulatus</i>	2985	<i>Pododesmus caelata</i>	2871
<i>Diplodonta cf. subrotundata</i>	2956	<i>Pteria macroptera</i>	2896
<i>Electroma alacorvi</i>	2889	<i>Pulvinites exempla</i>	2055 ^{‡)}
<i>Exellichlamys spectabilis</i>	2883	<i>Saccostrea cucullata</i>	2898
<i>Flexopecten glaber</i>	2798	<i>Septifer cf. bilocularis</i>	2898
<i>Glycymeris pedunculus</i>	2820	<i>Solemya togata</i>	2684
<i>Gregariella coarctata</i>	2023 ^{‡)}	<i>Spondylus crassisquamatus</i>	2900
<i>Isognomon legumen</i>	2866	<i>Spondylus hystrix</i>	2893
<i>Lima lima</i>	2843	<i>Vulsella sp.</i>	2851
<i>Malvifundus regulatus</i>	2862		

Tabelle 10: Auflistung jener Taxa, deren 18S und 28 rDNA im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurde mit der Länge der erhaltenen Sequenz. Bp Basenpaare. ^{‡)} 50% der 18S rDNA beginnend vom 5'-Ende sequenziert.



III.3.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha

Die Parsimonie-Analyse (heuristische Suche) mit dem Programm PAUP* ergab 1 MPT („most parsimonious tree“ = sparsamsten Baum), wobei *Solemya togata* und *Nucularana pella* (beide Protobranchia) als Außengruppe dienten. Der MPT (Länge = 1330 Schritte) der Parsimonie-Analyse wurde als Ausgangsbaum für die Berechnung der Maximum-Likelihood-Parameter (PAUP*, fastDNAmI) mit anschließendem „branch swapping“ herangezogen. Der finale ML-Baum (Abb. 28 und 29) weist einen $-\ln$ likelihood-Wert von 20881,42523 auf. Die Transitions/ Transversions-Rate beträgt 1,223362 ($\kappa = 2,445764$) und der Gamma-Shape-Parameter $\alpha = 0,238411$. Der Consistency-Index CI hat einen Wert von 0,46 und der Rescaled-Consistency-Index (RC) = 0,30, wodurch der Homoplasie-Index (HI) 0,54 beträgt. Für die Beurteilung der Robustheit der Äste bzw. der Knoten der ermittelten Bäume wurden folgende Indizes berechnet (Abb. 28 und 29): Bootstrap-Werte (PAUP*), Bremer- oder Decay-Index (Bremer 1988, 1994), sowie Puzzle-Index (PUZZLE 4.0).

Der MPT der Parsimonie-Analyse (Abb. 28) und der ML-Baum (Abb. 29) zeigen auch bei dieser Analyse, daß die Pteriomorpha im Allgemeinen und deren Familiengruppen im Speziellen recht solide unterstützt sind, wobei die Werte hier generell höher sind als bei den Analysen der 18S oder 28S rDNA (vgl. Abb. 24a, b; 26 und 27). Die Indizes für den gesamten Ast der Pteriomorpha betragen 99% (Bootstrap), 68% (Puzzle) und der Bremer-Index ist 27. Die Mytiloidea stehen an der Basis des Astes der Pteriomorpha und sind mit Werten von 100% (Bootstrap), 61% (Puzzle) sowie 31 (Bremer-Index) äußerst robust unterstützt. Die übrigen Familiengruppen der Pteriomorpha bilden einen eigenen Clade, dessen basaler Knoten allerdings etwas schwächer unterstützt ist (76% – Bootstrap, <50% – Puzzle, 10 – Bremer-Index). Innerhalb dieser Gruppierung ist eine Aufspaltung in zwei Linien erkennbar. Die Limidae haben ein Schwesterngruppenverhältnis zu den Pectinoidea und bilden zusammen mit der Gruppierung (Plicatulidae, Anomiidae) den einen Clade, an dessen Basis die Arcoidea positioniert sind; demgegenüber bilden die Pinnidae die basale Schwesterngruppe zu (Ostreoidea, Pterioidea). Die basalen Knoten dieser beiden Linien sind nicht sehr gut unterstützt, denn im ersten Fall liegen die Indizes sogar nur bei <25% (Bootstrap) und 0 (Bremer-Index), aber für den zweiten Clade beträgt die Unterstützung knapp über 50% (54% – Bootstrap) und 9 (Bremer-Index). Hinsichtlich der Familiengruppen der Pteriomorpha weisen die Pectinoidea mit 14 den niedrigsten Bremer-Index auf; im Vergleich dazu sind die Mytiloidea, die Pterioidea sowie die Anomioidea (plus Plicatulidae) und die Arcoidea mit Bremer-Indizes von 31, 34, 39 und 40 äußerst robust unterstützt. Diese Werte werden sogar noch von den Limidae und den Ostreoidea übertroffen, da diese beiden Familiengruppen die höchsten Bootstrap-Werte, wie auch die höchsten Bremer-Indizes (57 bzw. 84) zeigen. Die beiden Analysen führen zu ähnlichen Topologien, wobei jedoch im MPT der Parsimonie-Analyse die Position der Gruppierung ((Plicatulidae, Anomiidae) Limidae, Pectinoidea) nicht zufriedenstellend aufgelöst ist.

Mytiloidea

Beiden Analysen ergaben, daß *Modiolus auriculatus* (Modiolinae) an der Basis der Mytiloidea steht, gefolgt von den drei Vertretern der Mytilinae. Das Schwesterngruppenverhältnis von *Brachidontes variabilis* (Mytilinae) zu den beiden anderen Mytilinae ist schlechter unterstützt als das



Schwesterngruppenverhältnis zwischen denselbigen (Bremer-Indizes 10 bzw. 12). Die systematische Zuordnung von *Gregariella coarctata* zu den Mytilinae konnte bestätigt werden.

Anomioidea (plus Plicatulidae)

Plicatula plicata (Plicatulidae) steht in beiden Fällen in einem basalen Schwesterngruppen-verhältnis zu den beiden Anomiidae. Dieser Knoten ist mit einem Bootstrap-Wert von 100% (99% – Puzzle) und mit einem Bremer-Index von 26 sehr robust abgesichert.

Pectinoidea (Spondylidae und Pectinidae)

Als Resultat von beiden Analysen steht *Spondylus crassisquamatus* (Spondylidae) an der Basis der Pectinoidea und die Monophylie der Pectinidae ist mit sehr hohen Bootstrap-Werten (100%; 93% – Puzzle) und einem überzeugenden Bremer-Indizes von 39 sehr gut unterstützt.

Arcoidea

Die Arcidae sind in keinem der beiden Bäume monophyletisch, da *Glycymeris pedunculus* (Glycymerididae) die Schwesterngruppe von *Acar plicata* (Arcidae) ist und die zweite Arcidae *Arca noae* an der Basis der Arcoidea positioniert ist. Das Schwesterngruppenverhältnis zwischen *Glycymeris pedunculus* und *Acar plicata* ist mit einem Bootstrap-Wert von 93% (64% – Puzzle) sowie einem Bremer-Index von 6 unterstützt.

Ostreoidea (Gryphaeidae und Ostreidae)

Die hohe Unterstützung für die Familiengruppe der Ostreoidea setzt sich auch bei der Höhe der Bremer-Indizes für das Schwesterngruppenverhältnis zwischen Gryphaeidae und Ostreidae mit 65 bzw. 30 fort. Beide Analysen zeigen, daß innerhalb der Ostreidae die Ostreinae und die Lophinae Schwesterngruppen sind, und die Monophylie der Crassostreinae ist eindeutig gegeben (100% – Bootstrap und Puzzle, sowie 25 – Bremer-Index).

Pterioidea (plus Pinnidae)

Atrina pectinata (Pinnidae) ist basal zu der Gruppierung (Ostreoidea, Pterioidea) positioniert (54% – Bootstrap, <50% – Puzzle und 9 – Bremer-Index). Auffallend ist das überaus gut unterstützte Schwesterngruppenverhältnis zwischen den beiden Pteriidae, *Pulvinites exempla* und *Pteria macroptera*, an der Basis der Pterioidea (18 – Bremer-Index); weiters sind *Isognomon legumen* (Isognomonidae) und *Malvifundus regulatus* (Malleidae) inmitten der Pteriidae positioniert, wodurch diese nicht monophyletisch sind. Generell ist festzuhalten, daß die Topologie innerhalb der Pterioidea in beiden Analysen stark divergierende Indizes der Unterstützung aufweist. Die systematische Zuordnung von *Pulvinites exempla* zu den Pteriidae konnte bestätigt werden.

Die Topologie des MPT der Parsimonie-Analyse ist mit jener des ML-Baumes nahezu kongruent, wodurch sich zeigt, daß die Kombination von beiden Genen grundsätzlich konsistentere Ergebnisse in der phylogenetischen Analyse liefert. Weiters zeigen die Indizes eine höhere Unterstützung der einzelnen Äste, wodurch die Familiengruppen der Pteriomorpha und deren Zusammensetzung sehr robust unterstützt sind, und die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha besser aufgelöst werden konnten als in der Analyse der solitären Gene.

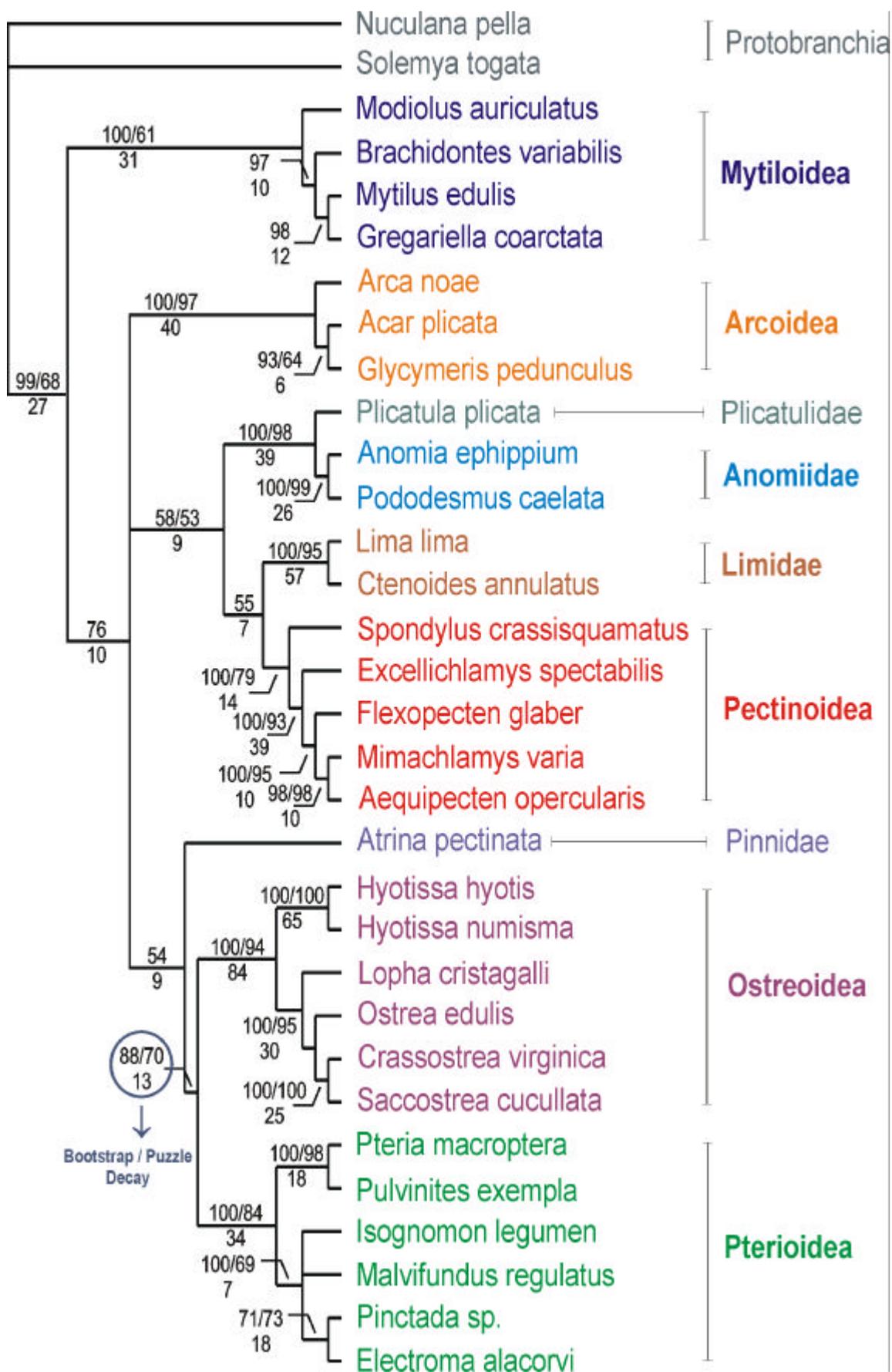


Abb. 28: MPT der Parsimonie-Analyse des 18S+28S rDNA-Datensatzes mit den berechneten Indizes Bootstrap (%), Puzzle (%) und Decay- (= Bremer-) Index. L = 3013, CI = 0,46, RC = 0,30.

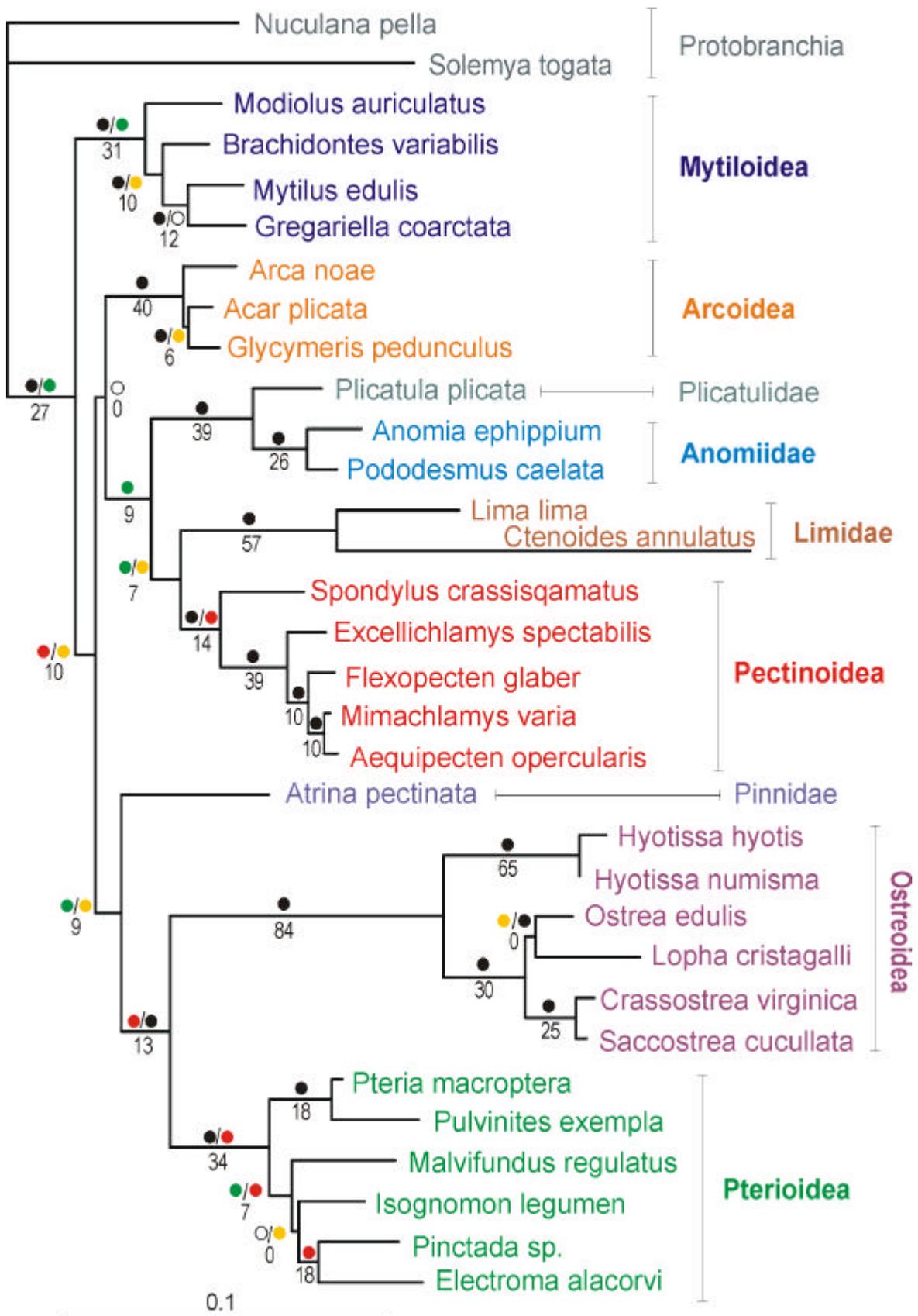


Abb. 29: Maximum-Likelihood-Baum des 18S+28S rDNA-Datensatzes mit den berechneten Indizes Bootstrap (%), Puzzle (%) und Decay- (= Bremer-) Index aus der Parsimonie-Analyse.



