

**Molekulare Untersuchungen zur Evolution der Aeolidida (Mollusca,
Gastropoda, Nudibranchia, Cladobranchia) und zur Evolution einer
sekundären Symbiose mit *Symbiodinium* (Dinoflagellata) in den
Aeolidida**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften
der
Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt am
Lehrstuhl für Zoologie und Biologiedidaktik

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Sabrina Bleidißel
Wuppertal, im Dezember 2010

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20110509-151022-7

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20110509-151022-7>]

Erstgutachterin & Betreuerin: Professorin Dr. A. Preisfeld

Zweitgutachterin: Professorin Dr. H. Wägele

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 „Schmetterlinge“ der Meere	3
1.1.1 Die Systematische Stellung und die Biologie der Aeolidida	7
1.1.2 Bisheriger Kenntnisstand zur Evolution innerhalb der Aeolidida	9
1.2 Die Systematische Stellung und die Biologie der Cnidaria als Futter-organismen der Aeolidida	13
1.3 Die Systematische Stellung und Biologie der Endosymbionten: <i>Symbiodinium</i>	15
1.4 Molekulare Analyse	17
1.4.1 Molekulare Marker für phylogenetische Analysen in der molekularen Systematik	17
1.4.2 Molekulare Marker zur Identifizierung von <i>Symbiodinium</i>	19
1.5 Ziele der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Herkunft des Tiermaterials	21
2.2 Molekulare Methoden	28
2.2.1 Isolierung der DNA	28
2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA	28
2.2.3 PCR Bedingungen	29
2.2.4 Aufreinigung der PCR Produkte	33
2.2.5 Klonierung der PCR Produkte	33
2.2.6 "Colony"-PCR zur Charakterisierung der Inserts	35
2.2.7 Aufreinigung und dauerhafte Lagerung der Klone	35
2.2.8 Restriktionsanalyse	35
2.2.9 Sequenzierung der Plasmide und Erstellung der Konsensussequenzen	36
2.2.10 Überprüfung der DNA-Sequenzen	36
2.2.11 Zuordnung der <i>Symbiodinium</i> -Sequenzen	36
2.2.12 Die quantitative Real-Time-PCR	37
2.3 Phylogenetische Analyse der molekularen Daten	39
2.3.1 Alinierung	40
2.3.2 Konkatenierte Datensätze	41
2.3.3 Alinierung der plastidären LSU rDNA	42
2.3.4 Statistische Verfahren	42

2.3.4.1 Basenzusammensetzung	42
2.3.4.2 Sequenzlängen der SSU rDNA.....	43
2.3.4.3 Substitutionssättigung.....	43
2.3.4.4 Sequenzdivergenz	43
2.3.4.5 Bestimmung der relativen Substitutionsraten.....	44
2.3.4.6 Bootstrap Test	44
2.3.4.7 Topologische Tests.....	44
2.3.5 Methoden zur Stammbaumrekonstruktion	44
2.3.5.1 Wahl der Außengruppe für die Phylogenie der Aeolidida	44
2.3.5.2 Distanzverfahren.....	45
2.3.5.3 Maximum-Parsimony	45
2.3.5.4 Maximum-Likelihood.....	45
2.3.5.5 Bayesianische Analyse	46
2.3.5.6 Sekundärstrukturanalysen der SSU rRNA.....	46
2.4 Etablierung verschiedener Symbiosesysteme im Aquarium.....	47
2.5 Identifizierung der Futterorganismen.....	48
2.6 Fluoreszenzmessung als Methode zur Detektion von Photosyntheseaktivität	49
3. Ergebnisse	53
3.1 Rekonstruktion der Phylogenie der Aeolidida.....	53
3.1.1 Alinierungen der Sequenzen.....	53
3.1.2 Stammbaumrekonstruktion der Aeolidida	56
3.1.3 Sequenzanalysen	63
3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rekonstruktion der Phylogenie der Aeolidida	79
3.2 Rekonstruktion der Phylogenie des Genus <i>Phyllodesmium</i>	80
3.2.1 Alinierung der Sequenzen.....	80
3.2.2 Stammbaumrekonstruktion des Genus <i>Phyllodesmium</i>	80
3.2.3 Nahrungsanalysen von <i>Phyllodesmium</i>	82
3.2.4 Zusammenhang zwischen Nahrungsaufnahme und Form der Cerata.....	85
3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rekonstruktion der Phylogenie des Genus <i>Phyllodesmium</i>	87
3.3 Symbiosesysteme	88
3.3.1 <i>Phyllodesmium briareum</i>	88
3.3.1.1 Etablierung des Systems	88

3.3.1.2 Photosynthetische Aktivität der Symbionten in <i>Phyllodesmium briareum</i>	90
3.3.2 <i>Aeolidiella stephanieae</i>	93
3.3.2.1 Etablierung des Systems	93
3.3.2.2 Photosynthetische Aktivität der Symbionten in <i>Aeolidiella stephanieae</i>	93
3.3.3 Vergleichende Beobachtungen zur Nahrungsaufnahme zwischen Aeolidida und nicht-Aeolidida: Gleiche Nahrung – anderes Verhalten bei der Nahrungsaufnahme - keine Symbiose.....	96
3.3.4 Zusammenfassung der untersuchten Symbiose-Systeme	98
3.4 Identifizierung der Symbionten	99
3.5 Relative Quantifizierung der Symbionten	101
3.5.1 Zusammensetzung der Symbionten-Clades in <i>Phyllodesmium briareum</i> und verschiedener Futterkorallen.....	103
3.5.2 Zusammenfassung der Quantifizierung der Symbionten	110
4. Diskussion	111
4.1 Vergleich der Rekonstruktion der Phylogenese der Aeolidida (Gastropoda, Opisthobranchia, Nudibranchia, Cladobranchia) auf der Grundlage molekularer und morphologischer Daten	111
4.2 Sequenzeigenschaften der Aeolidida	118
4.3 Rekonstruktion der Phylogenese des Genus <i>Phyllodesmium</i>	122
4.4 Molekulare Merkmale des Symbionten <i>Symbiodinium</i> stützen die Phylogenese von <i>Phyllodesmium</i>	125
4.5 Identifizierungen der Symbionten	125
4.6 Relative Quantifizierung der Symbionten <i>Symbiodinium</i>	127
4.7 Die Messung der „Effizienz“ der sekundären Symbiose.....	128
4.8 Beginn der Symbiose mit <i>Symbiodinium</i>	133
5. Literaturverzeichnis	134
6. Anhang	150
6.1 Publikationen / Poster	150
6.2 Abkürzungsverzeichnis	151
6.3 Sekundärstrukturen	152

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Evolution der Aeolidida (Mollusca, Gastropoda, Nudibranchia) und ihrer Symbionten, den Dinoflagellaten der Gattung *Symbiodinium*.

