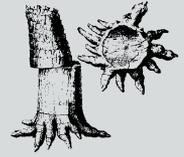


Phylogeographie von *Triops cancriformis*: Welche Spuren hinterließen geologische Ereignisse?



Thorid Zierold, Hull/U.K.

Zusammenfassung

Notostraka sind eine kleine aber sehr alte Ordnung mit einem komplexen Reproduktionssystem. Der vorliegende Bericht zeigt Ergebnisse phylogeographischer Untersuchungen an *Triops cancriformis* auf der Basis von Cytochrom *c* oxidase Untereinheit I (COI) und der kleinen ribosomalen Untereinheit 16S (16S rDNA). Die Sequenz-Diversität wurde für beide Gene in einer Analyse mit drei weiteren *Triops*-Arten untersucht. Eine hohe genetische Diversität zwischen *T. c. cancriformis* und *T. c. mauritanicus* zeigt deutlich, dass letztere als separate Art - wie ursprünglich definiert (GHIGI 1921) - betrachtet werden sollte. Zwischen den Unterarten *T. c. simplex* und *T. c. cancriformis* konnte kein genetisch signifikanter Unterschied gefunden werden. Trotz nur geringer mitochondrialer Variationen konnte eine geographische Struktur innerhalb der Europäischen Populationen aufgezeigt werden. Darüber hinaus zeigen die Daten, dass die nacheiszeitliche Verbreitung auf unisexuelle Individuen zurückgeht mit möglichem Ursprung im mediterranen Raum. Weitergehende Studien sind erforderlich, um dies abzusichern.

Abstract

The Notostraca is a small but ancient crustacean order characterised by a range of reproductive systems. The present paper reports about the investigation of the mitochondrial DNA phylogeography of the tadpole shrimp *Triops cancriformis*, a 'living fossil' with bisexual, female-biased and unisexual populations. Nucleotide sequence variation in cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) and 16S rDNA genes was screened in European populations including the three recognised subspecies. The large sequence divergence in both genes COI and 16S between *T. c. cancriformis* and *T. c. mauritanicus* strongly supports their status as separate species. However, no mtDNA differentiation was found between *T. c. cancriformis* and *T. c. simplex*. The low, but geographically structured mtDNA sequence variation in *T. c. cancriformis/simplex* suggests a recent origin for European populations. Some support for a range expansion involving unisexual or female biased populations was found, but further research is needed to resolve the evolution of *T. cancriformis* reproductive strategies.

1 Einleitung

Die pleistozänen Klimaschwankungen hatten bedeutenden Einfluss auf Populationsgröße und Verbreitung von Organismen (BENNETT et al. 1991; BROWN & LOMOLINO 1998; ADAMS 2004). Diese geographische Dynamik der Organismen ist noch heute dem genetischen Code der Organismen zu entnehmen. Die Untersuchung des Einflusses der Eiszeiten auf die Verbreitung von Organismen ist Gegenstand phylogeographischer Studien (AVISE 2000; HEWITT 2000). So können geographisch isolierte Populationen einer Art mit ausgewählten genetischen Markern differenziert werden. Darüber hinaus können unter Verwendung maternalen Erbgutes (mitochondriale Desoxiribonukleinsäure, mtDNA) Aussagen zur Herkunft nacheiszeitlicher Arten/Populationen getroffen werden (HEWITT 2000; HEWITT 2004).

Organismen mit passiver Verbreitung und unisexueller Fortpflanzung waren in der Besiedlung der nacheiszeitlichen, neuen Lebensräume im Vorteil. Zur Gründung einer Population genügte ein unisexuelles Individuum, ein Geschlechts-

partner war nicht erforderlich. Demnach genießen diese Individuen einen Kolonisationsvorteil gegenüber anderen, sich geschlechtlichen fortpflanzenden Individuen (BAKER'S Gesetz) (BAKER 1955; BAKER 1967). Aus diesem Grund kommen thermophile unisexuelle Organismen, deren Reproduktion entweder parthenogenetisch oder hermaphroditisch erfolgt, heute häufig in früher von der Eiszeit beeinflussten Gebieten vor (KEARNEY 2005).

Notostraken, wie *Triops cancriformis*, weisen einen äußerst komplexen Fortpflanzungsmechanismus auf. Innerhalb einer Art sind sowohl sexuelle als auch unisexuelle (Hermaphroditen) und auch gemischte Populationen nachweisbar. Sexuelle Populationen kommen beispielsweise in Spanien vor. Das Gebiet der Iberischen Halbinsel wird in der Literatur als ein glaziales Refugium diskutiert. Unisexuelle Populationen sind vor allem aus früheren glazialen Bereichen bekannt.

Die passive Verbreitung von *T. cancriformis* wird durch die Hitze-, Kälte-, Druck- und auch vor UV geschützten Dauer-Eier (Cysten) ermöglicht. Die Dauer-Eier können durch Wind, Wasser, Vögel (CÁCERES & SOLUK 2002; GREEN & FIGUEROLA 2005) oder auch durch Landlebewesen wie Amphibien oder Huftiere (FRANK 1986; THIERY 1991; COULSON et al. 2002) verbreitet werden. Die Möglichkeit der passiven Verbreitung sowie die komplexe Fortpflanzungsstrategie sind möglicherweise ausschlaggebend für die Persistenz und weite Verbreitung der Notostraken über Jahrmillionen.

Die vorliegende Studie untersucht auf Basis mitochondrialer DNA-Marker (Cytochrom c Oxidase, COI; kleine ribosomale Untereinheit 16SrDNA) die phylogeographische Struktur Europäischer *T. cancriformis*-Populationen. Darüber hinaus wird die geographische Verbreitung bestimmter Fortpflanzungsstrategien veranschaulicht und diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchte *Triops cancriformis* Populationen

Insgesamt wurden 21 ephemere Gewässer Europas zwischen 2000 und 2004 untersucht (Abb. 1, Tab. 1). Die Proben schließen sowohl Individuen- als auch Sedimententnahmen ein. Das Sediment wurde auf *Triops*-Dauer-Eier untersucht und im positiven Fall für Schlupfversuche eingesetzt. Auf diese Weise konnten Individuen im Labor herangezogen werden, deren Habitate zum Zeitpunkt der Beprobung trocken lagen.