IV. DISKUSSION



IV.1. Phylogenie der Pteriomorpha	79
IV.1.1. Phylogenetische Beziehungen höherer Taxa	79
IV.1.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha	82
IV.2. Aussagekraft der molekularen Daten	85
IV.2.1. Sequenzalignments	85
IV.2.2. Transition/Transversionsraten	86
IV.2.3. Substitutionsraten	87
IV.3. Kongruenz zwischen morphologischen und molekularen Daten	89



IV.1. Phylogenie der Pteriomorpha

IV.1.1. Phylogenetische Beziehungen höherer Taxa

Das Auftreten paralleler Evolution von morphologischen Merkmalen in verschiedenen phylogenetischen Linien der Bivalvia wurde bereits vielfach beschrieben (Steiner & Müller 1996 und dort zitierte Arbeiten) und betrifft z.B. folgende Strukturen: die Mantelverwachsung, die Ausbildung der Siphone sowie die Analogien bei den Schloßzähnen und die Organisation des Magens. Phylogenetische Analysen der höheren taxonomischen Ebenen stehen u.a. unter dem Einfluß eines hohen Ausmaßes an Homoplasie (= Analogie, Parallelität). Das Auftreten von möglichen adaptive Radiationen zeigt sich z.B. in den geringen Unterstützungen gerade jener Knoten, die Arten mit ähnlichen Substitutionsraten verbinden.

Die meisten Phylogenien, beruhend auf morphologischen Merkmalen, unterstützen die Monophylie der Bivalvia, wogegen verschiedene phylogenetischen Analysen von molekularen Daten (z.B. 18S rDNA) für einen diphyletischen Ursprung dieser Klasse der Mollusca sprechen (Kenchington et al. 1994; Steiner & Müller 1996; Winnepeninckx et al. 1996; Adamkewicz et al. 1997; Campbell et al. 1998). Ein Grund könnte die beschränkte Anzahl von Vertretern anderer Klassen der Mollusca sein, die für Analysen zur Verfügung steht. Dies betrifft vor allem die Klassen der Aculifera, die Klassen Monoplacophora und Cephalopoda der Conchifera, aber auch Unterklassen der Bivalvia, wie z.B. die Protobranchia. Weiters sind jene Datensätze, die größere taxonomische Lücken beinhalten, im Allgemeinen sehr anfällig für die Ausbildung von verhältnismäßig großen Astlängen in den Phylogenien (sogenannter „long branch attraction“-Effekt, vgl. Abb. 25: Sipunculida indet., *Tropidomya abbreviata*).

Falls nun die Bivalvia, so wie in Waller (1998) vorgeschlagen, tatsächlich relativ entfernt zu den anderen Klassen der Conchifera sind, so verschleiern die großen Astlängen jene Radiationen innerhalb der Mollusken, die im frühen Kambrium stattgefunden haben (Runnegar 1996). Daher ist nach wie vor unklar, welche Klasse der Mollusca die unmittelbare Schwesterngruppe zu den Bivalvia bildet. In der vorliegenden Arbeit weisen die Ergebnisse der Analyse des 18S rDNA-Datensatzes auf die Gastropoda oder die Polyplacophora als Schwesterngruppe zu der Gruppierung (Heteroconchia (Protobranchia, Pteriomorpha)) hin (Abb. 23 und 24a, b), nicht aber die Scaphopoda (vgl. Salvini-Plawen & Steiner 1996); allerdings ist die Klasse Polyplacophora mit nur einem Taxon im Vergleich zu den Gastropoda, die durch 5 Arten in der Analyse vertreten sind, deutlich unterrepräsentiert.

Steiner & Müller (1996) postulierten in ihrer Arbeit ein phylogenetisches Signal für die Monophylie der Bivalvia, das jedoch nicht in allen Analysen reproduziert werden konnte. In weiterer Folge zeigten die Analysen von Frischer et al. (1998) und Giribet & Carranza (1999) eine Monophylie für die Bivalvia. Steiner (1999) bewies, daß die Monophylie der Bivalvia bei Giribet & Carranza (1999) nur durch eine singuläre, nicht-homoplastische Position unterstützt ist. Ein gemeinsames Merkmal jener phylogenetischen Bäume, die die Bivalvia als Monophylum darstellen, ist die para- oder polyphyletische Situation der Pteriomorpha, da die Ostreidae ein Schwesterngruppenverhältnis zu den Heterodonta darstellen. Nur bei Frischer et al. (1998) bilden sowohl die Pteriomorpha als auch die Heterodonta



getrennte Äste, wobei die Ostreidae an der Basis des Astes der Pteriomorpha positioniert sind. Die Polyphyly der Bivalvia drückt sich durch den getrennten Ursprung der Pteriomorpha und der Heterodonta sowie durch die Position von *Solemya velum* (Protobranchia) in der Analyse von Adamkewicz et al. (1997) und Campbell et al. (1998) aus, denn überraschenderweise bildet *Solemya* ein Schwesterngruppenverhältnis zu den Gastropoda. Dieser Befund wurde jedoch sowohl in der Arbeit von Steiner & Hammer (2000) als auch in der hier vorliegenden Arbeit durch die Sequenzierung von *Solemya togata* widerlegt (vgl. Abb. 23 und 24a, b). Die Sequenz von *Solemya velum* aus Adamkewicz et al. (1997) muß als aberrant angenommen werden, denn möglicherweise wurde in diesem Fall irrtümlich eine nicht-aktive Genkopie der 18S rDNA sequenziert. Steiner & Müller (1996) vermuteten den Grund für die Polyphyly der Bivalvia in den unterschiedlichen Substitutionsraten der einzelnen Großgruppen. Der „Relative Rate Test“ (Abb. 32) zeigt, daß die Substitutionsraten der Pteriomorpha signifikant niedriger sind als jene der Gastropoda, Scaphopoda sowie der Protobranchia, und daß vor allem die hohen Substitutionsraten der Heteroconchia für diese Erklärung sprechen. Hinzu kommt, daß die Substitutionsraten innerhalb der Pteriomorpha sehr homogen sind (siehe Kapitel IV.2.1.).

Campbell (2000) verfolgte in seinen Analysen zwei unterschiedliche Ansätze. Er wertete die vorhandenen „Lücken“ („Gaps“) im Sequenzalignment entweder als fehlende Daten oder als fünften Merkmalszustand (zusätzlich zu den 4 Merkmalen der Basen G, A, T und C). Die Einführung von „Gaps“ in ein Sequenzalignment ist notwendig, um homologe Positionen trotz Längenunterschiede der Sequenzen zu alignieren. Mögliche Sekundärstrukturen – wie z.B. Schleifen („loops“), Haarnadeln („hairpins“) oder Stämme („stems“) – der ribosomalen RNA können für die Homologieentscheidungen als Kriterien herangezogen werden. Sie werden meist mit einem „-“ gekennzeichnet und ihre Bedeutung im Zusammenhang mit dem phylogenetischen Signal einer DNA- bzw. RNA-Sequenz ist immer wieder Gegenstand von Diskussionen (siehe Kapitel IV.2.1.).

Die Ergebnisse von Campbell (2000) waren nun wie folgt. Die erste Analyse (Gaps als fehlende Daten) resultierte in einer monophyletischen Situation für die Bivalvia, die jedoch durch geringe Unterstützung der Knoten gekennzeichnet war; die zweite Analyse (Gaps als fünfter Merkmalszustand) zeigte hingegen keine Monophylie für die Bivalvia in Relation zu den übrigen untersuchten Mollusken, jedoch ist in beiden Fällen die Monophylie der Protobranchia, Pteriomorpha, Heterodonta, Palaeoheterodonta und Anomalodesmata bestätigt.



Alle Analysen, die in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden, zeigen die Pteriomorpha als Monophylum; auch die Heteroconchia sind sowohl in der Parsimonie-Analyse (Abb. 23) wie auch in der Maximum-Likelihood-Analyse (Abb. 25) der 18S rDNA monophyletisch. Bei den Heteroconchia kann im Vergleich zu Adamkewicz et al. (1997) nur die basale Position von *Elliptio complanata* (Unionidae) bestätigt werden. Bezüglich der Position der Anomalodesmata ergibt sich jedoch ein Unterschied, da diese bei Adamkewicz et al. (1997) mit den beiden untersuchten Gastropoda zusammen auf einem Ast positioniert sind, hier aber ist *Tropidomya abbreviata* entweder innerhalb (Parsimonie-Analyse) oder an der Basis der Heterodonta (ML-Analyse) zu finden (Abb. 30). Die Linie der Heterodonta beginnt mit den Lucinidae gefolgt von den Galeommatidae, Ungulinidae und Mactridae, sowie den Arctidae, Myidae und Veneridae, und es ist zu beachten, daß die beiden Familien Lucinidae und Ungulinidae, die zu der Familiengruppe der Lucinoidea zählen, nicht auf dem selben Ast positioniert sind (Abb. 30). Diese taxonomisch ungewöhnliche Anordnung bestätigt einerseits die Befunde von McAlester (1966) und Morton (1996) hinsichtlich des zeitlichen Ursprungs der Lucinidae und Galeommatidae, und ist andererseits im Einklang mit Morton (1996), Salvini-Plawen & Steiner (1996) sowie Waller (1998) bezüglich der möglichen phylogenetischen Wurzeln der Anomalodesmata bei den Heterodonta. Abschließend ist noch festzuhalten, daß aufgrund der vorliegenden Resultate ein Schwesterngruppenverhältnis von den Pteriomorpha zu einer der Linien der Heteroconchia sehr unwahrscheinlich ist.

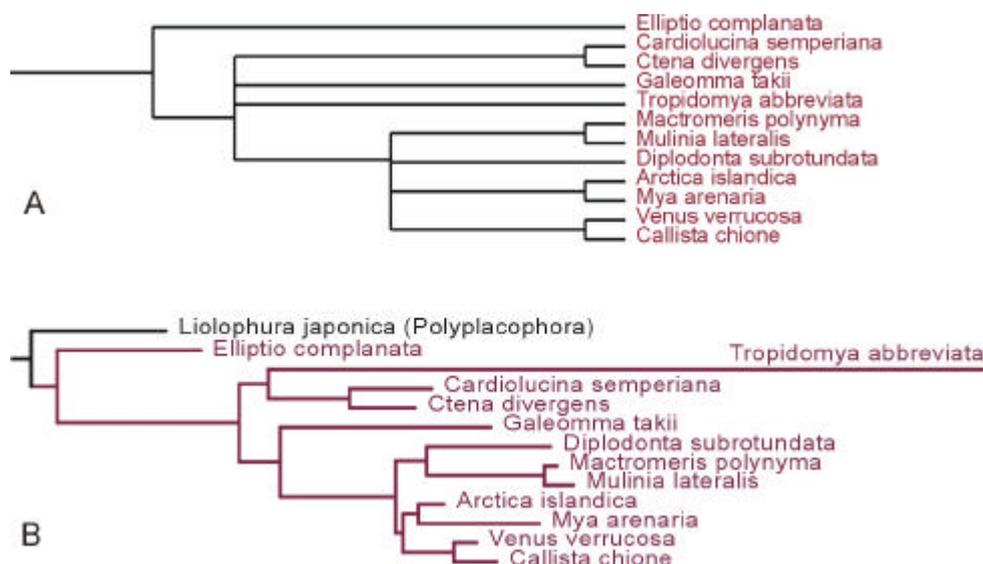


Abb. 30: Detailansicht für die Heteroconchia aus den Abbildungen 23 und 25; nähere Details siehe Kapitel III.1.2. und III.1.3. A „Strict Consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse des 18S rDNA-Datensatzes; B Maximum-Likelihood-Baum des 18S rDNA-Datensatzes.



IV.1.2. Phylogenetische Beziehungen innerhalb der Pteriomorpha

Die Monophylie sowohl der Pteriomorpha als auch der Heteroconchia ist in allen Analysen ähnlich robust unterstützt. Die Bremer-Indizes und die Astlängen sind sowohl bei der Analyse des 18S rDNA-Datensatzes wie auch bei der Analyse des 28S rDNA-Datensatzes annähernd gleich. Die Analyse des 18S+28S rDNA-Datensatzes in Kombination ergab eine deutliche höhere Unterstützung für die Heteroconchia, die allerdings nur durch zwei Vertreter der Protobranchia (*Nuculana pella* und *Solemya togata*) repräsentiert sind. Die Pteriomorpha sind ca. um einen Faktor 2 robuster unterstützt, obwohl auch in der kombinierten Analyse die basalen Knoten der Verzweigungen innerhalb der Pteriomorpha nicht so gut aufgelöst sind. Die Familiengruppen hingegen weisen auch hier sehr gute Indizes auf.

Zwei Hauptlinien sind in allen Analysen zu finden, auch wenn die Unterstützung mit Ausnahme der kombinierten Analyse nicht sehr groß ist. Die Gruppierung (Pinnoidea (Pterioidea + Ostreoidea)) ist in der 18S rDNA-Analyse am schwächsten unterstützt; in der Analyse des 28S rDNA-Datensatzes ist eine Unterstützung von <50% (Bootstrap), knapp über 50% (Puzzle) und 2 (Bremer-Index) gegeben, die kombinierte Analyse führte mit 54% zu einem besseren Bootstrap-Wert und der Bremer-Index erhöhte sich auf 9. In der 18S rDNA-Analyse von Campbell (2000) wurde diese Topologie bestätigt (Mytiloidea basal dazu), allerdings ebenfalls mit schwacher Unterstützung. Für die zweite Linie bestehend aus ((Anomioidea + Plicatuloidea), (Limoidea + Pectinoidea)) ergibt sich ein ähnliches Bild, obwohl in diesem Fall die Analyse der 28S rDNA die robusteste Topologie liefert. Die Position der Pinnoidea variiert zwischen den ermittelten Topologien sehr deutlich. In den Analysen der 18S rDNA und des 18S+28S rDNA-Datensatzes sind sie die Schwesterngruppe zu (Pterioidea + Ostreoidea), und in der Analyse der 28S rDNA bilden sie die Schwesterngruppe zu den Pterioidea. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen mögliche Rückschlüsse auf den Ursprung der Pinnoidea zu, der auf einen ähnlich Zeitrahmen wie jener der Arcoidea und Mytiloidea zurückgehen dürfte. In Campbell (2000) findet sich die Gruppierung (Arcoidea ((Anomioidea + Plicatuloidea), Pectinoidea)), die niedrige Indizes aufweist, wobei die Limoidea nicht vertreten sind.

Starobogatov (1992) vertritt das Konzept einer frühen Trennung der Pinnoidea zusammen mit den Pterioidea von den übrigen Großgruppen der Pteriomorpha, und von den unterschiedlichen Phylogenien beruhend auf morphologischen Merkmalen (Abb. 8 und 38) vertritt nur Carter (1990) einen nicht-monophyletischen Ursprung der Pinnoidea und Pterioidea. Die vorliegende Arbeit unterstützt keine der diskutierten Hypothesen zur Phylogenie der Pteriomorpha in vollem Umfang, denn für bestimmte Gruppierungen wurden abweichende Topologien gefunden (vgl. die Position der Limidae oder Pectinoidea). Da die hier verwendeten Taxonsätze von vielen Familien und Familiengruppen der Pteriomorpha oftmals nur einzelne (oder keine) Vertreter beinhalten, erlauben die Ergebnisse nur eine eingeschränkte Interpretation bezüglich der interfamiliären Beziehungen der Pteriomorpha. Manche Familiengruppen sind im Vergleich zu anderen sogar überrepräsentiert. So beinhaltet der 18S rDNA-Datensatz 30 Vertreter der Mytiloidea sowie 15 Pectinoidea im Gegensatz zu z.B. nur drei Limoidea oder zwei Pinnidae. In jedem Fall überrascht der Befund, daß die Arcidae und die Pteriidae als basale Familien ihrer jeweiligen Familiengruppe para- oder sogar polyphyletisch sind. Die Monophylie der



Malleidae (Pterioidea), repräsentiert durch *Malvifundus regulatus* und *Vulsella* sp., ist in der Analyse der 18S rDNA sowie der aktualisierten Analyse der 28S rDNA ebenfalls nicht gegeben (Abb. 31).