Ein Ziel war es, ein phylogenetisches System der Aeolidida auf der Grundlage eines konkatenierten molekularen Datensatzes zu erstellen. Als molekulare Marker wurden die kleine ribosomale Untereinheit des Kerngenoms (SSU rDNA), die große ribosomale Untereinheit des Mitochondriengenoms (mtLSU rDNA) und das Gen für die mitochondriale Cytochromoxidase I (COI) herangezogen. Die Aeolidida können mit diesen Daten mit allen Analyseverfahren als gut gestütztes Monophylum identifiziert werden. Sie spalten sich basal in eine paraphyletische Gruppierung (Gruppe 2) mehrerer zumeist wiederum paraphyletischer Familien und ein abgeleitetes sehr gut unterstütztes Monophylum (Gruppe GA) auf. Letzteres schließt die auch morphologisch gut definierten Aeolidiidae, Facelinidae, Favorinidae und Glaucidae mit ein. Nur die Aeolidiidae sowie die Tergipedidae können als Monophylum erkannt werden. Innerhalb der ansonsten paraphyletischen Facelinidae ist die Gattung *Phyllodesmium* mit hoher Unterstützung monophyletisch. Als ein möglicher Grund für die Paraphylie der Familien können Aufspaltungsereignisse aus dem Taxon Facelinidae heraus diskutiert werden.

Die Sequenzdivergenzen der COI und mtLSU rDNA können als sehr hoch identifiziert werden, wohingegen die Sequenzen der SSU rDNA nur gering divergieren. Bei allen drei Genen nimmt die Sequenzdivergenz auf Familienebene ab. Die Berechnung der Evolutionsgeschwindigkeit zeigt für die SSU rDNA-Sequenzen der Gruppe GA deutlich höhere Evolutionsgeschwindigkeiten als für die restlichen Aeolidida. Dieses wird unterstützt durch hohe GC-Gehalte und mäßige Substitutionsraten. Da sich die Gruppe GA auch morphologisch und ökologisch von der basalen Gruppierung Gruppe 2 unterscheidet, findet sich in der erhöhten Evolutionsrate ein Hinweis auf eine Anpassung an sich wechselnde Umweltbedingungen.

Dieser Trend ist ebenfalls in einer Längenzunahme der Expansionssegmente in den variablen Regionen der SSU rDNA zu beobachten. Eine detaillierte Analyse zeigt darüber hinaus noch die gemeinsame Entwicklung eines Sekundärstrukturmerkmals in der variablen Region V7. Dieses Merkmal verändert sich zunächst gegenüber der Außengruppe in der basalen Gruppierung (Gruppe 2) und nimmt an Komplexität (ein zusätzlicher „loop“ und ein weiterer „stem“) innerhalb der Gruppe GA zu.

Die phylogenetischen Analysen ergeben für das Genus *Phyllodesmium* keine Auflösung der terminalen Taxa. Eine dezidiertere Analyse mit deutlich mehr alinierten Nukleotidpositionen nur für das Taxon *Phyllodesmium* mit *Godiva banyulensis* und *Nanuca sebastiani* als

Außengruppe präsentiert eine robuste Phylogenese. Diesen Daten zur molekularen Evolution wird die Fähigkeit mancher Aeolidida, über ihre mit der aufgenommenen Nahrung erworbenen Symbionten effektive Photosynthese betreiben zu können, gegenübergestellt, um evolutionäre Szenarien zur Etablierung des Systems entwickeln zu können. Eine Voraussetzung für diese Untersuchungen ist neben der molekularen Analyse die erfolgreiche Etablierung der zwei untersuchten *in vivo*-Symbiose-Systeme „*Phyllodesmium briareum* – *Briareum* – *Symbiodinium*“ und „*Aeolidiella stephanieae* – *Aiptasia* sp. - *Symbiodinium*“. An diesen Systemen durchgeführte Messungen der Photosynthese mittels PAM-Fluorometrie zur Beurteilung der Effektivität der Symbiose ergeben eine etablierte Symbiose zwischen *P. briareum* und *Symbiodinium*, während *A. stephanieae* ihre Symbionten *Symbiodinium* nicht über längere Zeit halten kann.

In der molekularen Analyse von *Phyllodesmium* offenbart sich ein stabiles Monophylum, deren Mitglieder sich mit der Ausnahme von *P. koehleri* (frisst Nephtheidae) von Xeniidae ernähren. Kombiniert mit morphologischen Daten fällt auf, dass sowohl die Außengruppe als auch *Phyllodesmium poindimiei* nicht in der Lage sind, Symbionten einzulagern. Die restlichen *Phyllodesmium* Arten nehmen Symbionten auf und lagern sie über Zeiträume von bis zu 117 Tagen ein (*Phyllodesmium longicirrum* Burghardt et al. 2008). Die Außengruppe, *Phyllodesmium poindimiei*, sowie ein weiteres Monophylum aus fünf *Phyllodesmium* Arten besitzen glatte Cerata, während die Vertreter der Monophylums der Xeniidae-fressenden Arten und *Phyllodesmium koehleri* „raue“ Cerata besitzen. Auch hier werden die molekularen Daten durch morphologische Merkmalen gestützt.

Eine Analyse der inkorporierten Symbionten ergibt, dass unter „normalen“ PCR-Bedingungen lediglich *Symbiodinium* Clade A und Clade C identifiziert werden können. Die Arten des Genus *Phyllodesmium* enthalten Symbionten des Clade C. Innerhalb der Sequenzen aus Clade C konnten an drei Stellen Nukleotid-Substitutionen von C zu G nachgewiesen werden, welche Clade C noch einmal in zwei Gruppen aufteilen (CI und CII). In Übereinstimmung mit der *Phyllodesmium*-Evolution ist die Substitution auf die Symbionten der Xeniidae fressenden Arten von *Phyllodesmium*, auf deren Futterkorallen sowie auf *P. koehleri* eingrenzbar.

Eine neu etablierte Methode, die Symbionten auch quantitativ mittels qPCR zu ermitteln, bringt ebenfalls die *Symbiodinium* des Clade D hervor, welches zuvor nicht amplifiziert werden konnte.

1. Einleitung

Können Schnecken Photosynthese betreiben?

Diese Aussage erscheint biologisch Interessierten zunächst einmal fragwürdig, ist doch bekannt, dass es die Cyanobakterien und unter den Eukaryoten die pflanzlichen Organismen (Pflanzen, Algen) sind, die durch den Besitz von Chlorophyll in der Lage sind, Photosynthese zu betreiben. Welche Voraussetzungen müssen aber gegeben sein, damit Schnecken Sonnenenergie zu ihrer Ernährung nutzen können? Sind alle Schnecken dazu befähigt oder ist diese Fähigkeit auf bestimmte Taxa begrenzt?

Diesen Fragen wird sich die nun folgende Einleitung widmen. Zunächst wird eine allgemeine Einführung in das Phänomen der Photosynthese bei Schnecken gegeben. Dann wird die Evolution der Opisthobranchia (Hinterkiemerschnecken), speziell der Aeolidida (Fadenschnecken) erläutert. Neben der systematischen Einordnung werden die Lebensweise der Meeresnacktschnecken sowie ihre Futterorganismen vorgestellt, bevor die tatsächlichen Akteure der Photosynthese, nämlich die Dinoflagellaten als Symbionten der Schnecken, präsentiert werden. Ein weiteres Kapitel befasst sich mit den Grundlagen der molekularen Systematik.