Die meisten der Proben gehören zur nominalen Art *Triops cancriformis cancriformis*, ein geringer Anteil der Proben repräsentiert die nach LONGHURST (1955) definierten Unterarten *simplex* und *mauritanicus* (Abb. 1). Für eine Bewertung der genetischen Diversität der Cytochrom c Oxidase I (COI) wurde von ausgewählten Individuen die 16S rDNA untersucht (Tab. 1). Ausgewählt wurde je ein Individuum einer Population pro COI Haplotype. Zusätzlich wurden in der GenBank vorhandene Sequenzen in die Studie einbezogen (Tab. 2)

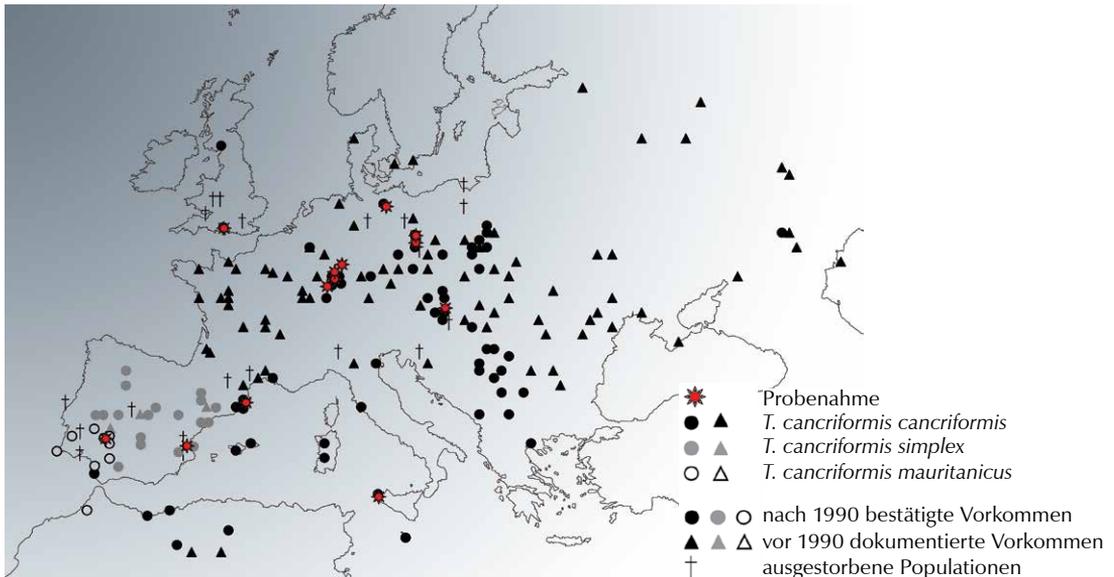


Abb. 1 *Triops cancriformis* Verbreitung und geographische Lage der Probestellen.

Tabelle 1 Herkunft, Populationsindex und Anzahl (n) der untersuchten *Triops cancriformis*-Populationen. Die Populationen Königswartha, Lacoma und Rhein sind differenziert in lokale Populationen.

Land	Regionale Population		Lokale Population		n COI (16S)	geographische Lage	Material	Art	
	ID		ID						
Österreich	DN	Donau, Blumengang	-		1	48°10' N, 16°58' E	Sediment	T.c.c.	
	LN	Neusiedler See, Kaiserlacke	-		3 (1)	47°48' N, 16°51' E	Sediment	T.c.c.	
Deutschland	KW	Fischteiche Königswartha, Sachsen	Kw11	Teich 11	3 (1)	51°19' N, 14°21' E	Sediment	T.c.c.	
			Kw12	Teich 12	3 (1)	51°19' N, 14°21' E	Sediment	T.c.c.	
			Kw21	Teich 21	3	51°19' N, 14°21' E	Sediment	T.c.c.	
			Kw27	Teich 27	3	51°19' N, 14°21' E	Feldproben	T.c.c.	
			Kw28	Teich 28	4	51°19' N, 14°21' E	Feldproben	T.c.c.	
	LA	Fischteiche Lacoma, Brandenburg	La1	Teich 1	2 (1)	51°47' N, 14°23' E	Sediment	T.c.c.	
			La2	Teich 2	3	51°47' N, 14°23' E	Sediment	T.c.c.	
			La3	Teich 3	2	51°47' N, 14°23' E	Sediment	T.c.c.	
R	Rhein, Rheinland-Pfalz	Da		Daxlander Au	3	48°59' N, 08°17' E	Sediment	T.c.c.	
				Ib	Ibersheim	2	49°43' N, 08°25' E	Sediment	T.c.c.
				Ne	Neuburg	3	48°59' N, 08°16' E	Sediment	T.c.c.
				Ha	Hagenbach	3	49°00' N, 08°16' E	Sediment	T.c.c.
	TA	Tannen, Mecklenburg-Vorpommern	-	-	5	53°34' N, 11°26' E	Feldproben	T.c.c.	
Großbritannien	NF	New Forest, Godshill Tümpel	-	-	3 (1)	50°55' N, 01°45' W	Sediment	T.c.c.	
Italien	SC	Monte Cofano, Sizilien	-	-	3 (1)	38°05' N, 12°42' E	Feldproben	T.c.c.	
Spanien	PE	Plat d'Espolla, Banyoles Karstgebiet	-	-	3 (1)	42°10' N, 02°46' E	Feldproben	T.c.s.*	
	EP	El Puig, Valencia	-	-	3 (1)	38°05' N, 12°42' E	Feldproben	T.c.s.*	
	X	Extremadura, Laguna de la Gitanilla	-	-	2 (2)	39°27' N, 06°15' W	Feldproben	T.c.m.*	

* Klassifikation basiert auf ALONSO (1996) und BOIX et al. (2002)

Tabelle 2 Übersicht der zusätzlich verwendeten 16SrDNA Sequenzen (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

Arten	Referenznummer/Herkunft der Sequenz
<i>Triops cancriformis</i>	AB084514, AY115613, AY159571 bis AY159579, TcanJapan (SUNO-UCHI, 1997)
<i>Triops granarius</i>	AF200963 bis AY200971, AY115612; Tgrajapan (SUNO-UCHI, 1997)
<i>Triops longicaudatus</i>	AY115605 bis AY115611, AY159580 und AY159581, TlonTakamatsu, TlonTsuda, TITriopsw (MANTOVANI et al. 2004)
<i>Lepidurus apus lubbocki</i>	AY159582 und AY159583
<i>Lepidurus apus apus</i>	AY159584
<i>Lepidurus lemmoni</i>	AY115614
<i>Lepidurus arcticus</i>	AY159585

2.2 Geschlechtsverhältnis und Reproduktion

Das Geschlechts-Verhältnis, d.h. der Anteil männlicher Individuen innerhalb einer Population, wurde für alle in dieser Studie untersuchten Populationen analysiert. Darüber hinaus wurden in der Literatur vorhandene Daten in die Auswertung einbezogen. Das festgestellte Geschlechtsverhältnis der betrachteten Populationen wurde in Anlehnung an die Studie von SASSAMAN (1991) in vier Kategorien unterteilt: (1) männliche Individuen dominierend, (2) männliche und weibliche Individuen (sexuell) im Verhältnis 1:1, (3) weibliche Individuen dominierend und (4) ausschließlich weibliche Individuen in der Population. Mittels Chi-Quadrat-Test wurde errechnet, inwiefern die beobachtete Anzahl von männlichen und weiblichen Individuen von einem Verhältnis 1:1 abweicht.

2.3 DNA-Amplifikation und Sequenzierung

Für die Extraktion genomischer DNA aus in Ethanol konservierten Proben wurden kommerzielle Extraktions-Kits verwendet (Invisorb Spin Forensic Kit, Invitex; PureGene Kit, Genra Systems). Für wenige Proben wurde die DNA aus den Dauer-Eiern nach der in GÓMEZ & CARVALHO (2000) beschriebenen Methode extrahiert.

Die extrahierte DNA wurde für die COI- und 16S rDNA-Regionen vervielfältigt (amplifiziert). Die COI-Regionen wurden ausgewählt, da diese ein Auflösungsvermögen auf intraspezifischer Ebene besitzen und somit phylogeographische Fragestellungen beantwortet werden können. Die 16S rDNA ist zur Auflösung interspezifischer Verwandtschaftsbeziehungen geeignet.