Die hohe Unterstützung des gemeinsamen Ursprungs der Gryphaeidae und der Ostreidae steht im Widerspruch mit den Befunden von Stenzel (1971) und Carter (1990). Die Auflösung innerhalb der Ostreidae ist mit der 18S rDNA nicht sehr gut. Auch die Analysen von 28S rDNA-Sequenzen bei Littlewood (1994) zeigen eine ähnlich schlechte Auflösung, was aber von Ó Foighil & Taylor (2000) widerlegt wird. Die Analyse des aktualisierten 28S rDNA-Datensatzes ergab bezüglich der Ostreidae im Allgemeinen sehr hohe Bootstrap-Werte (Abb. 31).

Die Reihenfolge der Familien innerhalb der Mytiloidea zeigt bei der 18S rDNA die Modiolinae und die Bathymodiolinae als basale Linie, gefolgt von den Lithophaginae und den Mytilinae und letztlich bilden die Crenellinae die Kronengruppe. Die 28S rDNA und die kombinierte Analyse positionieren den einzigen Vertreter der Modiolionae, *Modiolus auriculatus*, an der Basis zu den Mytilinae. In der 18S rDNA und in der kombinierten Analyse sind *Septifer bilocularis* und die Vertreter des Genus *Mytilus* deutlich getrennt von *Geukensia demissa* und *Brachidontes* spp. (beide Mytilinae), was im Gegensatz zu jüngst durchgeführten vergleichenden Analysen der Spermienmorphologie von Kafanov & Drozdov (1998) steht. Distel (2000) beschreibt für die Familien Crenellinae und Lithophaginae einen monophyletischen Ursprung, und für die Mytilinae und Modiolinae hingegen eine polyphyletische Situation. Diese Befunde decken sich bis auf die Polyphyly der Modiolinae mit jenen der 18S rDNA-Analyse der vorliegenden Arbeit, denn hier ist diese Familie der Mytiloidea monophyletisch.

Die in der 18S rDNA-Analyse ermittelte Topologie innerhalb der Pectinidae unterscheidet sich in einem entscheidenden Aspekt von jener in Frischer et al. (1998). *Crassadoma gigantea* und *Placopecten magellanicus* entspringen nicht der Gruppierung *Chlamys* spp. + *Mimachlamys varia*, vielmehr steht *Placopecten magellanicus* an der Basis der Pectinidae und das Genus *Chlamys* ist nicht monophyletisch. Die Verwendung von *Crassostrea* oder *Geukensia* als Außengruppe bei Frischer et al. (1998) könnte eine mögliche Erklärung für die Abweichungen zu der in dieser Arbeit ermittelten Topologie innerhalb der Pectinidae sein. Diese Ergebnisse bestätigen, daß bei der Analyse von molekulare Daten die richtige Wahl der Außengruppe von erheblicher Bedeutung ist. Um einen „long branch attraction“-Effekt der Außengruppe zu verhindern, sollten die Taxa der Außengruppe nicht zu weit entfernt verwandt sein (vgl. Swofford et al. 1996).

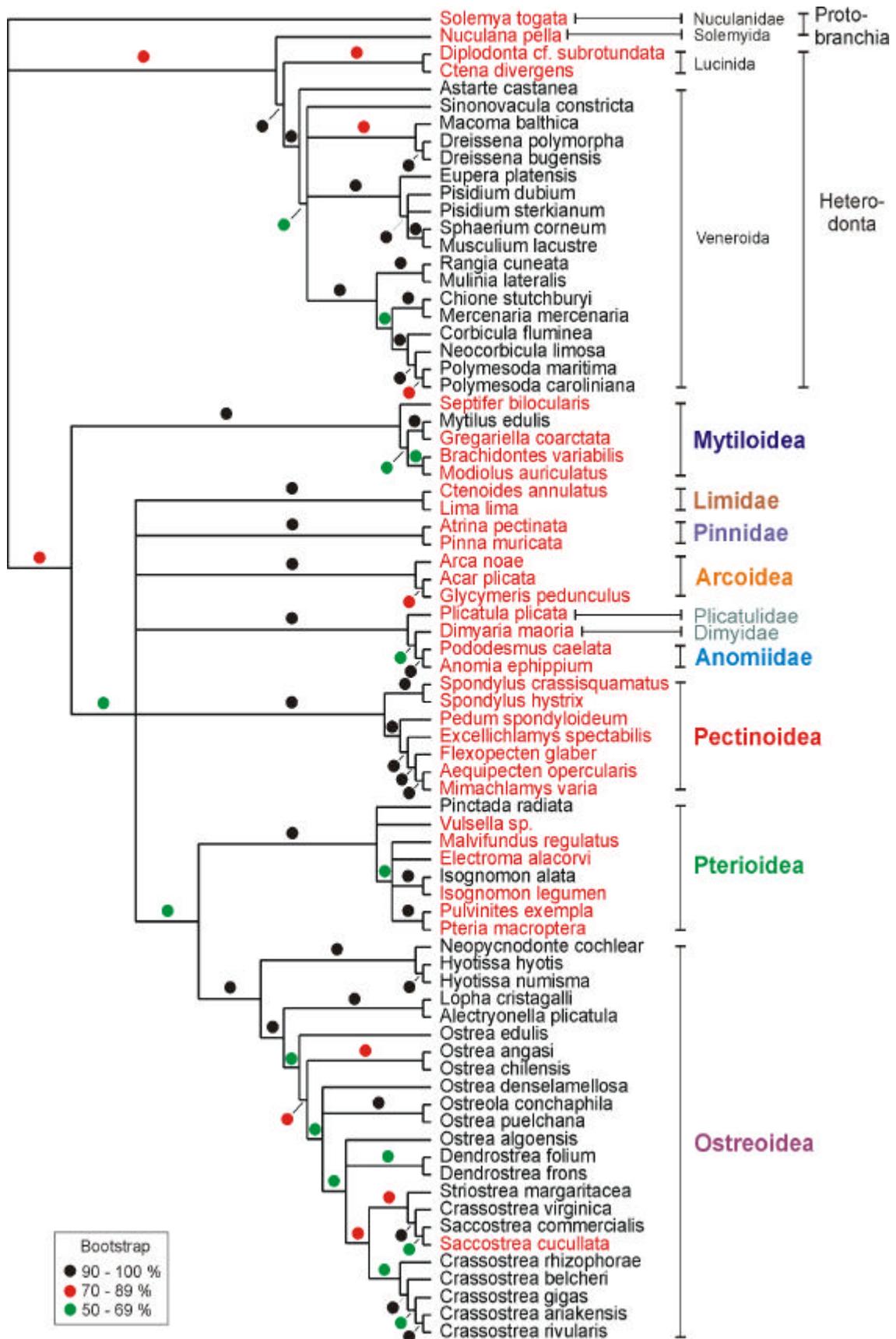


Abb. 31: „Strict Consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse (heuristische Suche) des aktualisierten 28S rDNA-Datensatzes (siehe Kapitel V.2.4.) von 1000 Bootstrap-Wiederholungen. 1376 Merkmale, davon 507 konstant, 185 variabel, aber nicht informativ und 684 informativ. Die Lücken wurden als fünfter Merkmalszustand gewertet. **Taxa, die im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurden.**



IV.2. Aussagekraft der molekularen Daten

IV.2.1. Sequenzalignments

Die Verfügbarkeit von zahlreichen 18S und 28S rDNA-Sequenzen erlaubte tiefere Einblicke in evolutive inter- und intraspezifische Zusammenhänge bei z.B. den Großgruppen der Bakterien und verschiedenen Phyla der Eukaryonten (Collins 1998; Wuyts et al. 2000). Die abwechselnde Folge von konservierten (langsam evolvierenden) und variablen (schnell evolvierenden) Regionen ist seit geraumer Zeit bekannt. Diese Eigenschaften der ribosomalen DNA ermöglichen die Bestimmung von relativen Substitutionsraten an den individuellen Positionen in beiden DNA-Molekülen. Diese distinkten Substitutionsraten können für die Beantwortung von phylogenetischen Fragestellungen auf verschiedenen zeitlichen Ebenen der Evolution herangezogen werden (Wuyts et al. 2000). Allerdings ist man mit dem Problem konfrontiert, daß die variablen Bereiche der ribosomalen DNA bzw. RNA deutlich schwerer zu alignieren sind, als die konservierten Regionen, daher werden die hypervariablen Abschnitte bei den Analysen oftmals exkludiert.

Grundsätzlich ist man auch bei der Verwendung von molekularen Daten bestrebt, nach homologen Merkmalen zu suchen. Im Falle von DNA-Sequenzen repräsentiert das Sequenzalignment die primäre Homologie-Hypothese (Giribet & Wheeler 1999). Das Einfügen von Lücken in ein Sequenzalignment, um homologe DNA-Sequenzen von unterschiedlicher Länge gegeneinander abzugleichen, wird in einem paarweisen/multiplen Sequenzalignmentverfahren durchgeführt und stellt den ersten Schritt in einer phylogenetischen Analyse dar (Giribet & Wheeler 1999). Darauf folgt die eigentliche phylogenetische Rekonstruktion mit Hilfe von verschiedenen baumrekonstruierenden Algorithmen (Parsimonie, Maximum-Likelihood) oder durch Anwendung von Distanzmethoden (Neighbor-Joining). Gegenwärtig sind in den DDBJ/EMBL und GenBank-Datenbanken 384 Einträge von ribosomalen Sequenzen von Pteriomorpha registriert (Tab. 11). Den Großteil davon nimmt die mitochondriale 16S rDNA ein, gefolgt von den beiden kern-codierten ribosomalen Genen, 18S und 28S rDNA. Der hohe Anteil von 16S rDNA-Sequenzen erklärt sich a) aus der Verwendung von diesem mitochondrialen Gen für populationsgenetische Studien und b) aus der Tatsache, daß vor allem kommerziell interessante Muschelarten (wie z.B. *Mytilus edulis*, Miesmuschel oder *Ostrea edulis*, Tafelauster) sehr intensiv untersucht werden.

Die hier präsentierte phylogenetische Analyse ist eine der derzeit umfangreichsten bezüglich der Anzahl der 18S rDNA-Sequenzen von Bivalvia und beinhaltet wohl die meisten Pteriomorpha, die bislang publiziert wurden (vgl. Campbell 1998, 2000; Steiner & Hammer 2000). Dennoch müssen einige Aspekte im Hinblick auf mögliche methodische Grenzen beachtet werden, um die erhaltenen Resultate im richtigen Licht sehen zu können.



rDNA-Gen	Summe	Anteil in %	diese Arbeit	Anteil in %
18S rDNA [‡]	109	28,6	29	26,6
28S rDNA [‡]	75	19,8	29	38,6
5.8S rDNA [‡]	6	1,6	–	–
5S rDNA [‡]	13	3,3	–	–
16S rDNA [†]	167	44	–	–
12S rDNA [†]	14	3,7	–	–

Tabelle 11: Verteilung der ribosomalen Sequenzen der Pteriomorpha in den DDBJ/EMBL/GenBank-Daten-banken. Stand: Oktober 2001. [‡] Ribosomale Gene im Kerngenom. [†] Ribosomale Gene in den Mitochondrien.

Die Durchführung des Sequenzalignments stellt einen schwierigen aber auch entscheidenden Schritt in der phylogenetischen Analyse dar. Hier sind wir vor allem mit Längenvariationen der ermittelten Sequenzen in bestimmten Regionen konfrontiert, die z.B. die Schlaufen („loops“) bilden. Aus diesem Grund führt das Sequenzalignierungsverfahren nur in seltenen Fällen zu einem singulären Alignment, sodaß verschiedene Alignments in der Analyse getestet werden müssen, um das am besten geeignete zu finden. Zum Anderen sind Informationen über die Sekundärstrukturen sehr hilfreich, können aber auch zu irreführenden Resultaten führen. Falls nun z.B. bei einer bestimmten Art das eine Ende einer Stamm-Struktur aus einer konservierten Sequenz auf dem einem DNA-Strang besteht, auf dem zweiten Strang sich in dem korrespondieren Abschnitt jedoch Substitutionen befinden, so wird in der Sekundärstruktur die Schlaufe relativ zum Stamm verlängert. Wenn nun hier das Sequenzalignmentverfahren strikt der Sekundärstruktur folgt, so erhält man in diesem Fall ein Alignment, das schlechter den Kriterien der Parsimonie folgt, in dem es „weniger sparsam“ (less parsimonious) ist. Diesen Problemen kann mit einer möglichst dichten taxonomischen Repräsentation von Arten zum Teil abgeholfen werden, da angenommen werden kann, daß die vorhandenen Zwischenformen eine Überleitung zu den exponierten Taxa darstellen und dadurch die Qualität des Alignments verbessert wird. Daher werden auch gelegentlich partielle Sequenzen in die Analysen einbezogen.

IV.2.2. Transitions/Transversionsraten

Die niedrige Transitions/Transversionsrate (s/v) von 1,2 spricht auch hier für eine bestimmte Saturierung dieses Gens, was bereits mit dem nicht so umfangreichen Datensatz von Steiner & Müller (1996) gezeigt wurde. Die Erosion des phylogenetischen Signals durch mehrfache Substitutionen betrifft in erster Linie erdgeschichtlich sehr alte Artbildungsereignisse. Die tiefen Knoten der Bäume sind generell nicht sehr gut unterstützt und müssen daher mit größerer Vorsicht betrachtet werden als die höheren Verzweigungen. Andererseits sind die geringen s/v-Parameter, die im Zuge der ML-Analysen ermittelt wurden, irreführend bezüglich der Topologien in jüngeren Verzweigungen, da dort die beobachteten Parameter höher sind. Mehrere Analysen mit reduzierten Datensätzen, die nur aus Familien der Pteriomorpha bestanden, ergaben die gleichen Topologien wie der vollständige Datensatz. Die Topologie jener Bäume, die diese Artbildungsprozesse widerspiegeln, hängt in jedem Fall weniger von den s/v-Parametern ab, als vielmehr von der Wahl bzw. der Zusammensetzung der Außengruppe ab.

Eine andere potentielle Fehlerquelle stellt die Strategie der Suche nach dem besten Baum in der



sehr ressourcenaufwendigen ML-Analyse dar. Der „strict consensus“-Baum der Parsimonie-Analyse wurde als Ausgangsbaum verwendet und das Rearrangement beinhaltete nicht mehr als fünf Äste, was aber ausreichend ist, um dem Algorithmus zu erlauben, genügend sinnvolle topologische Möglichkeiten der repräsentierten Großgruppen durchzuspielen und den besten Baum zu ermitteln. Ein weiteres sehr häufiges Problem ist das Auftreten von sehr langen Ästen, der sogenannte „long branch attraction“-Effekt, der die Algorithmen (Parsimonie- oder Distanz-Methoden) der Analysen dazu veranlaßt, weit entfernte Arten oder Gruppierungen zu vereinigen. Diese Auswirkungen könnten einerseits durch deren gemeinsame höhere Substitutionsraten im Vergleich zu den anderen Taxa erklärt werden, oder durch eine hohe Anzahl nicht detektierbarer Mehrfachtreffer („multiple hits“) (Swofford et al. 1996). Der hohe Grad an Kongruenz zwischen den Ergebnissen der Parsimonie- und ML-Analysen zeigt, daß der „long branch attraction“-Effekt in der vorliegenden Arbeit kein ernstzunehmendes Problem darstellt. Die Taxa mit den längsten Ästen, *Tropidomya abbreviata* (Anomalodesmata) und Sipunculida indet. (Sipuncula) sind Bestandteil der Außengruppe und die Pteriomorpha zeigen durchschnittlich kürzere Astlängen.

IV.2.3. Substitutionsraten

Der „Relative Rate Test“ für die vollständigen 18S rDNA Sequenzen des Datensatzes stellt das Ergebnis des Programmes LINTRE (Takezaki et al. 1995), des Testes auf die Astlängen, dar. In diesem Verfahren wird die durchschnittliche Distanz von der Wurzel zum äußersten Punkt („root-to-tip distances“) des Neighbor-Joining-Baumes (*Scutopus ventrolineatus* – Caudofoveata oder *Liolophura japonica* – Polyplacophora als Außengruppe) berechnet und kann als Substitutionsrate interpretiert werden. Es wird für jedes Taxon auch die Verteilung der einzelnen Abweichungen vom Durchschnittswert bestimmt. Anschließend werden die erhaltenen Werte mittels eines nicht-parametrischen Verfahrens (Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-U-Test in SPSS für Windows 6.0.1 – SPSS Inc.) und eines Permutationstests (Nemeschkal 1999) getestet.

Die berechneten Werte des „Relative Rate Test“ für den 18S rDNA-Datensatz (Abb. 32) zeigen für die Pteriomorpha die niedrigsten Substitutionsraten, die sich sowohl von den Heteroconchia wie auch von den übrigen Großgruppen der Mollusca signifikant ($p < 0,05$) unterscheiden und sehr homogen sind. Innerhalb der Bivalvia weisen nur die Protobranchia ähnliche Werte auf wie die am schnellsten evolvierten Pteriomorpha, die Limidae. Die Substitutionsraten der Heteroconchia, Scaphopoda und Gastropoda sind deutlich heterogener als jene der Pteriomorpha, wobei die Heteroconchia den größten Bereich umfassen, und die Scaphopoda und Gastropoda einander sehr ähnlich sind. Bereits Steiner & Müller (1996) vermuteten den Grund für die Polyphyly der Bivalvia in den unterschiedlichen Substitutionsraten der einzelnen Großgruppen.

