

Dissertationen, Master- und Diplomarbeiten

Molekulargenetische Untersuchung in der Gruppe der Möwen (Laridae) zur Erforschung der Verwandtschaftsbeziehungen und phylogeographischer Differenzierung

Viviane Sternkopf

Sternkopf V 2011: Molecular Analysis in sea gulls (Laridae) to reveal genetically relationship and phylogeographic differentiation. *Vogelwarte* 49: 175-177.

Dissertation an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, durchgeführt am Deutschen Meeresmuseum in Stralsund und dem LUMC in Leiden (Niederlande), betreut von Dr. Dorit Liebers-Helbig, Prof. Peter de Knijff und Prof. Klaus Fischer.

Kontaktadresse: Viviane Sternkopf, c/o Dorit Liebers-Helbig, Deutsches Meeresmuseum Stralsund, Katharinenberg 14/20, D-18439 Stralsund; E-Mail: viv.eco@web.de

Für die Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse und der Rekonstruktion historischer Besiedlungsprozesse in der Gruppe der Möwen verwendete man in bisherigen Studien meist klassische Merkmale wie Verhalten, Knochenbau und Gefiederfärbung, die zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen führten (Dwight 1925, Moynihan 1959, Schnell 1970a,b; Chu 1989). Neuere Untersuchungen bedienen sich nun zusätzlich molekularer Marker (Crochet et al. 2000, de Knijff et al. 2001, Liebers et al. 2004), aber auch diese Untersuchungen mit mitochondrialer DNA präsentieren keine voll aufgelöste Phylogenie. Die Untersuchung von Pons et al. 2005 schließt an die Ergebnisse von Crochet et al. (2000) an und erweiterte den Datensatz auf 53 Möwenarten. Auch hier führte die Untersuchung nicht zur vollständigen Auflösung der Phylogenie, dennoch veranlasste sie die Autoren zu einer umstrittenen Nomenklaturreform für die Kleinmöwen. Sie teilten die vormals gültige Gattung *Larus* auf und führten drei weitere Gattungen, *Chroicocephalus*, *Leucophaeus*, *Ichthyaetus* ein.

Ziel meiner Arbeit war es, die evolutionären Beziehungen innerhalb und zwischen den verschiedenen Arten der Möwen (Laridae) eingehender zu erforschen und weitere Methoden zur Aufklärung zu verwenden. Der Großteil der Untersuchungen in dieser Arbeit basiert auf DNA-Sequenzen - mitochondriale Regionen sowie nukleare Intronequenzen. Bei einem molekularen Ansatz wie in meiner Arbeit ist es von enormer Wichtigkeit, einen umfassenden und nicht zu kleinen Datensatz zu behandeln. Dabei wurde auch darauf geachtet, dass die ausgewählten Sequenzen homolog sind und das Alignment robust ist.

Die Stammbaumrekonstruktion der Laridae in dieser Arbeit beruht auf den DNA-Sequenzen des Cytochrom b Gens, der Hypervariablen Region I und der nuklearen Introns LDH 3, GAP 11, VLD 9 und BRM 15. Damit werden zum ersten Mal beide genetischen Marker, mitochondriale und nukleare, gemeinsam betrachtet.

Für eine genauere Betrachtung einzelner Großmöwenarten, verwendete ich eine von Vos et al. (1995) entwickelte Methode genannt AFLP (engl. für amplified fragment length polymorphism). Bei dieser Methode ist kein Vorwissen der untersuchten Gen(om)sequenz notwendig. Mittels Restriktionsenzymen wird die gesamte DNA zuerst fragmentiert und einzelne dieser Fragmente später vervielfältigt und analysiert. Diese Methode erzeugt so viele variable Marker. Zusätzlich handelt es sich um eine schnelle und kostengünstige Methode der molekularen Untersuchung.

Einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt stellten vergleichende Populationsstudien bei Dominikanermöwen (*L. dominicanus*) und Sturmmöwen (*L. canus*) dar. Hier wurde durch die nahe Verwandtschaft innerhalb der Arten nur mitochondriale DNA untersucht, die Gene ND 2 Gen, das Cytochrom b Gen und die Hypervariable Region I.