Die Bedingungen der Amplifikation (Polymerasen-Kettenreaktion, PCR) sowie die verwendeten COI- und 16S rDNA-Primer sind detailliert in der Dissertationsschrift ZIEROLD (2006) beschrieben. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mittels eines Kapillar-Sequenzers (BECKMAN CEQ8000) sequenziert.

2.4 Phylogenetische Rekonstruktion

Bayesian-Algorithmen (HUELSENBECK & RONQUIST, 2001; RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) sowie Maximum-Likelihood-Kalkulationen (GUINDON & GASCUEL 2003) wurden zur Konstruktion phylogenetischer Stammbäume verwendet. Das den Sequenzdaten zugrunde liegende Evolutionsmodell wurde mittels hierarchischem Likelihood-Ratio-Test ermittelt (KEANE et al. 2004). Das Evolutionsmodell GTR+ Γ ist das beste Evolutionsmodell für den COI-Datensatz. Für die Beschreibung des 16S rDNA-Datensatzes war hingegen ein komplexeres Modell erforderlich (TVM+ Γ) (vgl. ZIEROLD 2006).

2.5 Berechnung der Divergenzzeit

Für die Abschätzung der Divergenzzeit der Populationen wurden an Crustacea kalibrierte Molekulare Uhren verwendet. KNOWLTON & WEIGT (1998) entwickelten für die Mangroven-Schnapp-Krabben (*Alpheus*) eine molekulare Uhr für COI. Diese Kalibrierung besagt, dass pro 1 Million Jahre die genetische Sequenz zwischen unterschiedlichen *Alpheus*-Populationen um 1,4% variiert. Eine schnellere COI-Evolutionsrate (1,66-2,33 % Sequenzdivergenz pro eine Million Jahr) wurde für Krabben aufgestellt (SCHUBART et al. 1998). In der Arbeit wurden die Extreme der COI-Evolutionsraten verwendet. Die Auswertung und Kalibrierung der 16S-Daten jamaikanischer Landkrabben (*Sessarma*) resultierte in einer Evolutionsrate zwischen 0,65 und 0,88% (SCHUBART et al. 1998). Diese Spanne der Evolutionsrate wurde für die 16S-Sequenzdaten von *T. cancriformis* verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Diversität der mitochondrialen DNA

3.1.1 Cytochrom c Oxidase Untereinheit I

Insgesamt wurden 60 *T. cancriformis*-Individuen, dies entspricht 2 bis 4 Individuen pro Tümpel, für die Cytochrom c Oxidase I (COI) sequenziert. Die Gegenüberstellung aller Sequenzen (Alignment) des COI-Fragmentes beinhaltet 600 Basenpaare (bp). Nach dem Löschen redundanter Sequenzen konnten fünf unterschiedliche Haplotypen, d.h. Gruppen identischen Sequenzen, identifiziert werden. Diese werden nachfolgend mit A bis E bezeichnet (vgl. Tab. 3, Sequenzen werden vom Autor auf Nachfrage bereitgestellt).

Tabelle 3 COI-Haplotypen A bis E für *Triops cancriformis*. Die Tabelle fasst Anzahl der Individuen sowie die einzelnen Individuen eines Haplotypes zusammen (Co=Coburg, Da=Daxlander Au, DN=Donauaue, EP=El Puig, Hg=Hagenbach, Ib=Ibersheim, KW=Königswartha, LN=Neusiedler See, NF=New Forest, PE=Plat d’Espolla, SC=Sicily, TA=Tannen, X=Extremadura).

Haplotyp	Anzahl der Individuen pro Haplotyp	Individuen eins Haplotypes	Unterart
A	11	Kw11-1, Kw11-2, Kw11-3, Kw21-9, Kw27-1, Kw27-4, Kw27-13, Kw28-3, Kw28-4, Kw28-30, Kw28-32	T.c.c
B	12	Kw12-4, Kw21-1, CO8, CO11, Da2, Da3, PE2, PE5, PE9, EP1, EP2, EP3	T.c.c./T.c.s.
C	32	DN1, LN5, LN6, LN12, NF2, NF6, NF18, CO1, Da1, Hg1, Hg2, Hg3, Ib1, Ib2, Kw12-14, Kw12-17, Kw21-4, La1-2, La1-6, La2-1, La2-7, La2-13, La3-4, La3-5, Ne1, Ne4, Ne5, TA1, TA2, TA3, TA10, TA11	T.c.c.
D	3	SC1, SC2, SC3	T.c.c.
E	2	X1, X2	T.c.m.

Innerhalb *T. c. cancriformis* (*T.c.c.*) wurden drei Haplotypen identifiziert (A, B, C). Die Individuen von Extremadura repräsentieren einen eigenen Haplotyp (E). Trotz der morphologischen Klassifikation in die Unterart *T. c. simplex* (*T.c.s.*) teilen die untersuchten Individuen von El Puig und Plat d’Espolla einen gemeinsamen Haplotyp (B) mit mitteleuropäischen Individuen, welche der nominalen Art (*T. c. cancriformis*) angehören. Die Anzahl unterschiedlicher Haplotypen pro Population liegt zwischen 1 und 3. Die maximale Anzahl unterschiedlicher Haplotypen wurde in Königswartha, im Teich Nummer 21 gefunden (identifizierte Haplotypen A, B und C).

Bei einem Vergleich aller COI-Sequenzen konnten 65 variable Positionen festgestellt werden. Jedoch nur zwei dieser Variationen waren im Parsimony-Verfahren informativ. Die mittlere Sequenzdiversität über alle Haplotypen (A bis E) lag bei 0,0135 (S.E. 0,0020). Innerhalb der *T. cancriformis/simplex*-Haplotypen (A to D) wurde eine Diversität von 0,0065 (S.E. 0,0018) ermittelt.

3.1.2 16S rDNA Gene

Insgesamt 10 ausgewählte Individuen einer Population, die einen entsprechenden COI-Haplotyp repräsentierten, wurden sequenziert. Diese Sequenzen wurden mit 41 Genbank-Datensätzen kombiniert (Alignment-Verfahren) (vgl. Tab. 2). Der überlappende Bereich erlaubte eine Analyse eines 437-bp-Fragmentes.

Die Zusammenfassung redundanter 16S-Sequenzen resultierte in sieben *T. cancriformis* Haplotypen. Die mittlere Sequenzdiversität innerhalb dieser Haplotypen liegt bei 0,0056 (S.E. 0,014). Betrachtet man ausschließlich die *T. cancriformis/simplex*-Haplotypen (1 bis 5), dann ergibt sich eine Diversität, welche im Vergleich zu vorgenannter etwa 2,5 mal kleiner ist (0,0023, S.E. 0,0012).

3.2 Berechnungen zur Divergenzzeit

Die Divergenzzeit wurde zunächst für die Trennung zwischen der *T. c. cancriformis/simplex*-Linie und der *T. c. mauritanicus*-Linie berechnet. Anschließend wurde die Zeit des letzten gemeinsamen Vorfahren für alle *T. c. cancriformis/simplex*-Haplotypen errechnet, um das Auftreten der Spezies in Europa abschätzen zu können.