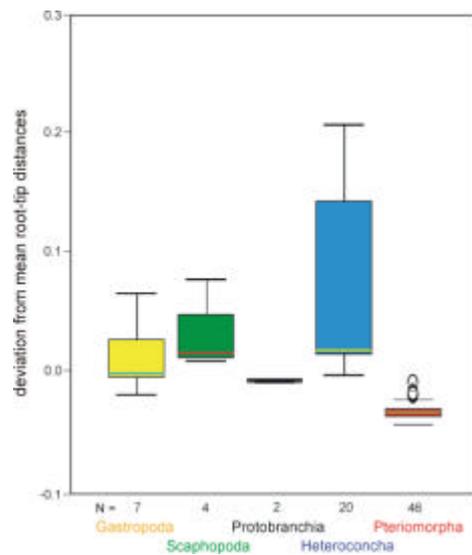


Abb. 32: „Relative Rate Test“ für vollständige 18S rDNA-Sequenzen. Die Ausreißer der Pteriomorpha (offene Kreise) korrespondieren mit jenen 4 Arten aus dem Datensatz, die die höchsten Substitutionsraten aufweisen (3 Limidae und *Lopha cristagalli* – Ostreidae). N Anzahl der untersuchten Taxa.

Vergleicht man die Substitutionsraten der beiden Gene (18S und 28S rDNA) miteinander so erhält man folgendes Bild (Abb. 33). Grundsätzlich sind die Substitutionsraten für die 28S rDNA deutlich höher als jene für die 18S rDNA und sie variieren auch wesentlich stärker (vgl. Ostreioidea und Arcoidea in Abb. 33). Dies trifft vor allem auf die Ostreioidea und Limidae der Pteriomorpha zu. Auch bei den Pectinoidea und den Anomioidea ist der Unterschied sehr deutlich zu sehen.

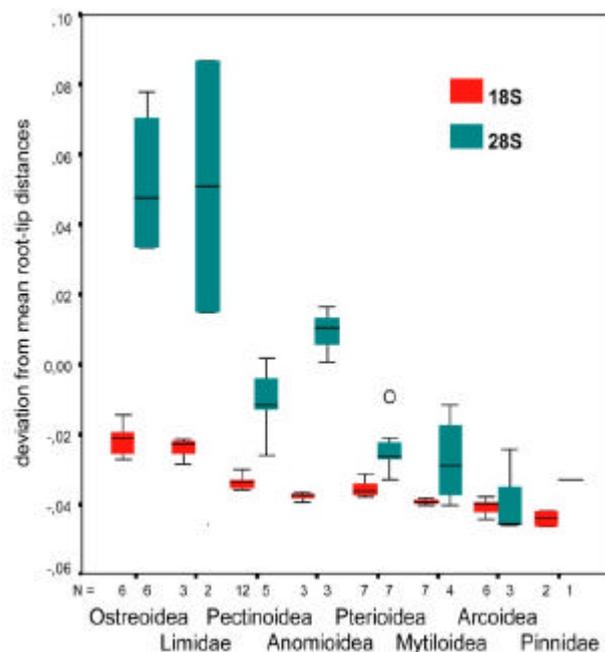


Abb. 33: „Relative Rate Test“ für die ermittelten 18S und 28S rDNA-Sequenzen der Pteriomorpha. N Anzahl der untersuchten Taxa.



Auffallend ist auch, daß die Substitutionsraten bei der 28S rDNA heterogener sind als bei der 18S rDNA. Dennoch zeigt der „Relative Rate Test“ für die Familiengruppen der Pteriomorpha sehr eindrucksvoll, daß die 18S rDNA durch sehr geringe Unterschiede in der Variation der Substitutionsraten eine gleichmäßigere Verteilung des phylogenetischen Signals ausgedrückt. Die Substitutionsraten dieses Gens lassen ähnliche Peaks vermissen, wie jene, die in der 28S rDNA z.B. für die deutliche Unterstützung der Ostreoidea im Vergleich zu anderen Familiengruppen der Pteriomorpha verantwortlich sind. Auch ist zu sehen, daß bei den Arcoidea, Mytiloidea und Pterioidea die Substitutionsraten der beiden Gene am ähnlichsten sind, und daß die Familiengruppen der Pteriomorpha auch hier sehr deutlich unterstützt sind.

IV.3. Kongruenz zwischen morpholog. und molekul. Daten

Aufgrund des hohen Grades der Konservierung - vor allem in der 18S rDNA - ist es möglich, an Hand dieses Gens Aufspaltungsprozesse zu studieren, die im Paläozoikum und im Mesozoikum stattgefunden haben (Steiner & Müller 1996) (Abb. 34). Daher sollte es möglich sein, mit 18S rDNA-Sequenzen in jedem Fall jene Radiationen der Bivalvia erfassen zu können, die im Devon und in der Trias stattgefunden haben (z.B. Waller 1978, 1998; Carter et al. 2000; Cope 2000). Das Auflösungsvermögen der 18S rDNA bei den Bivalvia scheint bis in das Ordovizium zurückzureichen, wo einerseits die Trennung zwischen Isofilibranchia und Pteriomorpha und stattgefunden haben soll, und andererseits bereits die Mytiloidea die Linie der weiteren Entwicklung der Pteriomorpha verlassen haben (Steiner & Müller 1996) (vgl. Abb. 6 und 7 in Kapitel I.3.2.). Hinsichtlich der Radiationen der Conchifera ist es fraglich, ob sich die Artbildungsprozesse, die zur Zeit der sogenannten „Artenexplosion“ während des Kambriums (vor ca. 580-510 Mill. J.) stattgefunden haben, in der 18S rDNA widerspiegeln. Das obere Limit für das phylogenetische Signal der 18S rDNA bezüglich der Pteriomorpha scheint an der Grenze von Kreide zu Tertiär (vor ca. 65 Mil. J.) zu liegen, wodurch es relativ unwahrscheinlich ist, die Radiationen des Paläozän noch zufriedenstellend detektieren zu können.

Im Vergleich zur 18S rDNA wird die 28S rDNA verstärkt für die Auflösung von jüngeren Radiationen und für die Analyse der intraspezifischen Beziehungen innerhalb der Familiengruppen der Pteriomorpha herangezogen (Littlewood 1994; Park & Ó Foighil 2000; Ó Foighil & Taylor 2000; Distel 2000; Distel et al. 2000). Von diesem ribosomalen Gen verspricht man sich Information hinsichtlich jener Artbildungsprozesse, die in der Neuzeit (Känozoikum) - und hier vor allem im Paläozän bzw. an der Grenze von Kreide zu Tertiär - stattgefunden haben. Die 28S rDNA sollte demnach jenen erdgeschichtlichen Bereich abdecken, wo sich die 18S rDNA an der oberen Grenze ihres Auflösungspotentials befindet.

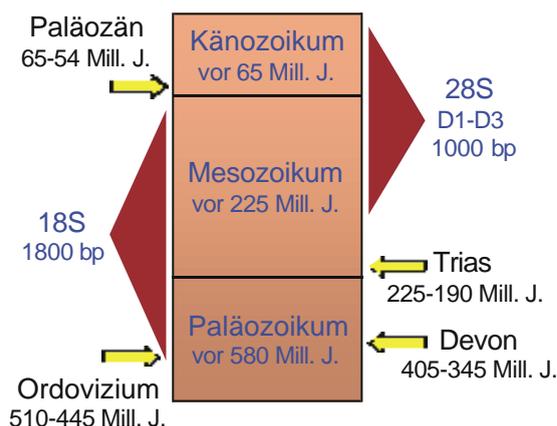


Abb. 34: Radiationen der Pteriomorpha (gelbe Pfeile) und evolute Zeitfenster (rote Dreiecke) der verwendeten molekularen Marker. Ungefähre Dauer der Perioden Ordovizium, Devon, Trias sowie der Epoche Paläozän nach Cox & Moore (1987).

Die Analyse der 18S+28S rDNA-Sequenzen in Kombination (Abb. 28, 29 und 35F) zeigt, daß die Robustheit der Knoten grundsätzlich höher ist als bei der Analyse der einzelnen Gene. Leider stehen von den Bivalvia und anderen Klassen der Mollusca noch nicht genügend 28S rDNA-Sequenzen zur Verfügung, um hier eine großsystematische Analyse zu präsentieren. Die vorliegenden 28S rDNA-Daten können nur für die Pteriomorpha und Heterodonta interpretiert werden, wobei letztere erst in der Analyse des aktualisierten 28S rDNA-Datensatzes berücksichtigt wurden (Abb. 31).

Die basale Position der Mytiloidea und Arcoidea steht im Einklang mit den Ergebnissen von Waller (1998), der die Trennung der Mytiloidea von den übrigen Pteriomorpha im Ordovizium annimmt (Abb. 35 und 36). Bei Cope (1996) sind die Arcoidea basal und das Schwesterngruppenverhältnis zu den Mytiloidea ist fraglich (Abb. 35). In Carter (1990) sind die Mytiloidea bei den Heteroconchia positioniert (Abb. 35), was möglicherweise auf einen noch älteren Ursprung der Mytiloidea hinweisen würde. Starobogatov (1992) und Morton (1996) ordnen beide Familiengruppen an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Pteriomorpha ein (Abb. 35). Bei Campbell (2000 – Abb. 1 und 2) stehen die Mytiloidea basal zu (Pinnoidea (Ostreoidea, Pterioidea)) und die Arcoidea bilden die Schwesterngruppe zu (Pectinoidea (Anomioidea + Plicatuloidea)).

Die Pinnoidea bilden in nahezu allen diskutierten Fällen ein Schwesterngruppenverhältnis zu den Pterioidea, das sich jedoch an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Pteriomorpha widerfindet. Bei Waller (1998) stellen sie die erste Abtrennung von den übrigen Eupteriomorpha dar (Abb. 36), bei Morton (1996) hingegen bilden sie die Kronengruppe der Pteriomorpha (Abb. 35). In der vorliegenden Arbeit sind die Pinnoidea in der kombinierten Analyse nur durch *Atrina pectinata* (Pinnidae) vertreten und sind als Schwesterntaxon zu (Ostreoidea, Pterioidea) positioniert, was sich auch in der Analyse von Campbell (2000 – Abb. 1 und 2) bestätigt.

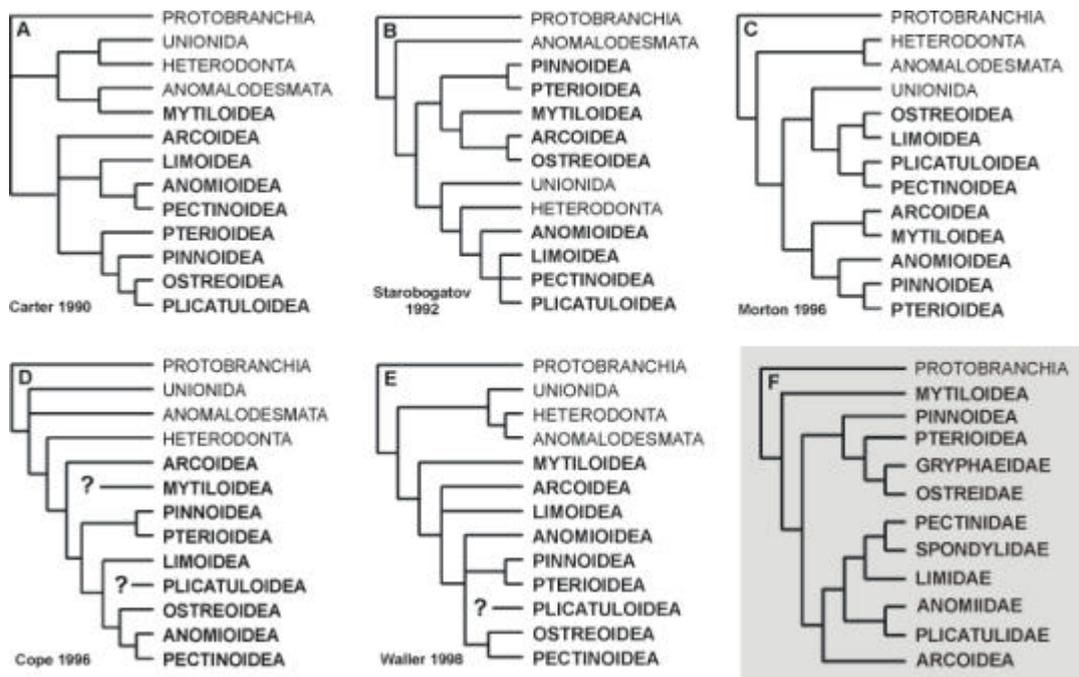


Abb. 35: Fünf Hypothesen zur Phylogenie der Pteriomorpha beruhend auf morphologischen Merkmalen (A-E) im Vergleich mit dem finalen, idealisierten ML-Baum (F, grau unterlegt) des 18S+28S rDNA-Datensatzes aus Abbildung 28 und 29 der vorliegenden Arbeit. Vgl. auch Steiner & Hammer (2000).

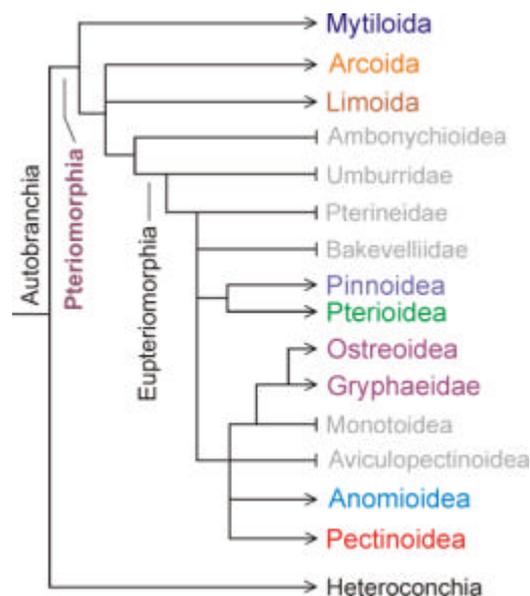


Abb. 36: Phylogenie der Autobranchia unter besonderer Berücksichtigung der Pteriomorpha (vgl. Abb. 7 in Kapitel I.3.2.). Ausgestorbene Linien enden mit einem Querbalken, rezente Linien enden mit einem Pfeil. Modifiziert nach Waller (1998).

Bezüglich des Ursprungs der Limoidea herrscht zwischen den diskutierten phylogenetischen Szenarien (Abb. 35) die größte Differenz und leider hat Campbell (2000) in seine Arbeit keine Vertreter dieser Familiengruppe inkludiert. Bei Carter (1990) und Starobogatov (1992) sind sie bei den Anomioidea und den Pectinoidea positioniert. In Cope (1996) werden sie als Schwesterngruppe zu (Ostreoidea (Anomioidea, Pectinoidea)) beschrieben, und Morton (1996) führt die Limoidea als unmittelbare Schwesterngruppe zu den Ostreoidea, was jedoch verwunderlich ist, da die Ostreoidea eine jüngere Entwicklung der Pteriomorpha darstellen.



Bei Waller (1998) bilden sie eine Polytomie an der Basis der Pteriomorpha. In der vorliegenden Arbeit bilden die Limidae die Schwesterngruppe zu den Pectinoidea und stehen basaler als (Plicatulidae, Anomiidae), was im Widerspruch zu der Position der Pectinoidea bei Waller (1998) steht. Möglicherweise kann die oszillierende Position der Limidae bzw. Limoidea innerhalb der gesamten Pteriomorpha durch Insertionen in der 18S rDNA erklärt werden, die in der vorliegenden Arbeit allerdings nur bei *Ctenoides annulatus* (Limidae) gefunden wurden. Diese Insertionen sind auch verantwortlich für die große Astlänge von *Ctenoides annulatus*, da sie vermutlich das phylogenetische Signal verzerren.

Die Anomioidea und Pectinoidea bilden bei Carter (1990) und bei Cope (1996) ein Schwesterngruppenverhältnis, wobei dieses im ersten Fall innerhalb und im zweiten Fall als Kronengruppe der Pteriomorpha positioniert ist (Abb. 35). In den übrigen Phylogenien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, stehen diese beiden Familiengruppen entfernt voneinander auf getrennten Ästen, wobei die Anomioidea bei Waller (1998) an der Basis der jüngeren Radiationen der Pteriomorpha stehen (Abb. 35 und 36). Bei Campbell (2000 – Abb. 1 und 2) bilden die Anomioidea ein Schwesterngruppenverhältnis mit den Plicatuloidea, was auch durch die kombinierte Analyse der vorliegenden Arbeit bestätigt wird. Der Ursprung der Plicatuloidea ist ebenfalls noch ungeklärt, da bei Cope (1996) und Waller (1998) kein eindeutiger Befund vorliegt, und in den Arbeiten von Carter (1990), Starobogatov (1992) sowie Morton (1996) unterschiedliche Positionierungen beschrieben sind.