1.1 „Schmetterlinge“ der Meere

Die Opisthobranchia, die Hinterkiemerschnecken, besiedeln als zwittrige Vertreter einer Ordnung innerhalb der Weichtiere (Mollusken) alle Weltmeere und sind aufgrund ihrer Formen- und Farbenvielfalt auch als Schmetterlinge der Meere bekannt (Wägele 2001). Sie haben die Lebensräume vom Litoral bis in die Tiefsee erobert, leben freischwimmend, benthisch oder im Sandlückensystem (Abb. 1.1).



Abbildung 1.1: Opisthobranchia A: *Flabellina exoptata*, Photo: Anthony Holley. B: *Chromodoris quadricolor*, Photo: Christina Stemmer. C: *Nembrotha megalocera*, Photo: Kristina Stemmer.

Pfeil: Hinter dem Herzen sitzende Kiemen. Balken = 1 cm.

Neben der gerade beschriebenen Vielfalt lassen sich innerhalb der Opisthobranchia evolutionär klare morphologische Trends erkennen. So kann beispielsweise die Reduktion der Schale bis hin zu ihrem völligen Verlust in verschiedenen Linien gefunden werden. Die Schale ist ein Sekretionsprodukt des Mantelepithels und dient besonders als Schutzorgan für den Schneckenkörper. Diese kalkhaltigen Sekretionsprodukte sind bereits im Grundmuster der Mollusken in Form von Stacheln, Schuppen oder Platten vorhanden.

Fehlt ein solches Schutzorgan, muss eine andere Verteidigungsstrategie überlebenswichtig werden. Man kann die Entwicklung von alternativen effektiven Verteidigungsstrukturen in Verbindung mit dem Verlust der Schale sehr gut innerhalb der Opisthobranchia beobachten. Beispiele für die verschiedenen Verteidigungsformen sind eine auffällige Warnfärbung, welche den Besitz von toxischen Substanzen signalisiert (Abb. 1.1), oder aber die Fähigkeit, bei Gefahr Körperteile abzuwerfen und diese anschließend zu regenerieren (Schmekel 1979). Diese Art von Verteidigungsstrategie ist bei den Aeolidida, einer Subclade der Opisthobranchia, besonders ausgeprägt: Sie werfen bei Fressgefahr ihre farbigen Körperanhänge (Cerata) ab (Abb. 1.2). Die Aeolidida sind marine Organismen, besitzen aber keine echten Kiemen, sondern nutzen die langen Cerata als respiratorisches Organ (Wägele & Johnsen 2001). Aufgrund dieser langen Fortsätze, bezeichnet man sie als „Fadenschnecken“.

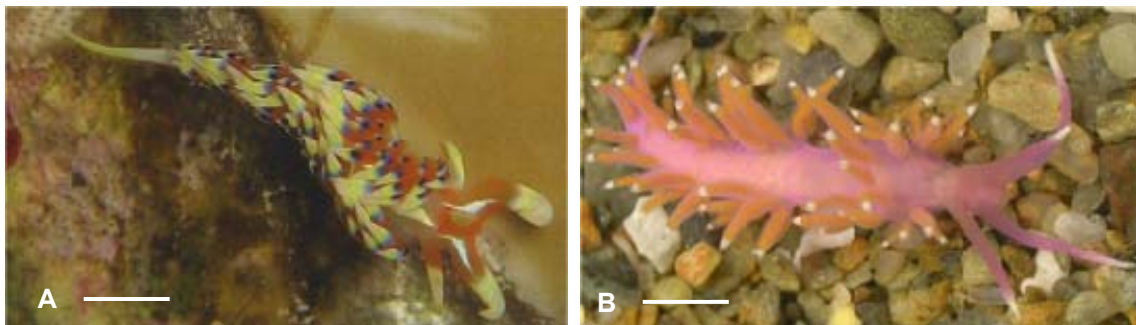


Abbildung 1.2: Aeolidida (Fadenschnecken) mit langen Rückenanhängen (Cerata).

A: *Phidiana indica*; B: *Flabellina pedata*. Balken = 1 cm.

Die meisten Aeolidida ernähren sich von Cnidaria (Nesseltieren). Diese leben häufig in einer Symbiose mit photosynthetisch aktiven Dinoflagellaten, einzelligen Eukaryoten (oftmals auch ungenauerweise Algen genannt), die man in der Symbiose auch als Zooxanthellen bezeichnet. Die symbiontischen Dinoflagellaten gehören zur Gattung *Symbiodinium*. Nähere Einordnungen sind aufgrund der wenigen Merkmale äußerst schwierig.

Das Symbiosesystem

Die hier beschriebenen (Weich)Korallen und Schnecken leben beide in einer Symbiose mit Dinoflagellaten. Dieses Symbiose-System zeichnet sich durch die besondere Fähigkeit aus, dass die Symbionten von einem Wirt auf den anderen übertragen und dort auch genutzt werden können. Aufgrund des hohen Spezialisierungsgrades sind im Normalfall Symbiont und Wirt extrem aneinander angepasst, obwohl sie z. T. auch selbständig leben können. Der hier auftretende Wirtswechsel in Form der Symbiontenübergabe stellt einen Sonderfall in der Biologie dar.

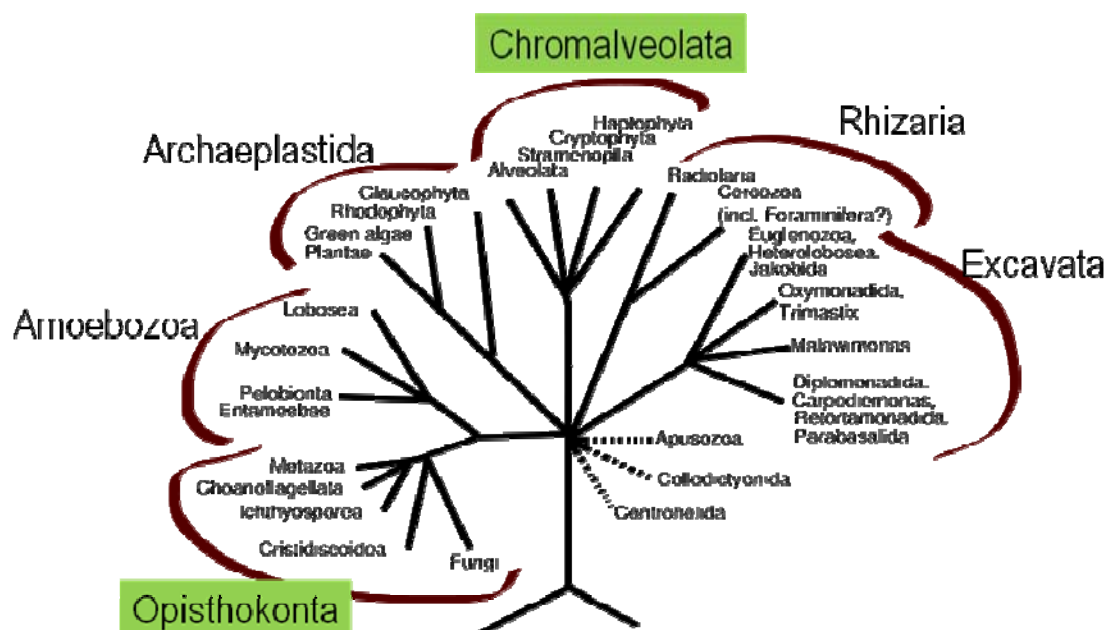


Abbildung 1.3: Schematischer Stammbaum der Eukaryoten. Die in dieser Arbeit behandelten Organismen stammen aus den grün hinterlegten Gruppen (verändert nach Adl et al. 2005).