Unter Verwendung der COI- und 16S-Kalibrierungs-Faktoren für die molekulare Uhr (KNOWLTON & WEIGT 1998; SCHUBART et al. 1998; JARMAN & ELLIOT 2000) konnte eine Divergenzzeit zwischen *T. c. cancriformis/simplex* und *T. c. mauritanicus* von etwa 10 bis 16 Millionen Jahren vor heute basierend auf COI und 4 bis 10 Millionen Jahren vor heute basierend auf 16S ermittelt werden. Die Besiedlung Europas liegt nach COI-Kalibrierung 460.000 bis 760.000 Jahre zurück und mittels 16S-Kalibrierung wird sie auf 660.000 bis 1.410.000 Jahren vor unserer Zeit geschätzt.

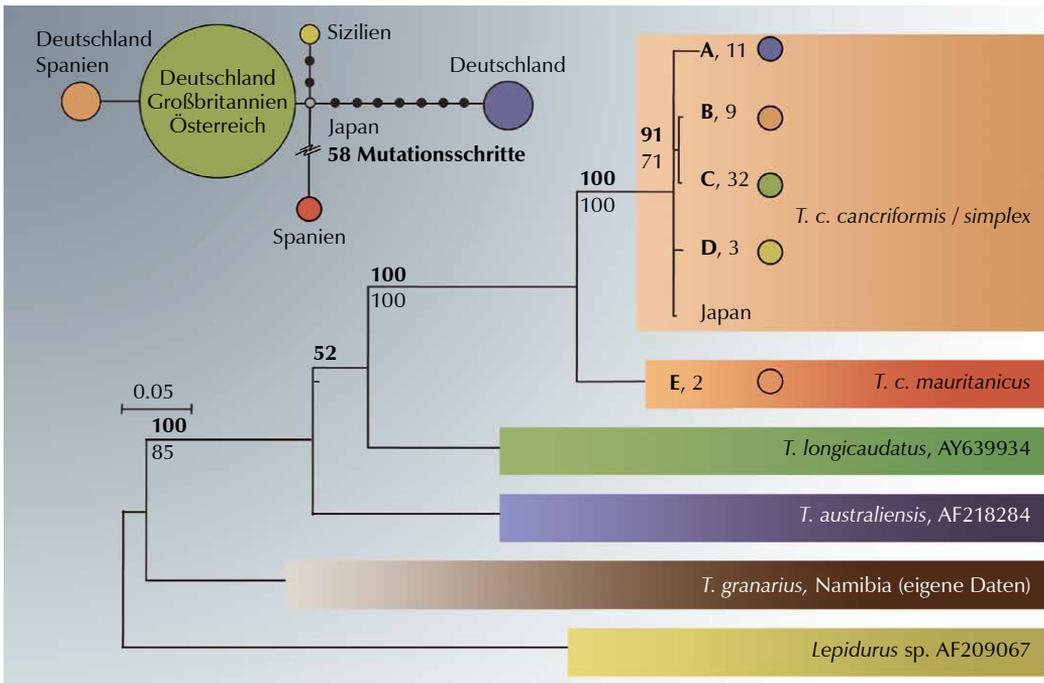


Abb. 2

Maximum-Parsimony-Netzwerk und phylogenetische Rekonstruktion von *Triops* basierend auf COI-Daten. Netzwerk: Der Durchmesser der einzelnen Kreise ist proportional zur Anzahl der Individuen eines Haplotyps. Jede Linie stellt eine weitere Mutation dar; schwarze Kreise zeigen den nicht vorhandenen Haplotypen dieses Mutationsschrittes. Phylogramm: Die fettgedruckten Werte an den Verzweigungen stellen die *a posteriori*-Wahrscheinlichkeiten nach der Bayesian-Analyse dar. Normal gedruckte Werte darunter repräsentieren den Bootstrap-support für die Maximum-Likelihood-Analyse. Die Wurzel ist *Lepidurus*. Für *T. cancriformis* sind die identifizierten Haplotypen und die Anzahl der in jedem Haplotyp vereinten Individuen gekennzeichnet.

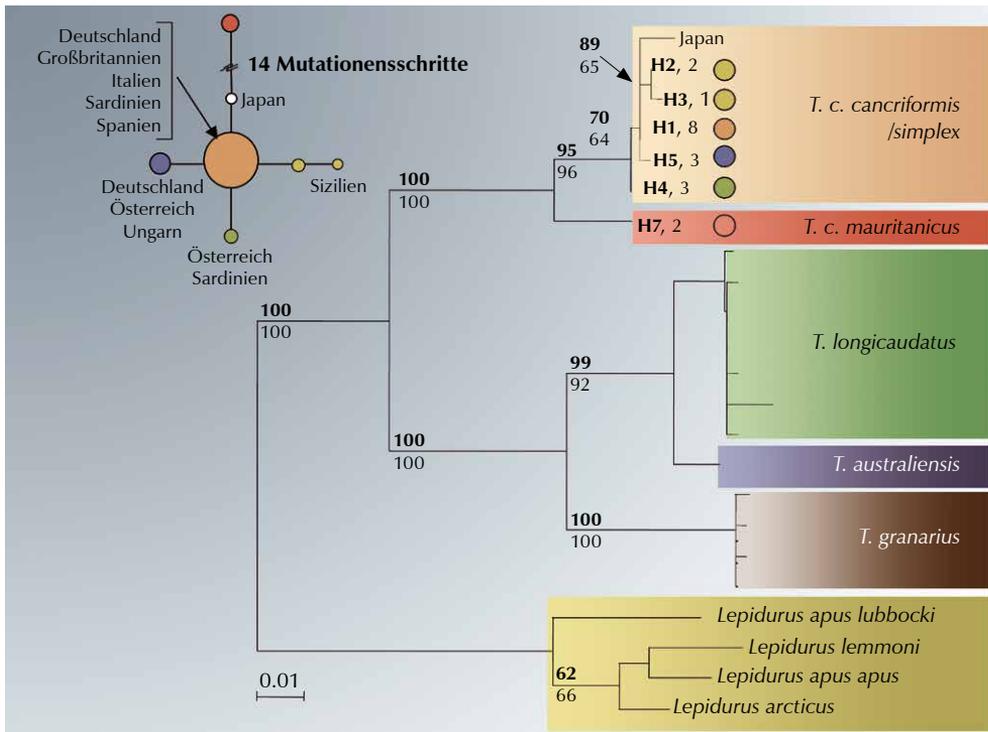
3.3 Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse

3.3.1 Basierend auf Cytochrom c Oxidase Untereinheit I

Maximum-Likelihood- und Bayesian-Analysen führten zu nahezu identischer Topologie der Verwandtschaftsverhältnisse (Abb. 2). Das Dendrogramm zeigt, dass innerhalb von *T. cancriformis* zwei divergente Linien existieren. Eine repräsentiert *T. c. mauritanicus* (Haplotyp E) und die zweite Linie fasst die sehr nah verwandten Haplotypen von *T. c. cancriformis* und *T. c. simplex* (A bis D) zusammen. Innerhalb dieser Linie sind die Unterarten *T. c. simplex* und *T. c. cancriformis* nicht trennbar. Vielmehr haben die spanischen Individuen dieser Unterart den gleichen Haplotyp wie Individuen aus Deutschland. Die *T. c. cancriformis/simplex*-Gruppe bildet zusammen mit der *T. c. mauritanicus*-Linie eine statistisch signifikante, monophyletische Gruppe. Demgegenüber konnte die phylogenetische Beziehung von *T. cancriformis* zu *T. longicaudatus* und *T. australiensis* nicht eindeutig aufgelöst werden. Letztere Spezies stellt jedoch deutlich eine Schwesterart zur basalen Art *T. granarius* dar.