Weiters werden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse von Waller (1998) und Campbell (2000 – Abb. 1 und 2) bezüglich der Stellung der Ostreoidea gut unterstützt, allerdings sind deutliche Unterschiede hinsichtlich der Schwesterngruppe festzustellen. Carter (1990): (Ostreoidea, Plicatuloidea); Starobogatov (1992): (Ostreoidea, Arcoidea); Morton (1996): (Ostreoidea, Limoidea); Cope (1996): (Ostreoidea, (Anomioidea, Pectinoidea)); Waller (1998): (Ostreoidea, Pectinoidea); Campbell (2000 – Abb. 1 und 2): (Pinnoidea, (Ostreoidea, Pterioidea)); vorliegende Arbeit: (Pinnidae, (Ostreoidea, Pterioidea)). Auch ist die Position dieser Gruppierungen innerhalb der Pteriomorpha noch ungeklärt.

Abschließend sei zusammengefaßt, daß die Monophylie der Mytilinae und Pectinidae sowie der Gryphaeidae und Ostreidae gut unterstützt ist. Die Arcidae zeigen eine paraphyletische Situation und die Pteriidae und die Malleidae sind polyphyletisch. Die ML-Analysen bestätigen, daß beide Gene ähnliche Topologien unterstützen, die sich nur im Arrangement der basalen Gruppen (Mytiloidea und Arcoidea) unterscheiden. Die Analyse der 18S- plus 28S rDNA-Sequenzen in Kombination ergibt einen Baum mit der gleichen Topologie wie der 28S-ML-Baum (Abb. 35F), der aber deutlich robuster unterstützt ist als die Bäume der Analysen der singulären Gene.



V. ANHANG



V.1. Verwendete Lösungen und Chemikalien	94
V.1.1. Enzyme, Puffer und Lösungen	94
V.1.2. Verwendete Chemikalien und Enzyme	95
V.2. Verzeichnisse	97
V.2.1. Zitierte Literatur	97
V.2.2. Verwendete Abkürzungen	101
V.2.3. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	104
V.2.4. 28S rDNA-Datenset (aktualisiert)	106
V.2.5. Sequenzierte Taxa	108
V.2.6. Bildtafeln der sequenzierten Pteriomorpha	109
V.3. Curriculum Vitae	115
V.4. Publikationen	118



V.1. Verwendete Lösungen und Chemikalien

V.1.1. Enzyme, Puffer und Lösungen

Proteinase K	20mg/ml in Aqua dest. (steril); Aliquots bei -20°C lagern
Dithiothreitol (DTT)	1M; 1ml: 154.2mg DTT in 1ml Aqua dest. (steril) lösen und 3.5µl 3M Na-Acetat zugeben.
RNase A	500µg/ml; bei -20°C lagern
PEG-Lösung	24% Polyethylenglycol 6000 in 3M NaCl steril filtrieren und bei 4°C lagern
TAE-Puffer	50x Stammlösung: 242g Tris-Base 57,1ml konzentrierte Essigsäure („Eisessig“) 100ml 0,5M EDTA (pH 8.0) mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren, bei 4°C lagern 0,5x Laufpuffer: 50x Stammlösung 1:100 mit Aqua dest. verd.
Ethidiumbromid (EtBr)	10mg/ml in Aqua dest.
Ladepuffer Typ III	6x Stammlösung: 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene Cyanol 30% (w/v) Glycerin in Aqua dest. (steril) bei 4°C lagern 1x Ladepuffer Typ III: 6x Stammlösung mit 0,5x TAE-Puffer 1:6 verdünnen
1 kb-DNA-Leiter	100ng/µl in 1x Ladepuffer Typ III Fragmente (kb): 0,25-0,5-0,75-1-1,5-2-2,5-3-4-5-6-8-10
Low-Range I DNA Molecular Marker	120ng/µl in 1x Ladepuffer Typ III Fragmente (bp): 117, 224, 702, 1 264, 1 371, 1 929, 2 323, 3 675, 4 324, 4 822, 5 686, 6 369, 7 639, 8 454
Extraktions-Puffer	2% CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) 0.2% 2-β Mercaptoethanol 1,4M NaCl 20mM EDTA 100mM Tris-HCl, pH 8.0
Salt Solution	1,2M NaCl 0,06M MgCl ₂ (im TOPO TA Cloning® Kit enthalten)
X-Gal	40mg/ml in DMF (Dimethylformamid) (40 µl/Platte)



SOC-Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10mM NaCl 2,5mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glucose (im TOPO TA Cloning [®] Kit enthalten)
Luria-Bertani (LB) Medium	5g Hefeextrakt 10g Pepton, tryptisch verdaut 10g NaCl mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren, bei 4°C lagern
LB-Platten	100ml LB flüssig 1,5g Agar-Agar 100µl Ampicillin oder Kanamycin 40µl X-Gal bei 4°C maximal 14 Tage haltbar
Ampicillin	50mg/ml in Aqua dest. (steril) bei -20°C maximal 3 Monate haltbar
Kanamycin	50mg/ml in Aqua dest. (steril) bei -20°C maximal 3 Monate haltbar
Lösung I	50mM Glucose 25mM Tris-HCl (pH 8.0) 10mM EDTA
Lösung II	0.2N Na OH 1% SDS (Natriumdodecylsulfat)
Lösung III	3M Kaliumacetat 5M Essigsäure

V.1.2. Verwendete Chemikalien und Enzyme

Agar-Agar	AppliChem
Ampicillin	Serva
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galactopyranosid (X-Gal)	BTS
Chelex [®] 100 Resin	Sigma
Chloroform (CHCl ₃)	Merck
Cleanmix	Talent
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Biomedica
Dimethylformamid (DMF)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	ICN
1 kb-DNA-Leiter	Genecraft
<i>Eco</i> RI (G↓AATTC)	Roche (Boehringer Mannheim)



Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Essigsäure („Eisessig“)	Merck
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid (EtBr)	Serva
GenElute™	Sigma
Glucose	Merck
HCl	Merck
Hefeextrakt	Sigma
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Serva
Ladepuffer Typ III	BioRad
Low-Range I DNA Molecular Marker	Amresco
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Biomedica
2-β Mercaptoethanol	Sigma
Mineral Öl	Sigma
Natriumacetat (Na-Acetat)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Pepton, tryptisch verdaut	Merck
Phenol	Roth
Polyethylenglycol	Fluka
Primer	VBC Genomics Bioscience Research GmbH
Proteinase K	Roche
QIAquick	Qiagen
RNase A	Roche oder Biomedica
SeaKem Agarose	FMC
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
Taq DNA Polymerase + 10x Puffer	BioTherm™ (Genecraft)
Tris-Base (Trizma)	Sigma



V.2. Verzeichnisse

V.2.1. Zitierte Literatur

- ABBOTT, R. T. & DANCE, S. P. (ed) 1990. Compendium of Seashells. 4th ed. American Malacologists, Inc., Melbourne, Florida.
- ADAMKEWICZ, S. L., HARASEWYCH, M. G., BLAKE, J., SAUDEK, D. & BULT, C. J. 1997. A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Molecular Biology and Evolution*, **14**, 619-629.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513.
- BOORE, J. L. & BROWN, W. M. 1994. Mitochondrial Genomes and the Phylogeny of Mollusks. *The Nautilus*, **Suppl. 2**, 61-78.
- BREMER, K. 1988. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, **42**, 795-803.
- BREMER, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics – The International Journal of the Willi Hennig Society*, **10**, 295-304.
- CAMPBELL, D. C. 2000. Molecular evidence on the evolution of the Bivalvia. In: Harper, E.M., Taylor, J.D. & Crame, J.A: (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 31-46.
- CAMPBELL, D. C., HOEKSTRA, K. J. & CARTER, J. G. 1998. 18S ribosomal DNA and evolutionary relationships within the Bivalvia. In: Johnston, P. A. & Haggart, J. W. (eds) *Bivalves: An eon of Evolution – Paleobiological Studies honoring Norman D. Newell*. Calgary University Press, Calgary, 75-85.
- CANAPA, A., MAROTA, I., ROLLO, F. & OLMO, E. 1999. The small-subunit rRNA gene sequences of venerids and the phylogeny of bivalvia. *Journal of Molecular Evolution*, **48**, 463-468.
- CARTER, J. G. 1990. Evolutionary significance of shell microstructure in the Paleotaxodonta, Pteriomorpha and Isofilibranchia (Bivalvia: Mollusca) . In: Carter, J. G. (ed.) *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends Vol. 1*. Van Nostrand Reinhold, New York, 135-296.
- CARTER, J. G., CAMPBELL, D. C. & CAMPBELL, M. R. 2000. Cladistic perspectives on early bivalve evolution. In: Harper, E.M., Taylor, J.D. & Crame, J.A: (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 47-79.
- COLLINS, A. G. 1998. Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: An analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **95**, 15458-15463.
- COPE, J. C. W. 1996. The early evolution of the Bivalvia. In: Taylor, J. D. (ed.) *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford University Press, Oxford, 361-370.
- COPE, J. C. W. 2000. A new look on early bivalve phylogeny. In: Harper, E.M., Taylor, J.D. & Crame, J.A: (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 81-95.
- COX, C. B. & MOORE, P. D. 1985. Biogeography – An Ecological and Evolutionary Approach. 4th ed. Blackwell Scientific Publications. Deutsche Ausgabe (1987) Einführung in die Biogeographie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- DISTEL, D. L. 2000. Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in mytilid body plans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **15(1)**, 25-33.
- DISTEL, D. L., BACO, A. R., CHUANG, E., MORRILL, W., CAVANAUGH, C. & SMITH, C. R. 2000. Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature*, **403**, 725-726.
- DE RIJK, P. 1995. Optimisation of a database for ribosomal RNA structure and application in structural and evolutionary research. Dissertation, Universität Antwerpen, Belgien.
- DE RIJK, P. & DE WACHTER, R. 1993. DCSE, an interactive tool for sequence alignment and secondary



- structure research. *CABIOS*, **9**, 735-740.
- FESCH, C. (ed) 2000. Genetische Tests – Wie funktionieren sie und was sagen sie aus? 1. Auflage, Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt am Main, 15.
- FRISCHER, M. E., WILLIAMS, J. & KENCHINGTON, E. 1998. A molecular phylogeny of some major groups of Pectinidae inferred from 18S rDNA gene sequences. *In*: Johnston, P. A. & Haggart, J. W. (eds) *Bivalves: An eon of Evolution – Paleobiological Studies honoring Norman D. Newell*. Calgary University Press, Calgary, 213-221.
- GIRIBET, G. & CARRANZA, S. 1999. Point Counter Point: What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny? *Journal of Molecular Evolution*, **48**, 256-258.
- GIRIBET, G. & WHEELER, W. C. 1999. On Gaps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**(1), 132-143.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H. & YANO, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, **21**, 160-174.
- HASZPRUNAR, G. 2000. Is the Aplacophora monophyletic? A cladistic point of view. *American Malacological Bulletin*, **15**(2), 115-130.
- HENDY, M. D. & PENNY, D. 1993. Spectral analysis of phylogenetic data. *Journal of Classification*, **10**, 5-24.
- HILLIS, D. M., MABLE, B. K., LARSON, A., DAVIS, S. K. & ZIMMER, E. A. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. *In*: Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (eds) *Molecular Systematics, 2nd edition*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 369.
- KENCHINGTON, E. L., RODDICK, D. L., SINGH, K. R. & BIRD, C. J. 1994. Analysis of small-subunit rRNA gene sequences from six families of molluscs. *Journal of Marine Biotechnology*, **1**, 215-217.
- KENCHINGTON, E., LANDRY, D. & BIRD, C. J. 1995. Comparison of taxa of the mussel *Mytilus* (Bivalvia) by analysis of the nuclear small-subunit rRNA gene sequence. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **52**, 2613-2620.
- KING, T. L., EACKLES, M. S., GJETVAJ, B. & HOEH, W. R. 1999. Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. *Journal of Molecular Ecology*, **8** (Suppl.), S65-S78.
- LECOINTRE, G., PHILIPPE, H., LE, L. H. V. & LE GUYADER, H. 1993. Species sampling has a major impact on phylogenetic inference. *Molecular Phylogeny and Evolution*, **2**, 205-224.
- LITTLEWOOD, D. T. J. 1994. Molecular Phylogenetics of Cupped Oysters Based on Partial 28S rRNA Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **3**(3), 221-229.
- LITTLEWOOD, D. T. J., FORD, S. E. & FONG, D. 1991. Small subunit rRNA gene sequence of *Crassostrea virginica* (Gmelin) and a comparison with similar sequences from other bivalve molluscs. *Nucleic Acids Research*, **19**, 6048.
- MALCHUS, N. Ontogeny of pteroid and ostreoid ligaments (Pteriomorphia: Bivalvia): Physical constraints and evolutionary implications. *Palaeontology* (in press)
- MARUYAMA, T., ISHIKURA, M., YAMAZAKI, S. & KANAI, S. 1998. Molecular phylogeny of zooxanthellate bivalves. *Biological Bulletin*, **195**, 70-77.
- MCALISTER, A. L. 1966. Evolutionary and systematic implications of a transitional Ordovician lucinoid bivalve. *Malacologia*, **3**, 433-439.
- MIZZARO-WIMMER, M. & SALVINI-PLAWEN, L. 2001. Praktische Malakologie – Beiträge zur vergleichend-anatomischen Bearbeitung von Mollusken: Caudofoveata bis Gastropoda – *Streptoneura*. 1. Auflage, Springer-Verlag, Wien und New York.
- MORTON, B. 1996. The evolutionary history of the Bivalvia. *In*: Taylor, J. D. (ed.) *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford University Press, Oxford, 337-360.
- NAVAJAS, M., LAGNEL, J., GUTIERREZ, J. & BOURSOT, P. 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, **80**, 742-52.
- NEMESCHKAL, H. L. 1999. Morphometric correlation patterns of adult birds (Fringillidae: Passeriformes and Columbiformes) mirror the expression of developmental control genes. *Evolution*, **53**: 899-918.



- Ó FOIGHIL, D. & TAYLOR, D. J. 2000. Evolution of parental care and ovulation behaviour in oysters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **15**(2), 301-313.
- OLIVER, P. G. (ed) 1992. Bivalved Seashells of the Red Sea. Verlag Christa Hemmen, Wiesbaden und National Museum of Wales, UK.
- OLSEN, G. J., MATSUDA, H., HAGSTROM, R. & OVERBEEK, R. 1994. fastDNAmI: A tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Computer Applications in the Biosciences*, **10**, 41-48.
- PAGE, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, 357-358.
- PARK, J.-K. & Ó FOIGHIL, D. 2000. Spaeriid and corbiculid clams represent separate heterodont Bivalve radiations into freshwater environments. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **14**(1), 75-88.
- RAES, J. & VAN DE PEER, Y. 1999. ForCon : A software tool for the conversion of sequence alignments. *EMBnet.news*, **6**(1).
- RENNER, M. (ed) 1991. Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum. 20. Auflage, Verlag Gustav Fischer, Stuttgart und Jena, 149-164.
- RICE, E. L. 1990. Nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA gene from the Atlantic sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Nucleic Acids Research*, **18**, 5551.
- RICE, E. L., RODDICK, D. & SINGH, R. K. 1993. A comparison of molluscan (Bivalvia) phylogenies based on palaeontological and molecular data. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **2**, 137-146.
- RIEDL, R. (ed) 1983. Fauna und Flora des Mittelmeeres. 3. Auflage, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, 343-379.
- RIUTORT, M., FIELD, K. G., RAFF, R. A. & BAGUÑA, J. 1993. 18S rRNA sequences and phylogeny of the Platyhelminthes. *Biochemical Systematics and Ecology*, **21**, 71-77.
- RUNNEGAR, B. N. 1996. Early evolution of the Mollusca: The fossil record. In: Taylor, J. D. (ed.) *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford University Press, Oxford, 77-87.
- RUNNEGAR, B. N. & POJETA, J. JR. 1974. *Fordilla troyensis* and the early history of pelecypod mollusks. *American Scientist*, **62**, 706-711.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & EHRlich, H. K. 1987. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- SALVINI-PLAWEN, L. 1983. Klasse: Bivalvia (Pelecypoda, Lamellibranchiata; Muscheln). In: Riedl, R. (ed) *Fauna und Flora des Mittelmeeres*. 3. Auflage, Verlag Paul Parey, Hamburg-Berlin, 343-379.
- SALVINI-PLAWEN, L. & STEINER, G. 1996. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. In: Taylor, J. D. (ed.) *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford University Press, Oxford, 29-52.
- SORENSEN, M. D. 1996. *Tree-Rot*. University of Michigan, Ann Arbor.
- STAROBOGATOV, Y. I. 1992. Morphological basis for the phylogeny and classification of Bivalvia. *Ruthenica*, **2**, 1-26.
- STEINER, G. 1999. Point Counter Point: What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny? Response. *Journal of Molecular Evolution*, **48**, 258-261.
- STEINER, G. & HAMMER, S. 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences, with particular reference to the Pteriomorpha. In: Harper, E.M., Taylor, J.D. & Crame, J.A.: (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 11-29.
- STEINER, G. & MÜLLER, M. 1996. What can 18S rDNA do for Bivalve Phylogeny? *Journal of Molecular Evolution*, **43**, 58-70.
- STENZEL, H. B. 1971. Oysters. In: Moore, R. C. (ed) *Treatise on Invertebrate Paleontology, Part N, Vol. 3, Mollusca* 6. Kansas University Press Lawrence, Kansas, N953-N1224.
- STRICKBERGER, M. W. 1985. Genetics. 3rd ed. Macmillan Publishing Company, New York.