Die einzelnen Symbiose-Partner stammen aus zwei sehr unterschiedlichen evolutionären Linien (Abb. 1.3): Die Aeolidida gehören zu den Trochozoa (auch Euspiralia genannt), während die Cnidaria als basalere Tiere zu den Eumetazoa gezählt werden. Das heißt, die Fähigkeit, Symbionten einzulagern, ist nicht vertikal zwischen den Aeolidida und Cnidaria vererbt worden. Die Dinoflagellaten hingegen zweigen als eine der Linien innerhalb der Chromalveolaten ab.

Wie oben bereits angedeutet, sind viele Aeolidida und besonders die Gattung *Phyllodesmium* (Abb. 1.4) in der Lage, beim Fressen das Gewebe der Korallen zu verdauen, die dort lebende *Symbiodinium* aber zu erhalten, in das eigene Gewebe einzulagern und über einen längeren Zeitraum in der Mitteldarmdrüse zu speichern (Rudman 1991; Burghardt & Wägele 2004; Burghardt & Gosliner 2006; Burghardt et al. 2008). Über den Mechanismus der Einlagerung ist nichts bekannt, ebenso fehlen nähere Informationen über die Anpassung der eingelagerten Symbionten.

Man kann aber beobachten, dass *Phyllodesmium* durch die Symbiose mit phototrophen *Symbiodinium* längere Zeiträume ohne zusätzliche Nahrungsaufnahme überstehen kann (Burghardt & Wägele 2004; Burghardt & Gosliner 2006; Burghardt et al. 2008b). In solchen Perioden profitiert *Phyllodesmium* von den bei der Photosynthese entstehenden Produkten seiner Symbionten und bietet



Abbildung 1.4: *Phyllodesmium briareum* auf *Briareum violaceae* (Anthozoa). Balken = 1 cm.

den Dinoflagellaten in Gegenleistung ein geschütztes Habitat sowie gelöste Nähr- und Mineralstoffe. Von anderen Vertretern der Aeolidida ist bekannt, dass sie ebenfalls *Symbiodinium* aufnehmen und einlagern, allerdings ist über die "Qualität" dieser Symbiose, d. h. ob ein Austausch von Nährstoffen stattfindet, bisher nicht viel bekannt (Kempf 1991; Rudman 1981a). Eine gut etablierte Symbiose könnte bedeuten, dass der Wirt durch die Photosynthese-Produkte des Symbionten längere Hungerperioden überleben kann (Rudman 1991). Manche Arten aber, wie *Aeolidiella stephanieae*, scheinen ohne Futter nicht lange überleben zu können, obwohl sie Symbionten eingelagert haben. Als Begründung dafür wird ihre weniger verzweigte oder gänzlich unverzweigte Mitteldarmdrüse angeführt, aufgrund derer *Symbiodinium* offensichtlich nicht effektiv eingelagert werden kann (Rudman 1982; 1991; Burghardt & Wägele 2006).

Die Aeolidida sind also zum Teil in der Lage, photosynthetisch aktive Symbionten aufzunehmen, in ihrer Mitteldarmdrüse einzulagern und deren Photosyntheseprodukte für sich nutzbar zu machen. Eine Möglichkeit zu messen, ob die Symbionten tatsächlich aktive Photosynthese betreiben, bietet die PAM-Methode (Pulse-Amplitude-Modulated Fluorometrie), die bereits von Wägele und Johnsen (2001) bei den Opisthobranchia erfolgreich angewendet wurde. Eine konstante Photosyntheserate wird als stabiles Miteinander von Symbiont und Schnecke gewertet.

Um die Evolution des hier behandelten Systems voneinander abhängiger Organismen, nämlich Koralle – Meeresnacktschnecke – Dinoflagellat, nachvollziehen zu können, wird zunächst eine Einordnung der Schnecken nach dem jetzigen Stand der Forschung vorgenommen. Im Anschluss werden die Korallen als Futterorganismen für die Aeolidida vorgestellt und abschließend die Dinoflagellaten beschrieben.

1.1.1 Die Systematische Stellung und die Biologie der Aeolidida

Die hier näher zu bearbeitenden Aeolidida gehören zu den Nudibranchia, den Nacktkiemern. Diese bilden das artenreichste Taxon innerhalb der Opisthobranchia.

Die Bezeichnung Aeolidida wird gemäß Bouchet et al. (2005) gewählt. In der Literatur ist eine Bezeichnungsvielfalt für die Gruppe zu finden, auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll.

Bevor die Aeolidida detaillierter beschreiben werden, wird kurz auf die hierarchischen Positionen der Aeolidida mit Hilfe eines vereinfachten Schemas eingegangen (Abb. 1.5). Die zu den Gastropoda (Schnecken) gehörenden Heterobranchia (Verschiedenkiemer) setzen sich nach Bouchet et al. (2005) u. a. aus den Opisthobranchia (Hinterkiemer) und den hier nicht weiter zu behandelnden Pulmonata (Lungenschnecken) zusammen. Die Opisthobranchia beinhalten die Nudibranchia, welche auch die Bezeichnung Nacktkiemer tragen. Diese wurden erstmals von Cuvier (1817) beschrieben und eingeordnet. Er erkannte, dass Nudibranchia weniger mit den Würmern als vielmehr mit den beschalten Schnecken

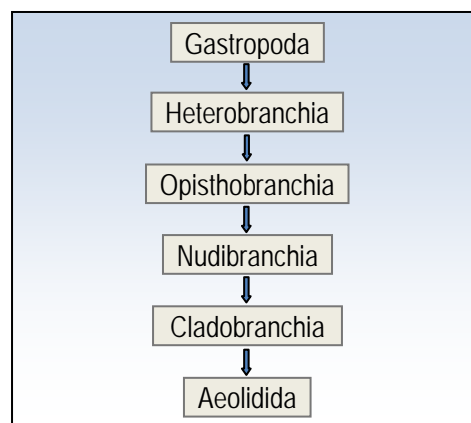


Abbildung 1.5: Vereinfachte hierarchische Darstellung der hier verwendeten Taxonomiebezeichnungen (verändert nach Bouchet et al. 2005)

gemein haben. Besonders das Merkmal gut sichtbarer (nackter) Kiemen hinter dem Herzen (vgl. Pfeil in Abb. 1.1) unterschied sie von anderen Evertebraten. Er fasste daher alle Schnecken mit gut erkennbaren äußeren Kiemen als Nudibranchia zusammen. Lamarck (1819) behielt Cuviers Einordnung bei, nannte sie aber „Les Tritoniens“. Ferussac (1822) teilte sie in Anthobranches und Polybranchies auf, bevor Milne-Edwards (1848) die Nudibranchia als Familie zu den Opisthobranchia stellte. Die Polybranchia werden heute als Cladobranchia bezeichnet und sind ein Untertaxon der Nudibranchia. Zu ihnen gehören die Aeolidida als informelles Taxon.