3.3.2 Basierend auf 16srDNA

Maximum-Likelihood- und Bayesian-Analysen führten zu identischer Topologie der Verwandtschaftsverhältnisse (Abb. 3). Innerhalb von *T. cancriformis* können die zwei divergenten Linien der COI-Daten bestätigt werden. Eine Linie repräsentiert *T. c. mauritanicus* (Haplotyp H7), und die zweite Linie fasst die sehr nah verwandten Haplotypen von *T. c. cancriformis* und *T. c. simplex* (H1 bis H6) zusammen. Ähnlich wie im COI-Datensatz unterscheiden sich die Haplotypen

**Abb. 3**

Maximum-Parsimony-Netzwerk und phylogenetische Rekonstruktion von *Triops* basierend auf 16S rDNA-Daten. Netzwerk: Der Durchmesser der einzelnen Kreise ist proportional zur Anzahl der Individuen eines Haplotyps. Jede Linie stellt eine weitere Mutation dar; schwarze Kreise zeigen den nicht vorhandenen Haplotypen dieses Mutationsschrittes. Phylogramm: Die fettgedruckten Werte an den Verzweigungen stellen die *a posteriori*-Wahrscheinlichkeiten nach der Bayesian-Analyse dar. Normal gedruckte Werte darunter repräsentieren den Bootstrap-support für die Maximum-Likelihood-Analyse. Die Wurzel ist *Lepidurus*. Für *T. cancriformis* sind die identifizierten Haplotypen und die Anzahl der in jedem Haplotyp vereinten Individuen gekennzeichnet.

innerhalb dieser Linie (H1 bis H6) nur durch einzelne Mutationen, welches sich im sternförmigen Netzwerk widerspiegelt (vgl. Netzwerk in Abb. 3). Die zwei Notostraken-Gruppen *Lepidurus* und *Triops* sind hoch signifikant monophyletisch. Innerhalb *Triops* sind alle Arten reziprok monophyletisch. Die Analyse zeigt eine nahe Verwandtschaft von *T. australiensis* und *T. longicaudatus* und zeigt deutlich, dass *T. granarius* eine Schwesterspezies beider Arten ist.

3.4 Phylogeographie und Reproduktionsstrategien

Die Auswertung der Daten zum Geschlechtsverhältnis in *T. cancriformis*-Populationen (vgl. Tab. 4, Abb. 4) zeigt, dass ein ausgeglichenes Verhältnis von männlichen zu weiblichen Individuen lediglich in der Population Plat d' Espolla vorliegt. Populationen mit keinem bis sehr geringem Anteil männlicher Individuen überwiegen in Zentral- und Nordeuropa (Deutschland, Österreich, Kroatien, Ungarn, Großbritannien, Polen, vgl. Tab. 4). Für einige Populationen in Österreich, Großbritannien, Frankreich, Italien, Polen und Japan konnten bisher keine Männchen nachgewiesen werden. Aufgrund kleiner Probenumfänge pro Population (<50) sowie mangelhafter Datenbasis zur Gesamtprobenahme kann nicht angenommen werden, dass diese Populationen in der Tat unisexuell sind. Lediglich von der französischen Population Baillargues kann aufgrund des großen Probenumfangs (200 Individuen) davon ausgegangen werden, dass diese unisexuell ist.

Tabelle 4 Gegenüberstellung männlicher und weiblicher Individuen für europäische *Triops cancriformis*-Populationen.

Der Anteil männlicher Individuen gegenüber weiblichen Individuen in einer Population wurde auf der Basis der ermittelten Proportion männlicher Individuen und des Chi-Quadrat-Tests in vier Reproduktionskategorien differenziert: I, männliche Individuen dominieren; II männliche und weibliche Individuen im Verhältnis 1:1; III weibliche Individuen dominieren, IV ausschließlich weibliche Individuen (unisexuell).

Lage	N männliche Individuen	N weibliche Individuen	Anteil männlicher Individuen	p –Wert des Chi ² Testes	Rep.-kategorie	Datenquelle
Österreich, Neusiedler See, Kaiserlacke	0	11	0.0000	0.0009	III	p.d.
Kroatien	9	34	0.2093	0.0001	III	1
Frankreich, Camargue	0	9	0.0000	0.0027	III	2
Frankreich, Baillargues (Montpellier)	0	200	0.0000	<0.0001	IV	3
Deutschland, Bayern	8	1000	0.0079	<0.0001	III	4
Deutschland, Bayern, Augsburg	7	568	0.0122	<0.0001	III	5
Deutschland, Sachsen, Königswartha	3	119	0.0246	<0.0001	III	e.D.
Deutschland, Brandenburg, Lacoma	2	28	0.0667	<0.0001	III	e.D.
Großbritannien, New Forest, Godshill	0	19	0.0000	<0.0001	III	e.D.
Ungarn, Balaton	7	19	0.2692	0.0186	III	6
Japan, Yamakatou	0	20	0.0000	<0.0001	III	2
Polen, Wroclaw (1867)	29	88	0.2479	<0.0001	III	7
Polen, Wroclaw (1865)	114	912	0.1111	<0.0001	III	7
Polen, Wroclaw (1864)	2	9	0.1818	0.0348	III	1
Polen, Wroclaw (1879)	5	19	0.2083	0.0043	III	1
Polen, Krakow (1857)	16	144	0.1000	<0.0001	III	8
Polen, Krakow (1858)	154	395	0.2805	<0.0001	III	8
Polen, Debina	0	10	0.0000	0.0016	III	9
Polen, Jaktorów	0	40	0.0000	<0.0001	III	9
Polen, Jarosy	0	10	0.0000	0.0016	III	9
Polen, Klomnice	0	15	0.0000	0.0001	III	9
Polen, Kludno	0	20	0.0000	<0.0001	III	9
Polen, Zabieniec	0	40	0.0000	<0.0001	III	9
Portugal, Algarve	54	22	0.7105	0.0002	I	10
Portugal, Algarve	19	23	0.4524	0.5371	II	10
Spanien, Plat d’Espolla	1723	1775	0.4927	0.3872	II	11

* [1] BRAEM (1893), [2] AKITA (1976), [3] (MATHIAS, 1937) [4] HEIDECKE & NEUMANN (1987), [5] GASCHOTT (1928), [6] ABONYI (1926), [7] VON SIEBOLD (1871), [8] KOZUBOWSKY (1857), [9] HEMPEL-ZAWITKOWSKA & KLEKOWSKI (1968), [10] MACHADO et al. (1999), [11] BOIX (2002), e.D. = eigene Daten

Die Netzwerke zu COI- und 16S rDNA zeigen die identifizierten Haplotypen, deren Divergenz sowie die Häufigkeit ihres Auftretens innerhalb der untersuchten Individuen (Abb. 2, 3). Trotz einer geringen genetischen Diversität konnte für beide Datensätze eine geographische Struktur gefunden werden (Abb. 5). Der COI-Datensatz beinhaltet drei Haplotypen mit einer geographisch begrenzten Ausbreitung. Haplotyp A konnte nur in den Fischteichen von Königswartha gefunden werden. Für all diese Teiche waren Männchenvorkommen nachgewiesen. Haplotyp D ist ausschließlich in Sizilien vorhanden. Verlässliche Daten zum Reproduktionsverhalten in dieser Population lagen nicht vor. Die Extremadura-Population stellt nicht nur einen eigenen Haplotyp (E) dar, sondern zeigt auch eine hohe genetische Diversität im Vergleich zu den anderen Populationen (die Position des Haplotyps ist im Netzwerk angedeutet). Diese Population wird als bisexuelle Population in Literatur beschrieben, aktuelle Daten sind jedoch nicht vorhanden (PÉREZ-BOTE 2004). Der am weitesten verbreitete Haplotyp C konnte in insgesamt 13 lokalen Populationen nachgewiesen werden (Abb. 5,

**Abb. 4**

Überblick zum Geschlechtsverhältnis von *Triops cancriformis* in Europa (prozentualer Anteil männlicher Individuen im Kreisdiagramm schwarz; Anteil Weibchen weiß).