- STRIMMER, K. & VON HAESLER, A. 1996. Quartet Puzzling: A quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Journal of Molecular Biology and Evolution*, **13**, 964-969.
- SWOFFORD, D. L. 1998. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 130 pp.
- SWOFFORD, D. L., OLSEN, G. J., WADDELL, P. J. & HILLIS, D. M. 1996. Phylogenetic inference. In: Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (eds) *Molecular Systematics, 2nd edition*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 407-514.
- TAKEZAKI, N., RZHETSKY, A. & NEI, M. 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 823-833.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, **22**, 4673-4680.
- TOPO TA CLONING[®] Instruction Manual, Version J, 200105 (25-0184), www.invitrogen.com
- VAN DE PEER, Y., DE RIJK, P., WUYTS, J., WINKELMANS, T. & DE WACHTER, R. 2000. The European Small Subunit Ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research*, **28**, 175-176.
- VON BEURLEN, K. 1944. Beiträge zur Stammesgeschichte von Muscheln. Sitzungsberichte der mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung der Bayrischen Akademie der Wissenschaften zu München, **Heft I/II**, Sitzungen Januar-Juli.
- WALLER, T. R. 1978. Morphology, morphoclines and a new classification of the Pteriomorphia. *Philosophical Transactions of the Royal Society London*, **B 284**, 345-365.
- WALLER, T. R. 1990. The evolution of ligament systems in the Bivalvia. In: Morton, B. (ed) *The Bivalvia – Proceedings of a Symposium in Honour of Sir Charles Maurice Yonge, Edinburgh 1986*. Hong Kong University Press, Hong Kong, 49-71.
- WALLER, T. R. 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In: Johnston, P.A. & Haggart, J.W. (eds) *Bivalves: An eon of evolution – Paleobiological studies honoring Norman D. Newell*. Calgary University Press, Calgary, 1-45.
- WALSH, P. S., METZGER, D. A. & HIGUCHI, R. 1991. Chelex[®] 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing from Forensic Material. *Biotechniques*, **10(4)**, 506-513.
- WATSON, J. D., HOPKINS, N. H., ROBERTS, J. W., ARGETSINGER-SEITZ, J. & WEINER, A. M. (eds) 1987. *The molecular biology of the gene*. 4th ed. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc.
- WERMAN, S. D., SPRINGER, M. S. & BRITTEN, R. J. 1996. Phylogenetic inference. In: Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (eds) *Molecular Systematics, 2nd edition*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 169-203.
- WESTHEIDE, W. & RIEGER, R. (eds) 1996. *Spezielle Zoologie – Erster Teil: Einzeller und Wirbellose*. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, Jena und New York, 276-330.
- WINNEPENINCKX, B., BACKELJAU, T. & DE WACHTER, R. 1994. Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of Mollusca. *Nautilus*, **Suppl. 2**, 98-110.
- WINNEPENINCKX, B., BACKELJAU, T. & DE WACHTER, R. 1996. Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18s rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 1306-1317.
- WUYTS, J., DE RIJK, P., VAN DE PEER, Y., PISON, G., ROUSSEUW, P. & DE WACHTER, R. 2000. Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, **28(23)**, 4698-4708.
- WUYTS, J., DE RIJK, P., VAN DE PEER, Y., WINKELMANS, T. & DE WACHTER, R. 2001. The European Large Subunit Ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research*, **29(1)**, 175-177.



V.2.2. Verwendete Abkürzungen

SI-Einheiten sind in dieser Auflistung nicht angeführt.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicilin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp (kb)	Basenpaare (Kilobasenpaare)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	cirka, ungefähr
cf.	lat. confer: vergleiche
CHCl ₃	Chloroform
CI	Consistency-Index
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
D	Domäne
d.h.	das heißt
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
Dev	Devon
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DNA (DNS)	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
emend.	lat. emendatum: geändert
et al.	lat: et aliter: und andere
ET	Ägypten
EtBr	Etidiumbromid
EtOH	Ethanol (Äthanol), Ethylalkohol (Äthylalkohol)
G	Guanin
GR	Griechenland
HCl	Hydrochloridsäure
HI	Homoplasie-Index
HR	Kroatien
i.e.S.	im engeren Sinne
i.w.S.	im weiteren Sinne



IUPAC	International Union for Pure and Applied Chemistry
J.	Jahre
Kan	Kanamycin
lat.	Latein, lateinisch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Mill.	Millionen
ML	Maximum-Likelihood
MPT	most parsimonious tree(s)
mRNA (mRNS)	Messenger Ribonucleic Acid (Boten Ribonukleinsäure)
N	Norwegen, Stichprobenumfang
Na-Acetat	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NZ	Neuseeland
Ord	Ordovizium
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
P	Panama
p.	Seite
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
RC	Rescaled-Consistency-Index
RNA (RNS)	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rRNA (rRNS)	ribosomal Ribonucleic Acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp. (spec.)	lat. Species: Art
spp.	alle Arten einer Gattung
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unit
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel



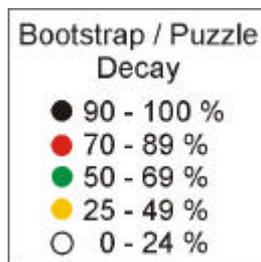
IUPAC-AMBIGUITY CODE

G,A,T,C certain bases

g,a,t,c uncertain bases (approx. 70% certainty)

R	(A/G)
Y	(C/T)
M	(C/A)
K	(G/T)
W	(A/T)
S	(G/C)
B	(C/G/T)
D	(G/A/T)
H	(A/C/T)
V	(A/C/G)
N	(G/A/T/C)

Um die berechneten Indizes für die Robustheit der Knoten bzw. Äste der ermittelten phylogenetischen Bäume (Kapitel III) anschaulicher darzustellen, wurde für die Bäume in den Abbildungen 24a, sowie 27 und 29 nachstehendes Farbschema verwendet.





V.2.3. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen im Text

Abb. 1	Die Klassen der Mollusca in schematisierter Darstellung	9
Abb. 2	Phylogenie der rezenten Mollusca	11
Abb. 3	Mediosagittalschnitt von <i>Mytilus edulis</i> (Miesmuschel)	13
Abb. 4	Kiemen-Typen bei den Bivalvia	17
Abb. 5	Beschriebene Scharniertypen (Schloßränder) bei den Bivalvia	19
Abb. 6	Radiationen der Bivalvia im Kambrium	24
Abb. 7	Radiationen der Autobranchia	25
Abb. 8	Sechs Hypothesen zur Phylogenie der Pteriomorpha im Vergleich	28
Abb. 9	Organisation und Struktur der Ribosomen von Eukaryonten	29
Abb. 10	Organisation des ribosomalen Gen-Clusters bei Eukaryonten	30
Abb. 11	Sekundärstruktur der 18S rDNA des Plattwurmes <i>Calicophoron calicophoron</i>	31
Abb. 12	Sekundärstruktur der 28S rDNA des Hefepilzes <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Abb. 13	Cladogramm der Familien- und Über-Familien der Pteriomorpha	33
Abb. 14	Sammelorte der untersuchten Taxa	36
Abb. 15	Schalen von einigen untersuchten Pteriomorpha	37
Abb. 16	Extrahierte genomische DNA	40
Abb. 17	PCR-Produkte der vollständigen 18S rDNA	42
Abb. 18	Strategie der 18S rDNA nested PCR	42
Abb. 19	18S rDNA PCR-Produkte 1 und 2	44
Abb. 20	Coamplifikate bei der 28S rDNA PCR	46
Abb. 21	pCR [®] 2.1 TOPO Vektor	47
Abb. 22	Restriktionsanalyse der Plasmide mit <i>EcoRI</i>	50
Abb. 23	„Strict Consensus“-Baum des 18S rDNA-Datensatzes plus Indizes	63
Abb. 24a	ML-Baum des 18S rDNA-Datensatzes plus Indizes	64
Abb. 24b	Detailansicht für die Pteriomorpha des ML-Baumes aus Abb. 24a	66
Abb. 25	ML-Baum des 18S rDNA-Datensatzes	67
Abb. 26	„Strict Consensus“-Baum des 28S rDNA-Datensatzes plus Indizes	71
Abb. 27	ML-Baum des 28S rDNA-Datensatzes plus Indizes	72
Abb. 28	„Strict Consensus“-Baum des 18S+28S rDNA-Datensatzes plus Indizes	76
Abb. 29	ML-Baum des 18S+28S rDNA-Datensatzes plus Indizes	77
Abb. 30	Detailansicht für die Heteroconchia aus den Abb. 23 und 25	81
Abb. 31	„Strict Consensus“-Baum des aktualisierten 28S rDNA-Datensatzes	84
Abb. 32	Relative Rate Test für vollständige 18S rDNA-Sequenzen	88
Abb. 33	Relative Rate Test für 18S und 28S rDNA-Sequenzen	88
Abb. 34	Evolute Zeitfenster der verwendeten molekularen Marker	90
Abb. 35	Hypothesen zur Phylogenie der Pteriomorpha im Vergleich	91



Abb. 36	Phylogenie der Autobranchia	91
Abbildungen der Zwischenblätter		
Einleitung:	Cartoon von Daryl Van Benschoten	8
Material und Methoden:	Cartoon unter www.promeqa.com	35
Ergebnisse:	DNA-Doppelhelix (FESCH 2000) und DNA-Sequenz (HILLIS et al. 1996)	59
Diskussion:	Cartoon unter www.univie.ac.at/zoologie	78
Anhang:	Photos privat	93
Tabellen		
Tab. 1	Die erdgeschichtlichen Zeitalter im Überblick	25
Tab. 2	Untersuchte Innen- und Außengruppen im Überblick	37
Tab. 3	Untersuchte Pteriomorpha mit Erstbeschreibung und Sammelort	38
Tab. 4	Untersuchte Außengruppen mit Erstbeschreibung und Sammelort	39
Tab. 5	18S rDNA-Datensatz	53
Tab. 6	28S rDNA-Datensatz	56
Tab. 7	18S+28S rDNA-Datensatz	57
Tab. 8	Längen der erhaltenen 18S rDNA-Sequenzen	61
Tab. 9	Längen der erhaltenen 28S rDNA-Sequenzen	68
Tab. 10	Längen der erhaltenen 18S+28S rDNA-Sequenzen	73
Tab. 11	Verteilung der ribosomalen Sequenzen in den Datenbanken	86
Tab. 12	Aktualisierter 28S rDNA-Datensatz	106
Tab. 13	Auflistung der sequenzierten Taxa	108



V.2.4. 28S rDNA-Datenset (aktualisiert)

Systematische Position	Art, Erstbeschreibung Sammelort	DDBJ/EMBL/GENBANK Accession Number
Pteriomorphia		
Arcoidea		
Arcidae	<i>Arca noae</i> Linné, 1758 † <i>Acar plicata</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ307563 AJ307533
Glycymerididae	<i>Glycymeris pedunculus</i> (Linné, 1758) §	AJ307534
Mytiloidea		
Modioliinae	<i>Modiolus auriculatus</i> Krauss, 1848 §	AJ307537
Mytilinae	<i>Mytilus edulis</i> (Linné, 1758) <i>Brachidontes variabilis</i> (Krauss, 1848) § <i>Septifer</i> cf. <i>bilocularis</i> (Linné, 1758) § <i>Gregariella coarctata</i> (Carpenter, 1856) &	Z29550 AJ307536 AJ307535 AJ307538
Lithophaginae		
Pinnoidea		
Pinnidae	<i>Pinna muricata</i> Linné, 1758 § <i>Atrina pectinata</i> (Linné, 1767) †	AJ307560 AJ307557
Pterioidea		
Pteriidae	<i>Pteria macroptera</i> (Lamarck, 1819) § <i>Pinctada radiata</i> (Leach, 1814) <i>Electroma alacorvi</i> (Dillwyn, 1817) § <i>Pulvinites exempla</i> (Hadley, 1914) *	AJ307548 AF137032 AJ307549 AJ307540
Isognomonidae	<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1791) § <i>Isognomon alata</i> (Gmelin, 1791)	AJ307551 AF137033
Malleidae	<i>Malvifundus regulatus</i> (Forsskal, 1775) § <i>Vulsella</i> sp. §	AJ307547 AJ307562
Ostreoidea		
Gryphaeidae	<i>Hyotissa hyotis</i> (Linné, 1758) <i>Hyotissa numisma</i> (Lamarck, 1819) <i>Neopycnodonte cochlear</i> (Poli, 1795)	AF137036 AF137035 AF137034
Ostreidae		
Ostreinae	<i>Ostrea edulis</i> Linné, 1758 <i>Ostrea angasi</i> (Sowerby, 1871) <i>Ostrea chilensis</i> (Philippi, 1845) <i>Ostrea denselamellosa</i> (Lischke, 1869) <i>Ostrea puelchana</i> (d'Orbigny, 1841) <i>Ostrea algoensis</i> (Sowerby, 1871) <i>Ostreola conchaphila</i> (Carpenter, 1857)	AF137047, Z29551 AF137046 AF137045 AF137043 AF137042 AF137041 AF137044
Lophinae	<i>Lopha cristagalli</i> (Linné, 1758) <i>Alectryonella plicatula</i> (Gmelin, 1791) <i>Dendrostrea folium</i> (Linné, 1758) <i>Dendrostrea frons</i> (Linné, 1758)	AF137038 AF137037 AF137040 AF137039
Crassostreinae	<i>Crassostrea ariakensis</i> (Fujita, 1913) <i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791) <i>Crassostrea rhizophorae</i> (Guilding, 1827) <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) <i>Crassostrea rivularis</i> (Gould, 1861) <i>Crassostrea belcheri</i> (Sowerby, 1871) <i>Saccostrea commercialis</i> (Iredale & Roughley, 1933) <i>Saccostrea cucullata</i> (Born, 1778) § <i>Striostrea margaritacea</i> (Lamarck, 1819)	AF137052 AF137050, Z29549 AF137049, Z29547 AF137051, Z29546 Z29548 Z29545 Z29552 AJ344329 , Z29553 AF137048
Anomioidea		
Anomiidae	<i>Anomia ephippium</i> Linné, 1758 † <i>Pododesmus caelata</i> (Reeve, 1859) §	AJ307556 AJ307555
Dimyidae	<i>Dimyaria maoria</i> (Powell, 1937) *	AJ307541