Mit den von mir verwendeten Genen konnte zwar ebenfalls keine völlige Auflösung der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen erreicht werden, aber der resultierende Stammbaum zeigt deutlich die Monophylie der Gattung *Larus*, deren Anzweiflung bei Pons et al. 2005 bereits zu Nomenklaturänderungen geführt hatte. Die Ergebnisse verdeutlichen auch die dringende Notwendigkeit, weitere neue molekulare Methoden (wie

z.B. SNPs) zum besseren Verständnis in der Rekonstruktion der Phylogenie einzusetzen. Sicher bestätigt werden kann in dieser Studie die Unterteilung in eine basale Möwengruppe, bestehend aus sieben Gattungen, sowie der Gattung *Larus* mit sechs voneinander genetisch differenzierten Gruppen. Eine gute Stützung erfahren alle Gruppen der Gattung *Larus*. Schwerer ist aber erwartungsgemäß die genauere Erstellung der Verwandtschaftsbeziehungen der jüngsten Taxa. Zu ihrer Abgrenzung werden weitere Marker benötigt. Entdeckt wurde in der Studie ein Signal (Deletion in den LDH - Sequenzen), das entscheidend zur Bestimmung der Gruppenmitglieder der basalen, nicht-*Larus* Möwengattungen beiträgt.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit galt der Rekonstruktion der phylogeographischen Geschichte von drei Großmöwenarten, welche mit der AFLP-Methode untersucht wurden: Der europäischen Silbermöwe (*L. argentatus*), der Eismöwe (*L. hyperboreus*) und der Mantelmöwe (*L. marinus*). Diese Taxa haben sich in der Studie von Liebers et al. (2004) und eigenen Untersuchungen als mitochondrial biphyletisch gezeigt, d.h. sie tragen sowohl Clade 1 - als auch Clade 2 - Haplotypen im mitochondrialen Netzwerk. Die biphyletische Verteilung im mt-Haplotypennetzwerk zeigt, wie schnell in Genstambäumen irritierende und verfälschende Signale die tatsächliche Phylogenie der Arten überlagern können.

Alle nearktisch brütenden *hyperboreus* zeigen ausschließlich den Clade 2 Haplotyp, während die Tiere der paläarktischen Brutkolonien die Clade 1 Haplotypen tragen. Bei *L. marinus* zeigen alle paläarktisch brütenden Tiere einen Haplotyp des Clades 1. Dieser findet sich auch im Hauptteil der nearktisch verbreiteten Mantelmöwen. Ein deutlicher Hinweis darauf, dass *L. marinus* in der Tat seinen Ursprung im Clade 1 hat und erst in jüngster Zeit in den Osten Nordamerikas eingewandert ist.

Eine Verteilung der mt-Clades in den Silbermöwen auf Basis der bekannten Unterarten *L. a. argentatus* und *L. a. argenteus* konnte nicht gefunden werden. Beide Clades waren in verschiedenen Verhältnissen in allen untersuchten Populationen nachweisbar. Eine Tendenz der Verteilung ist allerdings erkennbar. Die nördlichen Populationen zeigen einen deutlich höheren Anteil an Individuen mit Clade 1, das Umgekehrte ist in den südlichen Kolonien anzutreffen. Hier bestreiten Vögel mit Clade 2 den größeren Anteil.

Alle drei Arten bestätigen die Vermutung auf mitochondrialer Introgression. Erkennbar wurden in dieser Untersuchung ebenfalls sehr gut die historisch-geographischen Ausbreitungsbewegungen der drei Arten. So erhielt die Eismöwe (*hyperboreus*) seine Clade 1 - Haplotypen von *argentatus*-Individuen aus Nordeuropa und die Mantelmöwe (*marinus*) ihre Clade 2 - Haplotypen von nordamerikanischen Arten, vermutlich *smithsonianus*. Die europäischen Silbermöwen

(*argentatus*) zeigen beide mitochondrialen Clades in allen untersuchten Kolonien mit einem geographischen Gradienten in deren Verteilung. Hier scheinen, nach dem mitochondrialen Netzwerk zu urteilen, Vorläufer der Heringsmöwen ihre Clade 2 Mitochondriengenome in die *argentatus*-Populationen eingebracht zu haben, die anschließend in einer sekundären Ausbreitungswelle über das vollständige Verbreitungsgebiet verteilt wurden. Autosomal erscheinen sogar vier Genlinien, die auf noch mehr Ausbreitungswellen verweisen.

Wie unterschiedlich sich die phänotypische Differenzierung innerhalb von Möwenarten genetisch belegen lässt, zeigen die beiden Teilstudien zu den Dominikanermöwen (*L. dominicanus*) und den Sturmmöwen (*L. canus*). Beide Arten verfügen über klinale phänotypische Variationen (Glutz von Blotzheim et al. 1999, Jiguet 2002) vorrangig in Größe sowie in Gefieder- und Schnabelmerkmalen, die auch in Form von Unterarten belegt sind.

Nach einer Publikation von Jiguet (2002) werden bei Dominikanermöwen, einer auf der gesamten Südhalbkugel verbreiteten Art, vier Unterarten unterschieden. Die in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen der Gene Cyt b, ND 2 und HVR I zeigen eine klare Differenzierung der untersuchten Kolonien. Die Ursprünge der Dominikanermöwen liegen demnach in Südafrika. Von dort erfolgte die Besiedlung von Argentinien, der Kerguelen-Inseln und der Antarktis in mehreren Ausbreitungswellen. In Chile wurde der südamerikanische Kontinent in einem sehr rezenteren Migrationsereignis zum zweiten Mal kolonisiert. Die dort gefundenen Haplotypen sind den südafrikanischen noch sehr ähnlich. Am jüngsten sind die Populationen Neuseelands und der Chatham-Inseln.