Deutschland, Großbritannien, Österreich). Die untersuchten Populationen waren entweder unisexuell oder mit sehr geringem Anteil männlicher Individuen. Haplotyp B wurde in deutschen und spanischen Populationen identifiziert. Das Verhältnis weiblicher zu männlichen Individuen in der spanischen Populationen Plat d’Espolla lag bei 1:1. Für die zweite spanische Population (El Puig) war der Anteil männlicher Individuen nicht bekannt. Die deutschen Populationen in diesem Haplotyp hingegen zeigten keinen oder nur sehr geringen Anteil männlicher Individuen.

Die Verbreitung der 16S rDNA-Haplotypen und deren Reproduktionsstatus ist vergleichbar mit den COI-Daten (Abb. 5). Lokale Haplotypen sind ebenfalls Extremadura (H7) und Sizilien (H2/H3). Alle anderen Haplotypen beinhalten Individuen unterschiedlicher Populationen. Der am weitesten verbreitete Haplotyp ist H1; die Individuen stammen aus Italien (Toskana, Ferrara, und Sardinien), Deutschland (Königswartha), Großbritannien (New Forest) und Spanien (El Puig, Plat d’Espolla). Haplotyp H4 fasst Individuen aus Österreich (Morava, Donau) und Italien (Sardinien) zusammen und Haplotyp H5 Individuen aus Österreich (Neusiedler See), Deutschland (Lacoma) und Ungarn (Apaj).

4 Diskussion

4.1 *Triops*-Systematik

Die traditionell akzeptierte Unterteilung von *Triops cancriformis* in drei Unterarten sensu LONGHURST (1955) kann durch die dargestellten Ergebnisse nicht bestätigt werden. So konnte kein genetischer Unterschied zwischen den Unterarten *T. c. cancriformis* und *T. c. simplex* nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen sind kongruent mit morphologischen Untersuchungen (ZIEROLD 2006). Der Unterschied beider Unterarten scheint allein im Geschlechtsverhältnis zu liegen. Hierzu werden von der Autorin gegenwärtig Laborexperimente und Feldstudien durchgeführt (NE/D007496/1). Darüber hinaus zeigten die genetischen Untersuchungen aus COI- und 16S rDNA große Divergenzen zwischen *T. c. mauritanicus* und *T. cancriformis* (17,79% für COI; 3,94% für 16S rDNA). Diese Werte verdeutlichen, dass beide Linien seit langer Zeit eine getrennte Evolutionshistorie haben. Vergleichbare Divergenzen in anderen Crustaceen-Arten sind für den Vergleich von Arten (interspezifisch) - aber nicht intraspezifisch - nachgewiesen (COSTA et al. 2005). Dieser Fakt sowie die Tatsache, dass signifikante morphologische Unterschiede im Vergleich der nominalen Art mit *T. c. maritanicus* auftreten (signifikante Unterschiede mit 95% Konfidenz-Intervall für den Vergleich der Carina-Dornen (vgl. ZIEROLD 2006), zeigen, dass die ursprüngliche Klassifikation von *T. mauritanicus* (GHIGI 1921) als eigenständige Art zutrifft. Diese Ergebnisse decken sich mit den kürzlich publizierten genetischen und morphologischen Untersuchungen von KORN et al. (2006).

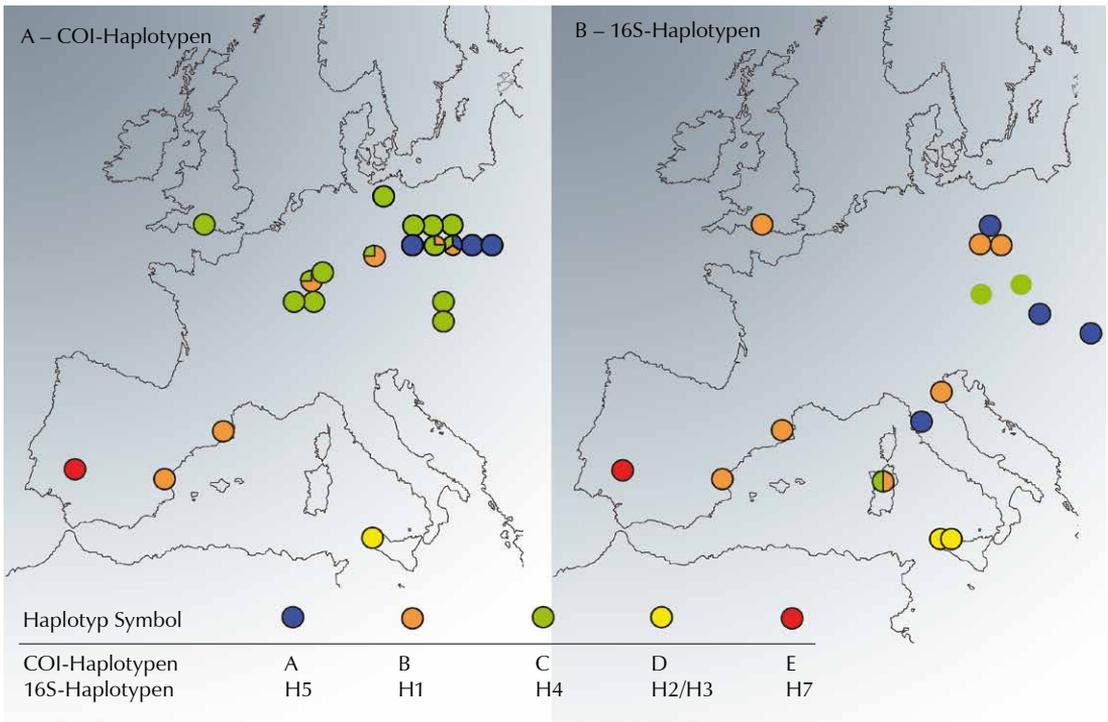


Abb. 5 Geographische Verbreitung der identifizierten COI- und 16S-*Triops cancriformis/mauritanicus*-Haplotypen.