Plicatuloidea		
Plicatulidae	<i>Plicatula plicata</i> (Linné 1767) §	AJ307539
Limoidea		
Limidae	<i>Lima lima</i> (Linné, 1758) §	AJ307558
	<i>Ctenoides annulatus</i> (Lamarck, 1819) §	AJ307550
Pectinoidea		
Spondylidae	<i>Spondylus crassisquamatus</i> Lamarck, 1819 §	AJ307542
	<i>Spondylus hystrix</i> Röding, 1798 §	AJ307561
Pectinidae	<i>Flexopecten glaber</i> (Linné, 1758) ‡	AJ307545
	<i>Aequipecten opercularis</i> (Linné, 1758) ‡	AJ307543
	<i>Mimachlamys varia</i> (Linné, 1758) ‡	AJ307546
	<i>Excellichlamys spectabilis</i> (Reeve, 1853) §	AJ307544
	<i>Pedum spondyloideum</i> (Gmelin, 1791) §	AJ311560
Protobranchia		
Solemyida		
Solemyidae	<i>Solemya togata</i> (Poli, 1795) #	AJ307552
Nuculida		
Nuculanidae	<i>Nuculana pella</i> (Linné, 1767) ‡	AJ307553
Heterodonta		
Lucinoidea		
Lucinidae	<i>Ctena divergens</i> (Philippi, 1850) §	AJ307559
Ungulinidae	<i>Diplodonta</i> cf. <i>subrotundata</i> Issel, 1869 §	AJ307554
Veneroidea		
Veneridae	<i>Chione stutchburyi</i> (Wood, 1828)	AF131018
	<i>Mercenaria mercenaria</i> (Linné, 1758)	AF131019
Tellinidae	<i>Macoma balthica</i> (Linné, 1758)	AF131004
Psammobiidae	<i>Sinonovacula constricta</i> (Lamarck, 1818)	AF131005
Dreissenidae	<i>Dreissena polymorpha</i> (Pallas, 1771)	AF131006, AF131007
	<i>Dreissena bugensis</i> (Andrusov, 1897)	AF131008
Corbiculidae	<i>Corbicula fluminea</i> (Müller, 1774)	AF131009
	<i>Polymesoda maritima</i> (d'Orbigny, 1842)	AF131010
	<i>Polymesoda caroliniana</i> (Bosc, 1801)	AF131011
	<i>Neocorbicula limosa</i> (Maton, 1809)	AF131012
Sphaeriidae	<i>Spaerium corneum</i> (Linné, 1758)	AF131013
	<i>Pisidium dubium</i> (Say, 1817)	AF131014
	<i>Pisidium sterkianum</i> Pilsbry, 1897	AF131015
	<i>Musculium lacustre</i> (Müller, 1774)	AF131016
	<i>Eupera platensis</i> Doello Jurado, 1921	AF131017
Astartacea	<i>Astarte castanea</i> (Say, 1822)	AF131001
Mactridae	<i>Rangia cuneata</i> (Sowerby, 1831)	AF131002
	<i>Mulinia lateralis</i> (Say, 1822)	AF131003

Tabelle 12: Taxa, die in einer aktualisierten phylogenetischen Analyse der 28S rDNA verwendet wurden (siehe Kapitel IV.1.), mit Erstbeschreibung, Sammelort und jener Accession Number, mit der sie in der Embl/Genbank hinterlegt sind. Taxa, die im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurden, sind fettgedruckt. Fußnoten korrespondieren mit folgenden Sammelorten: # Ägäisches Meer (Griechenland); † Trondheim Fjord (Atlantik, Norwegen); ‡ Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien); § Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten); || Charleston (Atlantik, USA); * National Museum von Neuseeland – NMMZ (Pazifik, Neuseeland); & Taboga Island (Golf von Panama, Panama)



V.2.5. Sequenzierte Taxa

Art	18S rDNA	28S rDNA
<i>Acar plicata</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ389630	AJ307533
<i>Aequipecten opercularis</i> (Linné, 1758) †	AJ310482	AJ307543
<i>Anomia ephippium</i> Linné, 1758 †	AJ389661	AJ307556
<i>Arca noae</i> Linné, 1758 †	—	AJ307563
<i>Atrina pectinata</i> (Linné, 1767) †	—	AJ307557
<i>Brachidontes variabilis</i> (Krauss, 1848) §	AJ389643	AJ307536
<i>Ctenoides annulatus</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389653	AJ307550
<i>Dimyaria maoria</i> (Powell, 1937) *	—	AJ307541
<i>Electroma alacorvi</i> (Dillwyn, 1817) §	AJ389641	AJ307549
<i>Excellichlamys spectabilis</i> (Reeve, 1853) §	AJ389648	AJ307544
<i>Flexopecten glaber</i> (Linné, 1758) †	AJ389662	AJ307545
<i>Glycymeris pedunculus</i> (Linné, 1758) §	AJ389631	AJ307534
<i>Gregariella coarctata</i> (Carpenter, 1856) &	AJ414641	AJ307538
<i>Hytissa</i> cf. <i>hyotis</i> (Linné, 1758) §	AJ389632	—
<i>Hytissa</i> cf. <i>numisma</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389633	—
<i>Isognomon legumen</i> (Gmelin, 1791) §	AJ389639	AJ307551
<i>Lima lima</i> (Linné, 1758) §	AJ389652	AJ307558
<i>Lopha cristagalli</i> (Linné, 1758) §	AJ389635	—
<i>Malvifundus regulatus</i> (Forsskal, 1775) §	AJ389640	AJ307547
<i>Mimachlamys varia</i> (Linné, 1758) †	—	AJ307546
<i>Modiolus auriculatus</i> Krauss, 1848 §	AJ389644	AJ307537
<i>Pedum spondyloideum</i> (Gmelin, 1791) §	AJ389649	AJ311560
<i>Pinctada margaritifera</i> (Linné, 1758) §	AJ389638	—
<i>Pinna muricata</i> Linné, 1758 §	AJ389636	AJ307560
<i>Plicatula plicata</i> (Linné 1767) §	AJ389651	AJ307539
<i>Pododesmus caelata</i> (Reeve, 1859) §	AJ389650	AJ307555
<i>Pteria macroptera</i> (Lamarck, 1819) §	AJ389637	AJ307548
<i>Pulvinites exempla</i> (Hadley, 1914) *	AJ414640	AJ307540
<i>Saccostrea cucullata</i> (Born, 1778) §	AJ389634	AJ344329
<i>Septifer</i> cf. <i>bilocularis</i> (Linné, 1758) §	AJ389645	AJ307535
<i>Spondylus crassisquamatus</i> Lamarck, 1819 §	AJ389646	AJ307542
<i>Spondylus hystrix</i> Röding, 1798 §	AJ389647	AJ307561
<i>Vulsella</i> sp. §	AJ389642	AJ307562
<i>Nuculana pella</i> (Linné, 1767) †	AJ389665	AJ307553
<i>Solemya togata</i> (Poli, 1795) #	AJ389658	AJ307552
<i>Yoldiella nana</i> (Sars M., 1865) †	AJ389659	—
<i>Cardiolucina semperiana</i> (Issel, 1869) §	AJ389655	—
<i>Ctena divergens</i> (Philippi, 1850) §	AJ389656	AJ307559
<i>Diplodonta</i> cf. <i>subrotundata</i> Issel, 1869 §	AJ389654	AJ307554
<i>Tropidomya abbreviata</i> (Forbes, 1843) †	AJ389657	—
<i>Antalis inaequicostata</i> (Dautzenberg, 1891) †	AJ389660	—
<i>Antalis perinvoluta</i> (Ludbrook, 1954) §	AJ389663	—
Sipunculida indet. II	AJ389664	—

Tabelle 13: Alphabetische Auflistung aller Taxa, die im Zuge dieser Arbeit sequenziert wurden. Die Zugriffsnummern (Accession Numbers - DDBJ/Embl/GenBank) für die 18S und 28S rDNA Sequenzen sind ebenfalls angeführt. Die Fußnoten korrespondieren mit folgenden Sammelorten: # Ägäisches Meer (Griechenland); † Trondheim Fjord (Atlantik, Norwegen); ‡ Rovinj (Nördliche Adria, Kroatien); § Safaga Bay (Rotes Meer, Ägypten); II Charleston (Atlantik, USA); & Taboga Island (Golf von Pananma, Panama); * National Museum von Neuseeland – NMMZ (Pazifik, Neuseeland)



V.2.6. Bildtafeln der sequenzierten Pteriomorpha

Tafel 1

Mytiloidea, Arcoidea, Plicatuloidea

110

Tafel 2

Pinnoidea, Anomioidea

111

Tafel 3

Pterioidea

112

Tafel 4

Ostreoidea, Limoidea

113

Tafel 5

Pectinoidea

114

Die nachstehenden Abbildungen wurden folgenden Quellen entnommen:

ABBOTT & DANCE 1990 ([§])

OLIVER 1992 (*)

<http://shell.kwansei.ac.jp> (#)



Tafel I

Mytiloidea



*Brachidontes variabilis**
(36,9mm)



*Modiolus auriculatus**
(59,7mm)



*Septifer cf. bilocularis**
(25mm)



*Gregariella spec.**
(12,6mm)

Arcoidea



*Arca noae*⁵
(60mm)



*Glycymeris pedunculus**
(43,7mm)

Plicatuloidea



*Acar plicata**
(21,8mm)



*Plicatula plicata**
(40,6mm)



Tafel II

Pinnoidea



*Atrina pectinata**
(184,0mm)



*Pinna muricata**
(161,0mm)

Anomioidea



Anomia ephippium^s
(60mm)



*Pododesmus caelata**
(19,8mm)



Tafel III

Pterioidea



*Electroma alacorvi**
(53,3mm)



*Pinctada margaritifera**
(98,0mm)



*Isognomon legumen**
(68,9mm)



Pteria macroptera
(77,8mm)



*Malvifundus regulatus**
(64,1mm)



*Vulsella vulsella**
(36,8mm)



Tafel IV

Ostreoidea



*Lopha cristagalli**
(109,6/68,5mm)



*Hyotissa cf. numisma**
(56,5mm)



*Hyotissa cf. hyotis**
(74,3mm)



*Saccostrea cucullata**
(75,8mm)

Limoidea



*Ctenoides annulatus**
(27,2mm)



*Lima lima**
(61,4mm)



Tafel V

Pectinoidea



*Spondylus crassisquamatus**
(69,2mm)



*Spondylus hystrix**
(33,9mm)



*Excellichlamys spectabilis**
(30,8mm)



*Pedum spondyloideum**
(65,5mm)



Aequipecten opercularis[§]
(70mm)



Flexopecten glaber[‡]
(40mm)



Mimachlamys varia[§]
(60mm)



V.3. Curriculum vitae

Name Sabine Elisabeth Hammer
Date of birth May 14, 1968
Place of birth Vienna, Austria
Nationality Austrian
Marital status single
Address ☒Ullmannstraße 53/9, 1150 Vienna, ☎0676/3121860
Email: sabine.hammer@vu-wien.ac.at
Homepage: <http://mailbox.univie.ac.at/~hammers5/>

Education

1974-1978 Primary School, Vienna, Austria
1978-1986 Gymnasium (emphasis on Mathematics and Natural Sciences), Vienna
1986-1989 Studies of Natural Sciences, majored in Biochemistry at the Vienna University
1989-1996 Studies of Natural Sciences, majored in Molecular Genetics – Studium Irregulare (Vienna University, Austria)
1997-2001 Ph.D. studies at the Institute of Zoology, Vienna University
Thesis: Molekulare Phylogenie der pteriomorphen Bivalvia (Mollusca)

Examinations and degrees

1986 Matura, Vienna, Austria
1992 Pre-Diploma in Molecular Genetics (Studium irregulare)
1996 Diploma in Molecular Genetics (Mag.rer.nat., Vienna University, Austria)
Thesis: Molekulargenetische Variabilität und Differenzierung in der Gattung *Rupicapra* (Artiodactyla, Bovidae)

Appointments

1995 Visiting Diploma student at the Institute of Domestication Research (University of Kiel, Germany)
1996-1997 Research scientist at the Research Institute of Wildlife Ecology (University of Veterinary Medicine, Vienna)
1998-2000 Research assistant at the Department of Systematic Zoology and Developmental History (Institute of Zoology, Vienna University, Austria)
1999 Tutorial in the course „Mikrobielle Ökologie: Molekulare Ökologie“ (Institute of Zoology, Vienna University, Austria)
2000 Tutorial in the course „Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken“ (Institute of Zoology, Vienna University, Austria)
2000-2001 Employed at Sigma-Aldrich Austria in the Life Sciences division (Technical Service Support and Product Management)
Since 2001 Research scientist at the Research Institute of Wildlife Ecology (University of Veterinary Medicine, Vienna)



Publications

Peer-reviewed publications

- HAMMER, S., NADLINGER, K. & HARTL, G. B. 1995. Mitochondrial DNA differentiation in chamois (genus *Rupicapra*): implications for taxonomy, conservation, and management. *Acta Theriologica* **Suppl. 3**, 145-155.
- TIEDEMANN, R., HAMMER, S., SUCHENTRUNK, F. & HARTL, G. B. 1996. Allozyme variability in medium-sized and large mammals: determinants, estimators, and significance for conservation. *Biodiversity Letters*, **3**, 81-91.
- HAMMER, S. E., SUCHENTRUNK, F., TIEDEMANN, R. & HARTL, G. B. 1999. Mitochondrial DNA sequence relationships of the newly described enigmatic Vietnamese bovid, *Pseudonovibos spiralis*. *Naturwissenschaften*, **86**, 279-280.
- STEINER, G. & HAMMER, S. 1999. Molecular Phylogeny of Bivalvia (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences. *Zoology*, **102 (Suppl. II, DZG 92.1)**, 10.
- SPITZENBERGER, F., ENGLISCH, H., HAMMER, S., HARTL, G. B. & SUCHENTRUNK, F. 1999. Morphological and genetic differentiation of bank voles, *Clethrionomys glareolus*, from the Eastern Alps. *Folia Zoologica*, **48 (Suppl. 1)**, 69-94.
- STEINER, G. & HAMMER, S. 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences, with particular reference to the Pteriomorpha. In: E. Harper, E. M., Taylor, J. D. & Crame, J. A. (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 11-29.

Manuscripts

- SCHASCHL, H., KAULFUS, D., HAMMER, S. E., SUCHENTRUNK, F. Contrasting patterns of spatial differentiation of mitochondrial and nuclear gene pools in Chamois (*Rupicapra rupicapra*) from the Eastern Alps. (submitted)
- SUCHENTRUNK, F., HAMMER, S. E., NADLINGER, C., NADLINGER, K. F., ALKON, P.U., SCHASCHL, H. Molecular phylogenetic relationships among European brown hares (*Lepus europaeus*) and Israeli hares (*Lepus sp.*) contradict external body characteristics. (in prep)
- HAMMER, S. E., LORENZINI, R., HERRERO, J., PÉREZ-BARBERÍA, F. J., JURDÍKOVÁ, N., SUCHENTRUNK, F. Molecular systematics of the genus *Rupicapra*. (in prep)

Oral Presentations

- HAMMER, S. & HARTL, G. B. 1994. Conservation Genetics of Chamois (genus *Rupicapra*). 2nd International Symposium on Ecological Genetics in Mammals, Lodz, Poland
- HAMMER, S. & SUCHENTRUNK, F. 1996. PCR techniques and application among Mustelids. Mustelid Colloquium, Kollm, Germany
- HAMMER, S. & SUCHENTRUNK, F. 1997. Genetic variability among chamois populations (genus *Rupicapra*) of the Eastern Alps. 2nd World Conference on Mountain Ungulates, Saint-Vincent, Italy
- HAMMER, S. & STEINER, G. 1998. Preliminary Results of Molecular Phylogenetic Studies on Pteriomorph Bivalvia (Mollusca). 13th World Congress of Malacology, Washington, D.C., USA
- HAMMER, S., SPITZENBERGER, F. & SUCHENTRUNK, F. 1998. Sequence variability in the mitochondrial displacement loop and allozymic differentiation of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from the Eastern Alps. 4th International Symposium on Ecological Genetics in Mammals, Vienna, Austria
- HAMMER, S. & STEINER, G. 1999. Preliminary Results of Molecular Phylogenetic Studies on Pteriomorph Bivalvia (Mollusca). 32nd Annual Meeting of the Population Genetics Group, Cambridge, UK
- SUCHENTRUNK, F., JASCHKE, C., HAMMER, S. & HAIDEN, A. 1999. Data on various hypothesis of micro-phylogeography and evolution of brown hares (*Lepus europaeus*). 73rd Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde, Bad Dürkheim, Germany
- STEINER, G. & HAMMER, S. 1999. Molecular phylogeny of pteriomorph Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences. Symposium on the Biology and Evolution of the Bivalvia, Cambridge, UK
- JURDÍKOVÁ, N. & HAMMER, S. 2000. Is the Tatra chamois unique?