Die Nudibranchia (Blainville, 1814) besitzen nur wenige eindeutige Merkmale, die eine Einordnung ermöglichen. Aus diesem Grund ist und war das Taxon lange Gegenstand verschiedener Diskussionen (Edmunds 1968; 1971; 1981; Gosliner 1979; Schmekel &

Portmann 1982; Schmekel 1985). Eine umfassende Hypothese zur Phylogenie der Nudibranchia stellten Wägele & Willan (2000) auf. Die Hypothese basiert auf der Analyse morphologischer Daten und enthält als neu eingeführtes Taxon die Nudipleura, welche die Schwestergruppen Nudibranchia und Pleurobrancoidea enthält. Die Monophylie der Nudipleura ist sowohl durch morphologische als auch durch molekulare Analysen inzwischen mehrfach gestützt worden (Schmekel 1985; Salvini-Plawen 1990; 1991; Mikkelsen 2002; Wägele & Willan 2000; Wägele et al. 2003; Grande et al. 2004a; 2004b). Die Nudibranchia bestehen aus den Schwestergruppen Anthobranchia und Cladobranchia (Wägele & Willan 2000), wobei die hier bearbeiteten Aeolidida gemeinsam mit den Dendronotoidea und Arminoidea die Cladobranchia bilden (Schmekel 1985; Wollscheid & Wägele 1999; Wägele & Willan 2000; Wollscheid-Lengeling et al. 2001; Pola & Gosliner 2010).

Die im besonderen Interesse dieser Arbeit stehenden Aeolidida kommen in allen marinen Lebensräumen vor. Dementsprechend haben sich ihre Ernährungs- und Lebensweisen an die unterschiedlichen Biotope im Meer angepasst. Sie leben in nahezu allen Meerestiefen in der Nähe ihrer bevorzugten Futterquellen. Dabei handelt es sich häufig um Cnidaria (hauptsächlich Hydrozoa und Anthozoa). Bis auf wenige Ausnahmen sind alle Aeolidida in Benthos-Nähe zu finden.

Abbildung 1.6 zeigt den schematischen Körperbau der Aeolidida. Sie zeichnen sich durch eine schlanke, gestreckte Körperform mit deutlich erkennbaren Rückenanhängen aus, die als Cerata bezeichnet werden. In die Cerata ziehen Fortsätze der Mitteldarmdrüse, die in der Regel in einem Cnidosack enden. Die als olfaktorische Sinnesorgane dienenden Rhinophoren haben keine Scheiden; Labialtentakel sind meist zu finden. In der schematischen Darstellung (Abb. 1.6) befinden sich die Labialtentakel oberhalb der Mundöffnung. Ein Velum ist nur noch bei *Embletonia* zu finden (Schmekel & Portmann 1982).

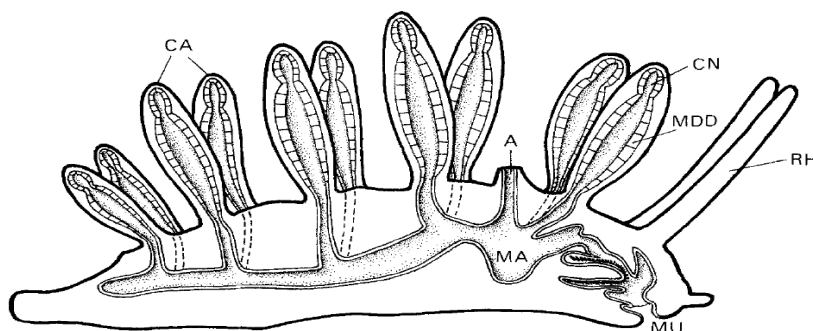


Abbildung 1.6: Schematischer Körperbau der Aeolidida nach Schmekel & Kälker (1976). CA: Cerata; A: Anus; CN: Cnidosack; MA: Magen; MDD: Mitteldarmdrüse; MU: Mund; RH: Rhinophore

Der sich dem Mund anschließende Oesophagus trägt laterale Kiefer und eine „vorgelagerte“ Radula. Die Radula ist meist uni- bis triserial, in seltenen Fällen auch mehrreihig und dient als gutes Bestimmungsmerkmal. Als weiteres wichtiges Bestimmungsmerkmal wird das Genitalsystem herangezogen, welches hier nicht dargestellt ist.

Durch ihre meist kriechende Fortbewegung sind die Aeolidida nur begrenzt mobil. Dies macht es nahezu unmöglich, vor Fressfeinden zu flüchten, bzw. bei Verdriftung schnell zur Futterkoralle zurückzukehren. Daher haben sich in vielen Gattungen besondere morphologische Anpassungen entwickelt, die zu der sehr heterogenen Gruppe der Nudibranchia geführt haben. Ihre phylogenetische Einordnung in das System der Organismen wurde durch die Heterogenität der Gruppe deutlich erschwert, so dass die verwandtschaftlichen Beziehungen der einzelnen Spezies zueinander extrem unsicher sind und oftmals nur informelle Gruppen gebildet werden.

1.1.2 Bisheriger Kenntnisstand zur Evolution innerhalb der Aeolidida

Versuche, die verwandtschaftlichen Positionen der einzelnen Taxa innerhalb der Aeolidida zu dokumentieren, wurden immer wieder unternommen. So unterteilte Odhner (1939) die Aeolidacea (heutige Aeolidida) in Pleuroprocta, Acleioprocta und Cleioprocta. Seine Einteilung basiert auf den Lageverhältnissen von Enddarm, After und Leberästen zueinander. Sein Drei-Gruppen-System reichte allerdings nicht aus, da die verwendeten Merkmale oftmals schon bei den Spezies einer Gattung variieren (Gosliner 1979). Wägele und Willan (2000) definieren die Aeolidida nach einer früheren Arbeit von Odhner (1934) in die Notaeolidiidae, Flabellinidae, Calminidae, Aeolidiidae, Facelinidae, Embletoniidae, Fionidae, Glaucidae, Pseudovermididae, Eubranichidae und Tergipedidae.