4.2 Spuren geologischer Ereignisse - Phylogeographie und Reproduktionsstatus

Beide Datensätze (COI- und 16S-rDNA) veranschaulichen die Divergenz der *T. (c.) mauritanicus*-Individuen von Südwest-Spanien im Vergleich zu allen anderen analysierten Sequenzen. Auf der Basis der molekularen Uhr für Krebstiere konnte ein Split beider Linien für das Pleistozän und möglicherweise Pliozän errechnet werden. Das herausragende Ereignis während dieser Zeit war die 'Messinian salinity crisis' (ca. vor 6 Millionen Jahren). Aufgrund tektonischer Veränderungen kam es zur Trennung des Mittelmeeres vom Atlantischen Ozean. Diese Trennung und geringer Niederschlag führten dazu, dass das Mittelmeer nahezu komplett ausgetrocknete (KRIJGSMAN et al. 1999). Die zu dieser Zeit herrschenden, lokal unterschiedlichen Klimabedingungen von entweder kalt-trocken oder warm-feucht sind eine mögliche Ursache für die Verkleinerung und Isolierung der Verbreitungsgebiete und somit Anlass für die Trennung von *Triops*-Linien. Vergleichbare, tiefe phylogenetische Verzweigungen innerhalb Spaniens können auch an anderen Arten der Iberischen Halbinsel beobachtet werden, wie z.B. an der Kröte (*Bombina bombina*), dem Igel (*Erinaceus europeus/concolor*) (HEWITT 1996), dem Grasshüpfer (*Chorthippus parallelus*) (COOPER et al. 1995) als auch bei Bären (*Ursus arctos*) (BEEBEE & ROWE 2004). Eine Gehölzart, die eine ähnliche Evolutionsgeschichte aufweist, ist z.B. die Europäische Eiche (*Quercus pedunculata*) (BENNET et al. 1991; FERRIS et al. 1998; HEWITT 1999). Dieses Muster zeigt, dass entweder mehrere Refugialgebiete innerhalb der Iberischen Halbinsel vorhanden waren (GÓMEZ & LUNT 2006) oder Arten Nord-Afrikas an der Kolonisierung beteiligt waren (MARTÍNEZ-SOLANA 2004; VEITH et al. 2004).

Die genetische Diversität und die Divergenz der Haplotypen waren sehr gering innerhalb der *T. c. cancriformis/simplex*-Linien in Europa. Dies lässt darauf schließen, dass die Populationen evolutionshistorisch sehr jung sind, d.h. die Kolonisation der Lebensräume noch nicht lang zurückliegt. Die Berechnung der Divergenzzeit belegt die rezente Besiedlung der ursprünglich vom Glazial beeinflussten Gebiete insofern, dass der Ursprung der Linie von *T. c. cancriformis/simplex* in einem Interglazial der ersten Hälfte des Pleistozäns liegt. Für die Re-Kolonisierung Europas nach der Eiszeit sind mehrere Refugialgebiete in Betracht zu ziehen: Iberische Halbinsel, Apenninen-Halbinsel, Balkan und Kaukasus. In diesen Gebieten war das Klima gegen die glazialen Zyklen gepuffert (HEWITT 2000; BEEBEE & ROWE 2004). Es gilt die Hypothese, dass

nach dem Rückgang des Gletschers die Populationen am nördlichen Rand dieser Refugialgebiete die Besiedlung der vom Eis befreiten Lebensräume beginnen (HEWITT 2000). Die Frage nach der Herkunft der Gründerindividuen für Europäische *T. cancriformis*-Populationen kann auf der Basis dieser Studie nicht abschließend geklärt werden. Hierfür sind weitere Probenahmen und genetische Analysen von *T. cancriformis* erforderlich.

Die Struktur der Haplotypen sowie der Präsenz männlicher Individuen in Populationen wird nachfolgend unter dem Gesichtspunkt einer nacheiszeitlichen Kolonisation betrachtet. Der am meisten divergente Haplotyp (A) konnte ausschließlich in der östlichen Population (Königswartha) identifiziert werden. Dieser Haplotyp kommt in dieser Population mit zwei weiteren Haplotypen vor (B, C). Für diese Situation gibt es zwei mögliche Begründungen: (1) Der Haplotyp A besitzt eine höhere Mutationsrate/höhere genetische Diversität im allgemeinen (z.B. durch höhere 'Outcrossing'-Rate). (2) Ein sekundärer postglazialer Kontakt mit einer Gründerpopulation (-individuum) eines anderen Refugialgebietes ist verantwortlich für die genetische Divergenz. Ein Kontakt unterschiedlicher genetischer Linien verschiedener Refugialräume wurde bei zahlreichen anderen Europäischen Arten nachgewiesen (HEWITT 1996).

Die beiden am weitesten verbreiteten COI-Haplotypen (B und C) sind sehr nah verwandt. Die Populationen dieser Haplotypen beinhalten sowohl unisexuelle Populationen und Populationen mit sehr geringem Anteil männlicher Individuen als auch eine sexuelle Population. Diese Daten lassen vermuten, dass der am weitesten verbreitete Haplotyp C eine entscheidende Rolle in der nacheiszeitlichen Verbreitung spielte. Es ist anzunehmen, dass die Gründung neuer Populationen durch Weibchen stattgefunden hat, die in der Lage sind, die Eier selbst zu befruchten (Hermaphrodit). Die vorhandenen Daten lassen darauf schließen, dass eine von solchen Weibchen (Hermaphroditen) dominierte Population sich rezent aus einem einzigen Refugium im Westen oder Zentrum des Mittelmeerraumes gebildet hat. Dieses Szenario würde der von LONGHURST (1955) aufgestellten Theorie entsprechen, welche besagt, dass während des Pleistozäns für *Triops* geeignete Habitats in südlichen Teilen Europas vorhanden waren und das Zentral- und Nordeuropäische Populationen von unisexuellen Linien abstammen, die sich in den Refugialräumen gebildet haben. Genetische Untersuchungen an Individuen aus Spanien, Frankreich und Italien sind nötig, um dies abzusichern.

Literatur

- ABONYI, S. (1926): The males of *Apus cancriformis* (SCHÄFFER), described on the base of the specimens collected in the region of the lake Balaton biological station of Révfülöp. – Arch. Balaton, **1**: 71-90.
- ADAMS, J. (2004): Europe during the last 150,000 years. <http://www.esd.ornl.gov/projects/qen/nercEUROPE.html>.
- AKITA, M. (1976): Classification of Japanese tadpole shrimps. – Zool. Magazine, **85**: 237-247.
- AVISE, J.C. (2000): Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge, Massachusetts (Harvard University Press).
- BAKER, H.G. (1955): Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. – Evolution, **9**: 347-348.
- BAKER, H.G. (1967): Support for Baker's Law-as a rule. – Evolution, **21**: 853-856.
- BEEBE, T.J.C. & ROWE, G. (2004): An Introduction to Molecular Ecology. Oxford (Oxford University Press).
- BENNET, K.D.; TZEDAKIS, P.C. & WILLIS, K.J. (1991): Quaternary refugia of north European trees. – J. Biogeogr., **18**: 103-115.
- Boix, D. (2002): Estructura i dinàmica de la comunitat animal aquàtica de l'estanyol temporani d'Espolla. Dissertation. Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona.
- BRAEM, F. (1893): Bemerkungen über die Gattung *Apus*. – Z. wissenschaftl. Zool., **56**: 165-187.
- BROWN, J.H. & LOMOLINO, M. V. (1998): Biogeography. second edition edn. Sunderland (Sinauer Associates, Inc. Publishers).
- CÁCERES, C.E. & SOLUK, D.A. (2002): Blowing in the wind: a field test of overland dispersal and colonisation by aquatic invertebrates. – Oecologia, **131**: 402-408.
- COOPER, S.J.B.; IBRAHIM, K.M. & HEWITT, G.M. (1995): Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. – Mol. Ecol., **4**: 49-60.
- COSTA, F.O.; DEWAARD, J.R.; RATNASINGHAM, S.; DOOH, R.; HAJIBABAEI, M. & HEBERT, P.D.N. (2005): Biological Identifications through DNA Barcodes: The Case of the Crustacea. CBOL meeting in London (UK), Feb 7-9, 2005.
- COULSON, S.J.; HODKINSON, I.D.; WEBB, N.R. & HARRISON, J.A. (2002): Survival of terrestrial soil-dwelling arthropods on and in seawater: implications for trans-oceanic dispersal. – Funct. Ecol., **16**: 353-356.
- FERRIS, C.; KING, R.A.; VAINOLA, R. & HEWITT, G.M. (1998): Chloroplast DNA recognises three refugial sources of European oaks and shows independent eastern and western immigrations to Finland. – Heredity, **80**: 584-593.
- FRANK, P.W. (1986): Conchostraca. – Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology, **62**: 399-403.
- GASCHOTT, O. (1928): Beobachtungen und Versuche an *Triops cancriformis* (Bosc). – Zool. Anz., **75**: 267-280.
- GHIGI, A. (1921): Ricerche sui notostraci di Cirenaica e di altri paesi del mediterraneo. – Atti. Soc. Ital. Sci. nat., **60**: 161-188.
- GÓMEZ, A. & CARVALHO, G.R. (2000): Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of con-