Ganz anders zeigte sich die genetische Differenzierung für dieselben Gene bei der Sturmmöwe (*L. canus*) und ihren phänotypisch deutlich unterscheidbaren vier Unterarten. Im mitochondrialen Netzwerk bilden die paläarktischen Taxa *canus*, *heinei* und *kamtschatschensis* eine panmiktische Population. Anders das vierte Taxon *brachyrhynchus*. Dieses nordamerikanische Taxon unterscheidet sich mitochondrial signifikant von den paläarktischen Individuen.

Damit konnten in der vorliegenden Arbeit neue Lösungsvorschläge für komplexe und noch nicht ausreichend erforschte Gruppen innerhalb der Laridae unterbreitet und die phylogenetische Zuordnung zahlreicher Taxa innerhalb der Laridae bestätigt bzw. problematische oder unsichere Beziehungen aufgeklärt werden. Für manche der Fragen ist es jedoch notwendig, weitere Untersuchungen durchzuführen, bei denen zusätzliche Arten und wenn möglich neue Methoden in die Analysen aufgenommen werden.

Das Detektieren variabler Nukleotidpositionen (Punktmutationen), die SNPs genannt werden, ist von grundlegender Bedeutung für die weitere Untersuchung der molekularen Evolution. In Rahmen dieser Arbeit

wurden 32000 Fragmente mittels der CROPS-Analyse untersucht, dabei wurden in 7400 variablen Fragmenten 11000 SNPs gefunden, 24000 Fragmenten ließen keinerlei genetische Variationen erkennen. Somit zeigt sich in eine Rate von einer variablen Position (SNP) in ~500 Nukleotiden, was mit denen in Säugetieren und Menschen vergleichbar ist.

Zukünftig mit diesem umfangreichen Basiswissen eine groß angelegte SNP-Typisierung geplant mit dem Ziel autosomale und sexchromosomale SNPs vergleichend zu analysieren. Des Weiteren können die SNP-Daten auch mit mitochondrialen Daten verglichen werden. Damit ist es hoffentlich möglich, ein noch besseres Verständnis der molekularen Mechanismen von Introgression, prä- und postzygotischer Isolation und Selektion zu gelangen und so die Artbildungsprozesse der Großmöwen besser zu verstehen.

- Beheregaray LB 2008. Twenty years of phylogeography: The state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17: 3754-3774.
- Chu PC, 1998. A phylogeny of the gulls (Aves: Larinae) inferred from osteological and integumentary characters. *Cladistics* 14: 1-43.
- Crochet PA, Bonhomme F, Lebreton JD 2000. Molecular phylogeny and plumage evolution in gulls (Larini). *J Evol Biol* 13: 47-57.

- de Knijff P, Denkers F, van Swlem ND, Kupier M 2001. Genetic affinities within the Herring Gull *Larus argentatus* assemblage revealed by AFLP genotyping. *J Mol Evol* 52: 85-93.
- Dwight J Jr. 1925. The gulls (Laridae) of the World: their plumages, moults, variations, relationships and distribution. *Bulletin of American Museum of Natural History* 52: 63-408.
- Glutz von Blotzheim UN, Bauer KM, Bezzel E 1999. *Handbuch der Vögel Mitteleuropas - Bd.6: Charadriiformes*. Aula Verlag, Berlin.
- Jiguet F 2002. Taxonomy of the Kelp Gull *Larus dominicanus* Lichtenstein inferred from biometrics and wing plumage pattern, including two previously undescribed subspecies. *Bull BOC* 122: 50-71.
- Liebers D, de Knijff P, Helbig AJ 2004. The Herring Gull (*Larus argentatus*) complex is not a ring species. *Proc Roy Soc London B, Biol Sci* 271: 893-901.
- Moynihan M 1959. A revision of the family Laridae (Aves). *American Museum Novitates* 1928: 1-42.
- Pons JM, Hassanin A, Crochet PA 2005. Phylogenetic relationships within the Laridae (Charadriiformes: Aves) inferred from mitochondrial markers. *Mol Phylogenet Evol* 37: 686-699.
- Schnell GD 1970a. A phenetic study of the suborder Lari (Aves) I. Methods and results of principal components analyses. *Syst Zool* 19: 35-57.
- Schnell GD 1970b. A phenetic study of the suborder Lari (Aves) II. Phenograms, discussion, and conclusions. *Syst Zool* 19: 264-302.