Es ist zu bemerken, dass das System der Aeolidida bislang recht ungeklärt erscheint. Allen bisherigen Arbeiten gemein ist jedoch die geringe Taxonzahl, aufgrund derer es oftmals zu nicht aufgelösten oder zweifelhaften Positionen kommt. Damit wird verständlich, wieso über die verwandtschaftlichen Zusammenhänge innerhalb dieser Gruppe bisher keine umfangreichen Informationen vorliegen. Auch eine sehr umfassende morphologische Analyse der Nudibranchia von Wägele und Willan (2000) zeigte nicht für alle Aeolidida (Abb. 1.7) aufgelöste Verzweigungen, so dass die verwandtschaftlichen Verhältnisse bislang ungeklärt bleiben.

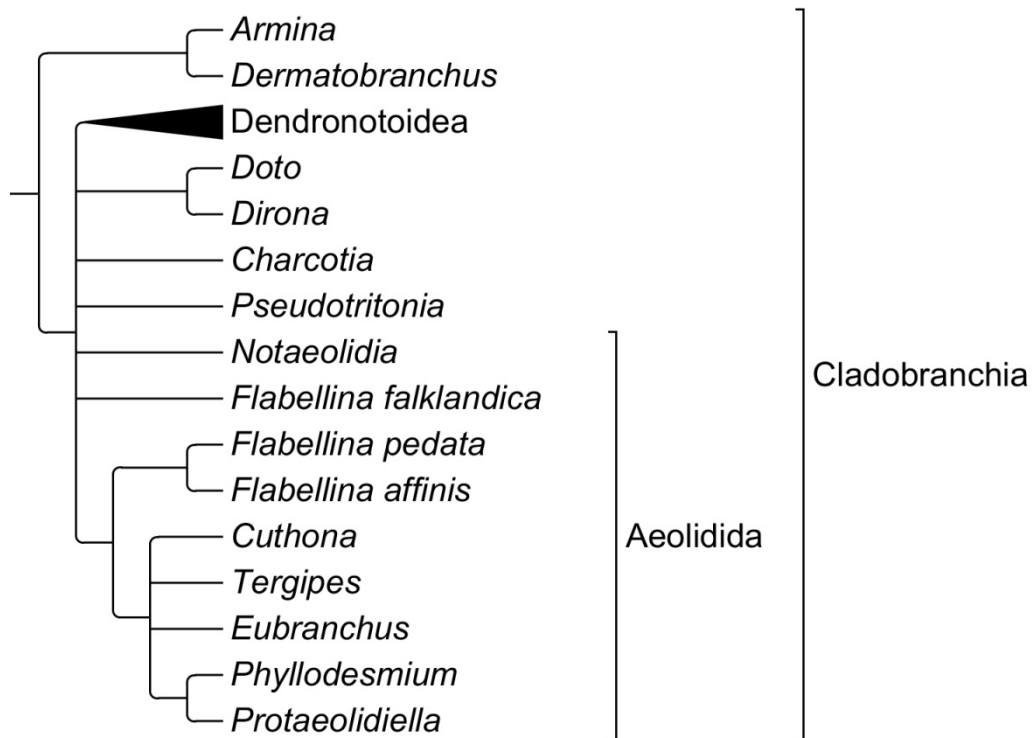


Abbildung 1.7: Ausschnitt eines strict consensus-Dendrogrammes der Cladobranchia anhand eines morphologischen Datensatzes (nach Wägele & Willan 2000, verändert).

Im folgenden Abschnitt werden kurz die Merkmale der bisher untersuchten Mitglieder der Aeolidida dargestellt.

Als ursprüngliche Aeolidida gelten die **Notaeolidiidae** (Wägele & Willan 2000). Deren einzige Gattung *Notaeolidia* wurde von Eliot 1905 begründet und enthält momentan drei Arten, die ausschließlich aus dem antarktischen Raum bekannt sind. Die einfach gebaute Radula, welche Ähnlichkeit zu der der Flabellinidae aufweist, sowie die Anordnung der Cerata in longitudinalen Reihen an der oberen Mantelkante sind ausschlaggebend für die basale Stellung des Taxons. Über ihre Ernährungsweise ist nichts Konkretes bekannt, außer, dass *Notaeolidia gigas* Eliot, 1905 Hydrozoa frisst.



Abbildung 1.8: *Notaeolidia gigas*. Balken = 1 cm.

Photo: Dirk Schories.

Die **Flabellinidae** Bergh, 1889 bilden eine große, heterogene Gruppe und gelten als paraphyletisch (Wägele & Willan 2000). Sie umfassen die Gattungen *Calmella* Eliot, 1906 und *Flabellina* Voigt, 1834. Gosliner & Kuzirian (1990) sowie Gosliner & Willan (1991) präsentierten phylogenetische Analysen mit hohen Taxazahlen und konnten monophyletische Gruppierungen innerhalb der Flabellinidae finden. Jedoch enthielt keine ihrer Analysen andere Taxa der Aeolidida, was eine solche Analyse angreifbar macht. *Flabellina* zählt mit über 100 Arten zur größten Gattung innerhalb der Flabellinidae (Wägele et al. 2003). Zusammen mit den Notaeolidiidae gruppieren sie paraphyletisch als basale Aeolidida (Gosliner 1985).



Abbildung 1.9: *Flabellina babai*.

Balken = 1 cm.

Die **Tergipedidae** Bergh, 1889 sind eine Familie mit vielen Synonymen (Brown 1980). Aufgrund der geringen Größe der adulten Tiere ist die Beschreibung und Bestimmung oftmals unklar. Folgende Gattungen werden von Brown (1980) zu den Tergipedidae gezählt: *Cuthona* Alder und Hancock, 1855; *Tergipes* Cuvier, 1805 und *Tenellia* Costa, 1866. Weiterhin wird die Gattung *Phestilla* Bergh, 1874 aktuell zu den Tergipedidae gezählt.



Abbildung 1.10: *Cuthona sibogae*.

Balken = 1 cm. Photo: Indra Swari.

Die Familie der **Aeolidiidae** wurde 1839 von d'Orbigny eingeführt. Seine Motivation bestand darin, Mitglieder der Phlebenterata, welche neben den Aeolidiidae auch Sacoglossen enthielten, zu separieren. In der Literatur wurden die Aeolidiidae kontrovers diskutiert (Eliot 1910; Odhner 1934). Das Merkmal der Aeolidiidae ist der kammförmige Zahn (Schmekel & Portmann 1982). Nach Miller (2001) beinhalten die Aeolidiidae folgende Gattungen: *Aeolidia* Cuvier, 1798; *Aeolidiella* Bergh, 1867; *Aeolidiopsis* Pruvot-Fol, 1956; *Anteaeolidiella* Miller, 2001; *Berghia* Trinchese, 1877; *Burnaia* Miller, 2001; *Cerberilla* Bergh, 1873; *Limenandra* Haefelfinger und Stamm, 1959 (= *Baeolidia* Bergh, 1888); *Protaeolidiella* Baba, 1955; und *Spurilla* Bergh, 1864.