temporary and resting egg bank populations. – *Mol. Ecol.*, **9**: 203-214.

GÓMEZ, A. & LUNT, D.H. (2006): Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. In: WEISS, S. & FERRAD, D. (eds.) *Phylogeography in Southern European Refugia: Evolutionary Perspectives on the origins and conservation of European Biodiversity*. Chapter IV. Dordrecht, The Netherlands (Kluwer Academic Publishers).

GREEN, A. J. & FIGUEROA, J. (2005): Recent advances in the study of long-distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. – *Diversity and Distributions*, **11**: 149-156.

GUINDON, S. & GASCUEL, O. (2003): PHYML, version 2.4.4, Auckland, New Zealand, <http://www.lirmm.fr/~guindon/phyml.html>.

HEIDECKE, D. & NEUMANN, V. (1987): Zur Verbreitung und Ökologie von *Triops cancriformis* BOSCH und *Lepidurus apus* L. in der DDR. – *Hercynia N.F.*, **24**: 166-173.

HEMPEL-ZAWITKOWSKA, J. & KLEKOWSKI, R.Z. (1968): The influence of desiccation at different air humidities on hatchability of *Triops cancriformis* (BOSC) eggs. – *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **15** (28): 183-189.

HEWITT, G. (1999): Post-glacial recolonization of European biota. – *Biol. J. Linn. Soc.*, **68**: 87-112.

HEWITT, G.M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. – *Biol. J. Linn. Soc.*, **58**: 247-279.

HEWITT, G.M. (2000): The genetic legacy of the Quaternary ice ages. – *Nature*, **405**: 907-913.

HEWITT, G.M. (2004): Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. – *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Series B-Biol. Sci.*, **359**: 183-195.

HUELSENBECK, J. P. & RONQUIST, F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. – *Bioinformatics*, **17**: 754-755.

JARMAN, S. N. & ELLIOT, N. G. (2000): DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspidae, 'living fossils' from the Triassic. – *J. Evol. Biol.*, **13**: 624-633.

KEANE, T.M., NAUGHTON, T.J. & MCINERNEY, J.O. (2004) ModelGenerator: amino acid and nucleotide substitution model selection, Version 0.6, Maynooth, Ireland, <http://bioinf.nuim.ie/software/modelgenerator>.

KEARNEY, M. (2005): Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. – *Trends Ecol. Evol.*, **20**: 495-502.

KNOWLTON, N. & WEIGT, L. A. (1998): New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. – *Proc. R. Soc. Lond., B* **265**: 2257-2263.

KORN, M.; MARRONE, F.; PÉREZ-BOTE, J.L.; MACHADO, M.; CRISTO, M.; DA FONSECA, C. & HUNDSDOERFER, A.K. (2006): Sister species within *Triops cancriformis* lineage (Crustacea, Notostraca). – *Zool. Scripta*, **35**: 301-322.

KOZUBOWSKY, A. (1857): Über den männlichen *Apus cancriformis* (L.). – *Z. Naturgesch.*, **23**: 312-318.

KRIJGSMAN, W.; HILGEN, F.J.; RAFFI, I.; SIERRO, F. J. & WILSON, D. S. (1999): Chronology, causes and progression of the Messinian salinity crisis. – *Nature*, **400**: 652-655.

LONGHURST, A.R. (1955): A Review of the Notostraca. – *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, **3**: 1-57.

MACHADO, M.; CRISTO, M.; REIS, J. & DA FONSECA, C. (1999): Biological data on *Triops cancriformis mauritanicus* (Chigi, 1921) and *Cyzicus grubei* (Simon, 1886) - Crustacea, Branchiopoda - in SW Portugal temporary ponds. – *Limnetica*, **16**: 1-7.

Martínez-Solana, Ì. (2004): Phylogeography of Iberian *Discoglossus* (Anura: Discoglossidae). – *J. Zool. Syst. Evol. Research*, **42**: 298-305.

MATHIAS, P. (1937): *Biologie des crustacés phyllopoètes*. Paris (Hermann & Cie).

PÉREZ-BOTE, J.L. (2004) : New records of Large Branchiopods (Branchiopoda, Anostraca, Notostraca, and Spinicaudata) from Extremadura (Southwestern Iberian Peninsula). – *Crustaceana*, **77**: 871-877.

RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. – *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.

SASSAMAN, C. (1991): Sex ratio variation in female-biased populations of Notostracans. – *Hydrobiologia*, **212**: 169-179.

SCHUBART, C.D.; DIESEL, R. & HEDGES, S. B. (1998): Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. – *Nature*, **393**: 363-365.

Thiery, A. (1991): Multispecies coexistence of branchiopods (Anostraca, Notostraca & Spinicaudata) in temporary ponds in Chaouia plain (western Morocco): sympatry or syntopy between usually allopatric species. – *Hydrobiologia*, **212**: 117-136.

VEITH, M.; MAYER, C.; SAMRAOUI, B.; BARROSO, D. D. & BOGAERTS, S. (2004): From Europe to Africa and vice versa: evidence for multiple intercontinental dispersal in ribbe salamanders (Genus *Pleurodeles*). – *J. Biogeogr.*, **31**: 159-171.

von Siebold, C.T.E. (1871): *Beiträge zur Parthenogenesis der Arthropoden*. Leipzig (Verlag W. Engelmann).

ZIEROLD, T. (2006): Morphological variation and genetic diversity of *Triops cancriformis* (Crustacea: Notostraca) and their potential for understanding the influence of postglacial distribution and habitat fragmentation, TU Bergakademie Freiberg. 212 pp.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Veröffentlichungen des Museums für Naturkunde Chemnitz](#)

Jahr/Year: 2006

Band/Volume: [29](#)

Autor(en)/Author(s): Zierold Thorid

Artikel/Article: [Phylogeographie von *Triops cancriformis*: Welche Spuren hinterließen geologische Ereignisse? 93-104](#)