STEINER, G. & HAMMER, S. 2000. Phylogeny of pteriomorph Bivalvia inferred from 18S, 28S rDNA, and morphological data. Understanding Molluscan Biodiversity in our Region into the 21st Century, Sydney, Australia

HAMMER, S. & STEINER, G. 2001. Phylogeny of pteriomorph Bivalvia inferred from 18S, 28S rDNA, and morphological data. 14th World Congress of Malacology, Vienna, Austria

Poster Presentations

STEINER, G. & HAMMER, S. 1998. Molecular Phylogeny of Pteriomorph Bivalvia: A working report. Workshop: Molluscs and Molecules, London, UK

SUCHENTRUNK, F., SCHASCHL, H. & HAMMER, S. 1999. Spatial differentiation of mitochondrial gene pools of eastern Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra*) as revealed by RFLP analysis. 73rd Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde, Bad Dürkheim, Germany

STEINER, G. & HAMMER, S. 1999. Molecular Phylogeny of Bivalvia (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences. 92nd Annual Meeting of the Deutsche Zoologische Gesellschaft, Innsbruck, Austria

International Conferences attended

1994

- ◆ 2nd International Symposium on Ecological Genetics in Mammals, Lodz, Poland

1996

- ◆ Mustelid Colloquium, Kollm, Germany
- ◆ 3rd International Symposium on Ecological Genetics in Mammals, Kiel, Germany
- ◆ EU-Meeting „Molecular Tools for Biodiversity“, Vienna, Austria

1997

- ◆ 2nd World Conference on Mountain Ungulates, Saint-Vincent, Italy

1998

- ◆ 13th World Congress of Malacology, Washington, D.C., USA
- ◆ 4th International Symposium on Ecological Genetics in Mammals, Vienna, Austria

1999

- ◆ 32nd Annual Meeting of the Population Genetics Group, Cambridge, UK
- ◆ 92nd Annual Meeting of the Deutsche Zoologische Gesellschaft, Innsbruck, Austria
- ◆ Phylogenetisches Symposium – Homologie und Konvergenzen, Vienna, Austria
- ◆ Symposium on the Biology and Evolution of the Bivalvia, Cambridge, UK

2001

- ◆ Symposium „Decline of the European hares: an interdisciplinary European research task“, Berlin, Germany
- ◆ 14th World Congress of Malacology, Vienna, Austria
- ◆ Hares as umbrella species to evaluate European Agricultural Policies – Workshop for launching an EC research network, Vienna, Austria
- ◆ Life Sciences 2001 – Annual Joint Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, and ÖGBT, Vienna, Austria



V.4. Publikationen

Internationale Fachjournale

Molecular Phylogeny of Bivalvia (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences

G. Steiner¹, S. Hammer¹

¹Institut für Zoologie, Universität Wien, Austria

Morphology based phylogenetic studies on higher bivalve taxa are hampered by multiple cases of parallel evolution in several organ systems (e.g. hinge-ligament system, gill structure, stomach differentiation). The use of 18S rDNA sequences for phylogenetic inference, therefore, seems promising, because ribosomal genes are unlikely to show convergencies due to adaptation to similar ecological niches. We obtained 34 complete bivalve sequences and aligned them to 87 complete or partial molluscan 18S rDNA sequences previously published (Bivalvia: 59, Polyplacophora: 4, Caudofoveata: 1, Scaphopoda: 4, Cephalopoda: 1, Gastropoda: 18). The data matrix was analysed using parsimony, distance and maximum likelihood algorithms and spectral analysis. The most important results are: 1) Bivalve monophyly is not supported due to Polyplacophora emerging between Pteriomorphia and Heterodonta. 2) Protobranchia appear as sister group of either Polyplacophora or Pteriomorphia. 3) Pteriomorphia and Heterodonta are monophyletic. 4) The Unionidae are a sister group to the Heterodonta. 5) Within the Heterodonta, monophyly of the orders Myoidea and Veneroidea is not supported. The families Mactridae, Lucinidae, and Galeommatidae appear monophyletic. The Lucinidae and Galeommatidae form one of the basal clades of the Heterodonta. *Tridacna* sp. and *Cuspidaria abbreviata* join at the base of the heterodont clade with very long branches. 6) The unresolved branching order at the base of the pteriomorph clade points to a rapid radiation of the Mytiloidea, Arcoidea, Pinnidae, and a clade containing Pteriidae and Ostreoidea. The clade of *Plicatula plicata* and the Anomiidae form a sister group to the Limidae and the Pectinoidea. The family Pectinidae is well supported, although the resolution within the group is low.

In general, the current data set provides higher support for family-level taxa in the Pteriomorphia than in the Heterodonta. This may be due to the higher variation and substitution rates among the Heterodonta. The phylogenetic results based on the 18S rDNA sequences are discussed in relation to the current morphological concepts of bivalve evolution.

This study is supported by the "Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung", Austria (project no. P11846-GEN).

Zoology **102** (1999) · Supplement II (DZG 92.1)

STEINER, G. & HAMMER, S. 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences, with particular reference to the Pteriomorpha. In: Harper, E. M., Taylor, J. D. & Crame, J. A. (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 11-29.



Abstracts von Kongreßvorträgen

26.-30. Juli 1998:

World Congress of Malacology, Washington, D.C., USA

Preliminary Results of Molecular Phylogenetic Studies on Pteriomorph Bivalvia

Sabine Hammer & Gerhard Steiner

Institute of Zoology, University of Vienna,

Althanstrasse 14, A - 1090 Vienna, Austria

e-mail: sabine.hammer@univie.ac.at, gerhard.steiner@univie.ac.at

Bivalvia present particularly nasty problems to students of their phylogeny. Morphologists are stunned by the numerous cases of parallel evolution in various organ systems such as shell shape, hinge dentition, mantle siphons, gills, and stomach differentiation. High hopes are, therefore, put into the molecular approach. Previous molecular phylogenetic studies using the 18S rDNA gene produced diphyletic Bivalvia, separated by Polyplacophora and/or Gastropoda. The objective of this study is to investigate phylogenetic relationships between the major groups of the subclass Pteriomorpha, the Arcoidea, Limidea, Mytiloidea, Ostreoidae, Pectinoidea, Pinnoidea, and Pterioidea, based on sequence divergence of 18S rDNA and a partial sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. As outgroups serve representatives of the bivalve subclasses Eulamellibranchia (e.g. Lucinoidea) and Protobranchia as well as Scaphopoda. The data are analysed with parsimony and distance methods, maximum likelihood and spectral analysis with separate and combined data. Preliminary results obtained from seven individuals of pteriomorph Bivalvia show that both, 18S rDNA and COI sequences, do not support bivalve monophyly. While 18S rDNA indicates separate origins of Eulamellibranchia and Pteriomorpha, the COI sequences support their monophyly. A single species of the Limoidea, however, clusters with a gastropod outgroup. Within the Pteriomorpha, the basal position of Mytiloidea in the 18S rDNA tree is in agreement with morphological results. The preliminary COI trees have a pectinid as basal branch.

5.-8. Januar 1999:

32nd Annual Meeting of the Population Genetics Group, Cambridge, UK

Preliminary Results of Molecular Phylogenetic Studies on Pteriomorph Bivalvia

Sabine Hammer & Gerhard Steiner

Institute of Zoology, University of Vienna,

Althanstrasse 14, A - 1090 Vienna, Austria

e-mail: sabine.hammer@univie.ac.at, gerhard.steiner@univie.ac.at

Among the molluscs, the Bivalves represent a class with both, an astonishing diversity and a marked set of 'Lebensform-types'. Eversince scientists have drawn attention to the classification and phylogeny of Bivalves, they could refer to the huge number of fossil records and morphological characters. Eventually it became apparent that parallel evolution in various organ systems due to repeated adaptive radiation into similar ecological niches is a key feature of bivalve phylogeny. The objective of this study is to investigate phylogenetic relationships between the major groups of the subclass Pteriomorpha, the Arcoidea, Limidea, Mytiloidea, Ostreoidae, Pectinoidea, Pinnoidea, and Pterioidea, based on sequence divergence of 18S rDNA and a partial sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. As outgroups serve representatives of the bivalve subclasses Eulamellibranchia (e.g. Lucinoidea) and Protobranchia as well as Scaphopoda. The data are analysed with parsimony and distance methods, maximum likelihood and spectral analysis with separate and combined data.



14.-17. September 1999:

Symposium on the Biology and Evolution of the Bivalvia, Cambridge, UK

Molecular Phylogeny of Pteriomorph Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences

Gerhard Steiner & Sabine Hammer
Institute of Zoology, University of Vienna,
Althanstrasse 14, A - 1090 Vienna, Austria
e-mail: gerhard.steiner@univie.ac.at, sabine.hammer@univie.ac.at

Morphology based phylogenetic studies on higher bivalve taxa are often hampered by multiple cases of parallel evolution in several organ systems (e.g. hinge-ligament system, shell microstructure, gill- and stomach differentiation). The use of the 18S rDNA gene for phylogenetic inference, therefore, seems promising, because it is unlikely to show convergencies due to adaptation to similar ecological niches. 18S rDNA sequence data of 26 pteriomorph and six other bivalve species are presented to assess phylogenetic relationships both among Pteriomorpha and their relationships to other Bivalvia. Trees constructed by Parsimony and Maximum-Likelihood analyses are almost identical. Both Pteriomorpha and Heteroconchia are monophyletic although monophyly of the Autobranchia is not supported. This is probably due to the relatively high overall substitution rate in the Heteroconchia. Monophyletic Protobranchia are the sister group of Pteriomorpha. Low support of the basal pteriomorph branches points to rapid radiation of five major lineages: mytilids, arcids, pinnids, ostreids + pteriids, and a clade containing *Plicatula plicata*, anomiiids, limids and pectinids. *Plicatula plicata* clusters with anomiiids, and limids form the sistergroup of pectinids. The position of limids, *P. plicata*, and the diphyly of Pterioidea suggest a re-evaluation of homology decisions in several morphological characters.

4.-8. September 2000:

Understanding Molluscan Biodiversity in our Region into the 21st Century, Sydney, Australia

Phylogeny of Pteriomorph Bivalvia inferred from 18S, 28S rDNA, and Morphological Data

Gerhard Steiner & Sabine Hammer
Institute of Zoology, University of Vienna,
Althanstrasse 14, A - 1090 Vienna, Austria
e-mail: gerhard.steiner@univie.ac.at, sabine.hammer@univie.ac.at

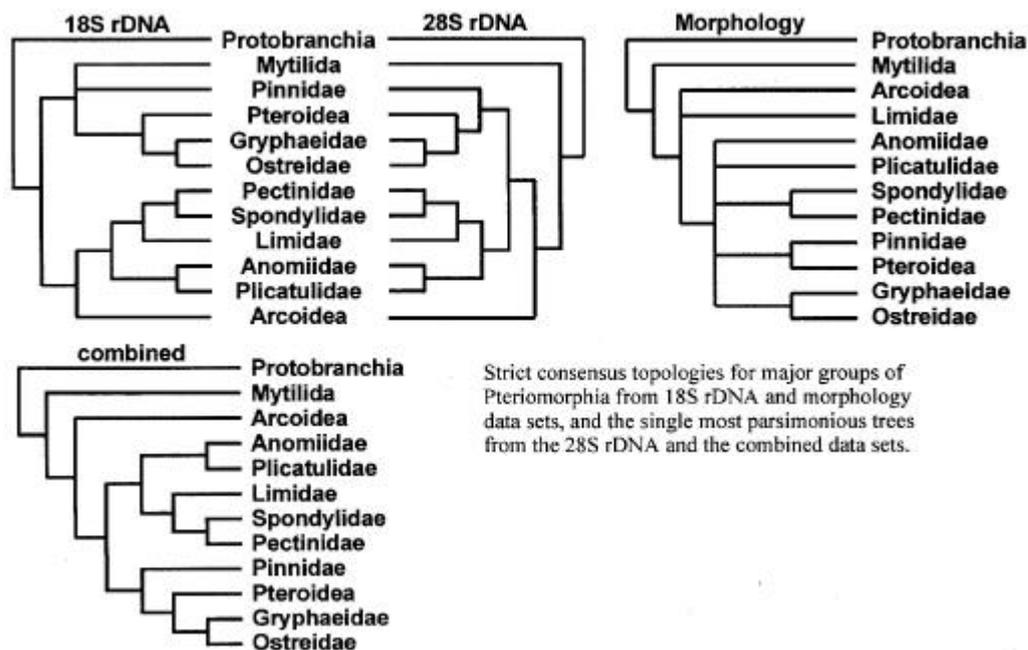
Phylogenetic studies on the Pteriomorpha, a major division of the Bivalvia with Ordovician origins, produced contradictory results, because of convergent and parallel evolution in numerous morphological characters. In the present study, two ribosomal data sets are used to elucidate pteriomorph relationships with molecular characters, expected to be less prone to convergence due to similar life styles (STEINER & HAMMER 2000). The 18S rDNA data set contains 72 pteriomorph and 28 molluscan outgroup sequences; the 28S rDNA (domains D1-D3) data set contains 33 pteriomorph and 2 protobranch outgroup sequences. The combined data set contains 30 ingroup and 2 outgroup taxa. The morphological data set for family-level taxa has 20 characters mainly taken from WALLER (1998). Parsimony, maximum-likelihood (ML), spectral analysis methods are used for phylogenetic analysis. Branch support is calculated by bootstrap, decay, and puzzle indices.

The relative rate test returns significantly lower rates in the 18S rDNA for the Pteriomorpha than for all the other molluscan groups; rates comparison among the pteriomorph families shows higher values for the 28S rDNA, but only moderate correlation between the genes. In general, the branches of family-group taxa have strongest support. The analysis of the 18S data yield 106946 most parsimonious trees (MPT), however, the strict consensus tree shows only a single polytomy for the major groups. The 28S data yield two MPT with the only polytomy being within the Arcoidea. The two genes support similar



topologies differing only in the arrangement of the basal groups Mytilida and Arcoidea. These uncertainties become also apparent in the ML analyses, both in the branching order of these two groups and in very short branch lengths in this area. The most striking discrepancies between the molecular and morphological results concerns the different position of the Limidae and Pinnidae. The unweighted combined analysis yields a single MPT with the same branching order of major groups as in the 28S topology, but with increased branch support.

Parallel or convergent evolution of morphological characters is assessed and discussed under the topology of the combined data. Although the morphological character analysis is still at a preliminary stage, the advantages of a combined molecular-morphological analysis are evident by the increased resolution and branch support.



References

- STEINER, G. & HAMMER, S. 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences, with particular reference to the Pteriomorpha. *In*: Harper, E. M., Taylor, J. D. & Crame, J. A: (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 11-29.
- WALLER, T. R. 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. *In*: Johnston, P. A. & Haggart, J. W. (eds) *Bivalves: An eon of evolution – Paleobiological studies honoring Norman D. Newell*. Calgary University Press, Calgary, 1-45.



19.-25. August 2001:

World Congress of Malacology, Vienna, Austria

Phylogeny of Pteriomorph Bivalvia inferred from 18S, 28S rDNA, and Morphological Data

Sabine Hammer & Gerhard Steiner

Institute of Zoology, University of Vienna,

Althanstrasse 14, A - 1090 Vienna, Austria

e-mail: sabine.hammer@vu-wien.ac.at, gerhard.steiner@univie.ac.at

Phylogenetic studies on the Pteriomorpha, a major division of the Bivalvia with Ordovician origins, produced contradictory results. This can be attributed mainly to highly convergent and parallel evolution in numerous morphological characters. Here, we use two ribosomal data sets to elucidate pteriomorph relationships with molecular characters, expected to be less prone to convergence due to similar life styles (STEINER & HAMMER 2000). The 18S rDNA data set contains 72 pteriomorph and 28 molluscan outgroup sequences; the 28S rDNA (domains D1-D3) data set contains 33 pteriomorph and 2 protobranch outgroup sequences. The combined data set contains 30 ingroup and 2 outgroup taxa. The morphological data set for family-level taxa has 20 selected characters. Parsimony, maximum-likelihood (ML), spectral analysis methods are used for phylogenetic analysis. Branch support is calculated by bootstrap, decay, and puzzle indices.

The relative rate test returns significantly lower rates in the 18S rDNA for the Pteriomorpha than for all the other molluscan groups; rates comparison among the pteriomorph families shows higher values for the 28S rDNA, but only moderate correlation between the genes. In general, the branches of family-group taxa have strongest support. The analysis of the 18S data yield 106946 most parsimonious trees (MPT), however, the strict consensus tree shows only a single polytomy for the major groups. The 28S data yield two MPT with the only polytomy being within the Arcoidea. The two genes support similar topologies differing only in the arrangement of the basal groups Mytilida and Arcoidea. These uncertainties become also apparent in the ML analyses, both in the branching order of these two groups and in very short branch lengths in this area. The most striking discrepancies between the molecular and morphological results concerns the different position of the Limidae and Pinnidae. The unweighted combined analysis yields a single MPT with the same branching order of major groups as in the 28S topology, but with increased branch support.

Parallel or convergent evolution of morphological characters is assessed and discussed under the topology of the combined data. The pteriomorph data set is an example for the advantages of a combined molecular-morphological analysis yielding increased resolution and branch support.

References

- STEINER, G. & HAMMER, S. 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences, with particular reference to the Pteriomorpha. *In*: Harper, E. M., Taylor, J. D. & Crame, J. A: (eds) *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society, London, *Special Publications*, **177**, 11-29.



You're led through your
lifetime by the inner
learning creature, the
playful spiritual being that is
your real self.

Don't turn away from
possible futures before
you're certain you don't
have anything to learn from
them.

You're always free to
change your mind and
choose a different
future, or a different past.

Richard Bach (Illusions)