Abbildung 1.11: *Aeolidiella alba*.

Balken = 1 cm. Photo: Heike Wägele.

Die **Facelinidae** Bergh, 1889 sind mit über 130 beschriebenen Spezies in ca. 40 Gattungen das umfangreichste Taxon innerhalb der Aeolidida. Es umfasst je nach Literaturquelle unterschiedliche Gruppierungen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen. Zu den in dieser Arbeit analysierten Gattungen zählen *Austraolis* Burn, 1962; *Caloria* Trinchese, 1888; *Facelina* Alder & Hancock, 1855; *Facelinopsis* Pruvot-Fol, 1954; *Moridilla* Bergh, 1889; *Phidiana* Gray, 1850 und *Phyllodesmium* Ehrenberg, 1831.



Abbildung 1.12: *Phyllodesmium jakobsenae*. Balken = 1 cm.

Photo: Heike Wägele

Die **Favorinidae** Bergh, 1889 besitzen eine umstrittene systematische Einordnung. So werden sie häufig als Unterfamilie der Facelinidae gehandelt (Schmekel & Portmann 1982), aber auch als eigenständige Familie, die sich durch gemeinsame Merkmale der Mitteldarmdrüse auszeichnet (z. B. Marcus & Marcus, 1959; Wägele & Willan 2000). Die Gattungen *Cratena* Bergh, 1864; *Favorinus* Gray M.E., 1850; *Godiva* Macnae, 1954; *Nanuca* Marcus, 1957 und *Pteraeolidia* Bergh, 1876 sind in dieser Arbeit enthalten.



Abbildung 1.13: *Favorinus tsuruganus*.

Balken = 1 cm.

Die **Eubranchidae** Odhner, 1934 besitzen einen weißlichen Körper mit orangefarbenen Rhinophoren und Oraltentakeln. Die Radula ist triseriat (dreireihig), die Cerata oft kolbenförmig. Zu den Eubranchidae zählen nach Baba (1960) die Gattung *Eubranchus* Forbes, 1838; *Cumanotus* Odhner, 1907, *Galvinella* Eliot, 1907; *Capellinia* Trinchese, 1929; *Eubranchopsis* Baba, 1929 und *Egalvina* Odhner, 1929.



Abbildung 1.14: *Eubranchus farrani*.

Balken = 1 cm.

Die Gattung *Phyllodesmium*

Von besonderem Interesse in dieser Arbeit sind die Arten der Gattung *Phyllodesmium* (Facelinidae). In Form und Aussehen sind hoch variable Cerata ohne funktionierende Cnidosäcke zu beobachten, was als Synapomorphie interpretiert wird. Es fehlen Oraldrüsen,

paarige tubuläre Speicheldrüsen sind vorhanden, die Rhinophoren sind fein oder etwas kugelig. Der Fuß ist kantig. Als anatomische Besonderheiten lassen sich die auffällige Verzweigung der Mitteldarmdrüse, die Gruppierung der Cerata und die Position des Anus aufführen (Wägele & Willan 2000). *Phyllodesmium* ist bisher nur aus dem indopazifischen Raum bekannt und umfasst 24 beschriebene Arten (Rudman 1981b; 1991; Baba 1991; Avila et al. 1998; Ortiz & Gosliner 2003; 2008; Burghardt & Wägele 2004; Burghardt et al. 2005; 2008; Burghardt & Gosliner 2006; Moore & Gosliner 2009).



Abbildung 1.15: *Phyllodesmium kabiranum*. Balken = 1 cm.

Photo: Seaslugsforum.

1.2 Die Systematische Stellung und die Biologie der Cnidaria als Futterorganismen der Aeolidida

Die Cnidaria (Nesseltiere) sind als eine erfolgreiche, artenreiche Gruppe in allen marinen Lebensräumen anzutreffen. Als Medusen besiedeln sie das Pelagial, mit der „sessilen“ Polypenform das Benthal. Einige Arten sind mit spezialisierten Polypenformen oder durch Bildung von Kolonien in der Lage, das Pleuston zu bewohnen (nur Hydrozoa: *Physalia*, *Velella*, *Porpita*). Die meisten Arten werden in Tiefen bis 200 m gefunden, es gibt aber auch Tiefseeformen. Wenige Hydrozoa haben das Süßwasser erobert (z. B. *Hydra*). Cnidaria lassen sich in den zwei bereits angesprochenen Organisationstypen finden, die bei der Metagenese gebildet werden: Polyp und Meduse. Bei den ursprünglichen Arten der Scyphozoa, Cubozoa und Hydrozoa sind beide Stadien anzutreffen, während die hier behandelten Anthozoa nur in der Polypenform (bekannt als Koralle) existieren (Abb. 1.16).



Abbildung 1.16: *Briareum asbestinum*.

Balken = 1 cm.

Den meisten sind die Nesseltiere wohl am ehesten als nesselnde Quallen bekannt. Das Nesseln kommt durch das wichtigste gemeinsame Merkmal aller Cnidaria zustande, den Cniden oder auch Nesselkapseln. Die äußerst komplex aufgebauten Cniden werden in Cnidocyten gebildet und dienen zum Beutefang, aber auch zum Schutz vor Fressfeinden. Bei Kontakt mit den Cniden explodieren diese und schleudern einen eingelagerten Faden

“handschuhfingerförmig“ heraus. Dieser oftmals mit einem Stilet besetzte Faden durchschlägt das Epithel des Angreifers und injiziert sein neurotoxisches Nesselgift in den Angreifer, woraufhin dieser von seiner Beute ablässt. Die Entwicklung der Cniden mit dem lähmenden und hämolytischen Gift wird auch als Parameter zum Erfolg der Cnidaria betrachtet. Die meisten Cniden sind an den Fangarmen von Polypen und Medusen zu finden. Hier sind sie entweder in größerer Zahl in epithelialen Batteriezellen (Hydrozoa) oder einzeln im epithelialen Gewebeverband eingelagert (Anthozoa).

Neben den Nesselzellen zur Verteidigung und zum Nahrungserwerb besitzen viele Cnidaria eingelagerte symbiotische Dinoflagellata (Zooxanthellen). Diese Symbiose birgt für beide Partner viele Vorteile. So werden manche überflüssige Stoffwechsel-Produkte der Koralle von den Symbionten aufgenommen und genutzt. Weitere Vorteile für die Koralle sind zum einen die effizientere Kalzifikation des Skeletts durch die Abnahme von CO_2 für die Photosynthese. Aufgrund der Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung des Calciumcarbonates kann dieses vermehrt gebildet werden. Zum anderen produziert der Dinoflagellat über die Photosynthese Nährstoffe für die direkte Versorgung des Wirtes. Die Vorteile für die Dinoflagellata sind ein geschütztes Habitat in der Koralle und ein direkter Zugang zu limitierenden Nährstoffen wie Stickstoff- und Phosphatverbindungen. Die einzigen Nachteile sind das durch die Photosyntheseaktivität der Zooxanthellen bedingte Tiefenlimit für die Korallen sowie die Sessilität der Tiere für die Dinoflagellaten.

Erstaunlicherweise haben die Cnidaria-fressenden Aeolidida Fähigkeiten entwickelt, mit den explosiven Waffen ihrer Futtertiere umzugehen und diese sogar für die eigene Verteidigung zu nutzen. Andere übernehmen die Symbionten ihrer Futterkorallen und nutzen sie für ihre eigene Ernährung. Die sich von zooxanthellaten Korallen (Cnidaria) ernährenden Aeolidida verdauen die Symbionten *Symbiodinium* nämlich nicht, sondern lagern sie in Ausstülpungen ihrer Mitteldarmdrüse zum Teil über längere Zeiträume ein (Abb. 1.17). Dabei übernehmen sie nun anstelle der Cnidaria die gerade angesprochenen Vorteile der Symbiose.

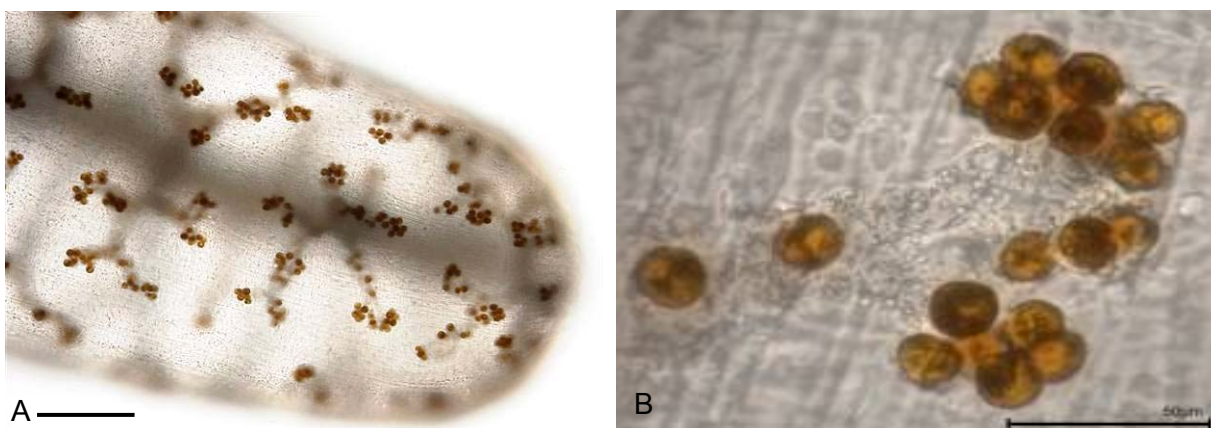


Abbildung 1.17: *Symbiodinium* sp. A: in Mitteldarmdrüse eines Ceras von *Phyllodesmium briareum*. Balken = 300 μm . B: Detailvergrößerung. Balken = 50 μm .

1.3 Die Systematische Stellung und Biologie der Endosymbionten: *Symbiodinium*

Die Chromalveolata setzen sich nach molekularen Analysen aus den „Chromista“ und den Alveolata zusammen, die aus den drei Großgruppen Dinozoa (Dinoflagellata), Apicomplexa und Ciliophora (Ciliata) bestehen (Adl et al. 2005). Als gemeinsames Merkmal der Alveolata gelten die kortikalen Alveoli (Cavalier-Smith 1991; 1993; 1998), die namensgebend für dieses Monophylum sind.

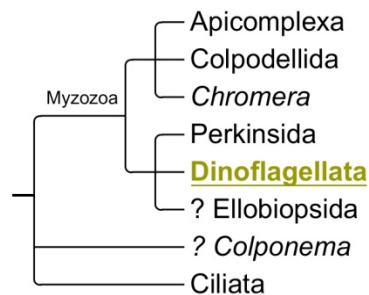


Abbildung 1.18: Stilisierter Stammbaum der Alveolata (verändert nach Gajadhar et al. 1991; Noren et al. 1999; Fast et al. 2002; Kuvardina et al. 2002; Leander et al. 2003; Leander & Keeling 2003; 2004; Saldarriaga et al. 2003; Cavalier-Smith & Chao 2004; Silberman et al. 2004; Harper et al. 2005; Moore et al. 2008).

Symbiodinium (Synonym *Gymnodinium*; Schoenberg & Trench 1980) ist ein Vertreter der Dinoflagellaten (Dinozoa), von denen heute rund 2.500 rezente und 4.000 fossile Arten bekannt sind (Abb. 1.19). Bei den Dinoflagellaten handelt es sich um eine sehr formenvielfältige Gruppe eukaryotischer Einzeller, die in marinen und Süßwasser-Habitaten vorkommt (Kofoid & Skogsberg 1928). Nach den Cyanobakterien und den Bacillariophyta zählen die Dinoflagellaten zu den größten Primärproduzenten der Weltmeere. Bis zu 50 % der Dinoflagellaten leben phototroph.

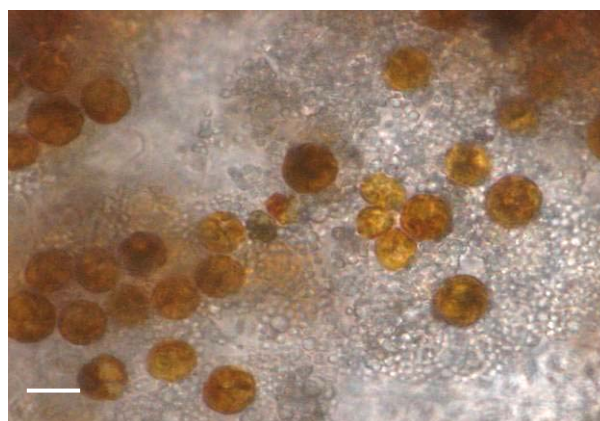


Abbildung 1.19: *Symbiodinium* sp. Balken = 10 µm.

Phototrophie bedeutet, über die Nutzung der Lichtenergie die zum Leben notwendige chemische Energie in Form von Kohlenhydraten herzustellen. Eine Voraussetzung dafür ist der Besitz von Chloroplasten. Die Chloroplasten der phototrophen Dinoflagellaten der Gattung *Symbiodinium* enthalten im Gegensatz zu den höheren Pflanzen neben

Chlorophyll a auch Chlorophyll c sowie die akzessorischen Pigmente β -Carotin und Peridinin. Letzteres ist das dominante Xanthophyll, welches den meisten phototrophen Dinoflagellaten ihre gelbbraune bis braunrote Färbung verleiht (Jeffrey & Humphrey 1975).

Neben diesen phototrophen Formen existieren auch heterotrophe Formen, die entweder niemals Plastiden besaßen oder diese wieder verloren haben (Keeling 2004). Heterotrophe Dinoflagellaten ernähren sich räuberisch über Phagozytose, wie beispielsweise *Noctiluca scintillans*, oder sie leben parasitisch. Copepoden, Fischeier, grüne Fadenalgen und auch andere Einzeller werden von ihnen parasitiert.

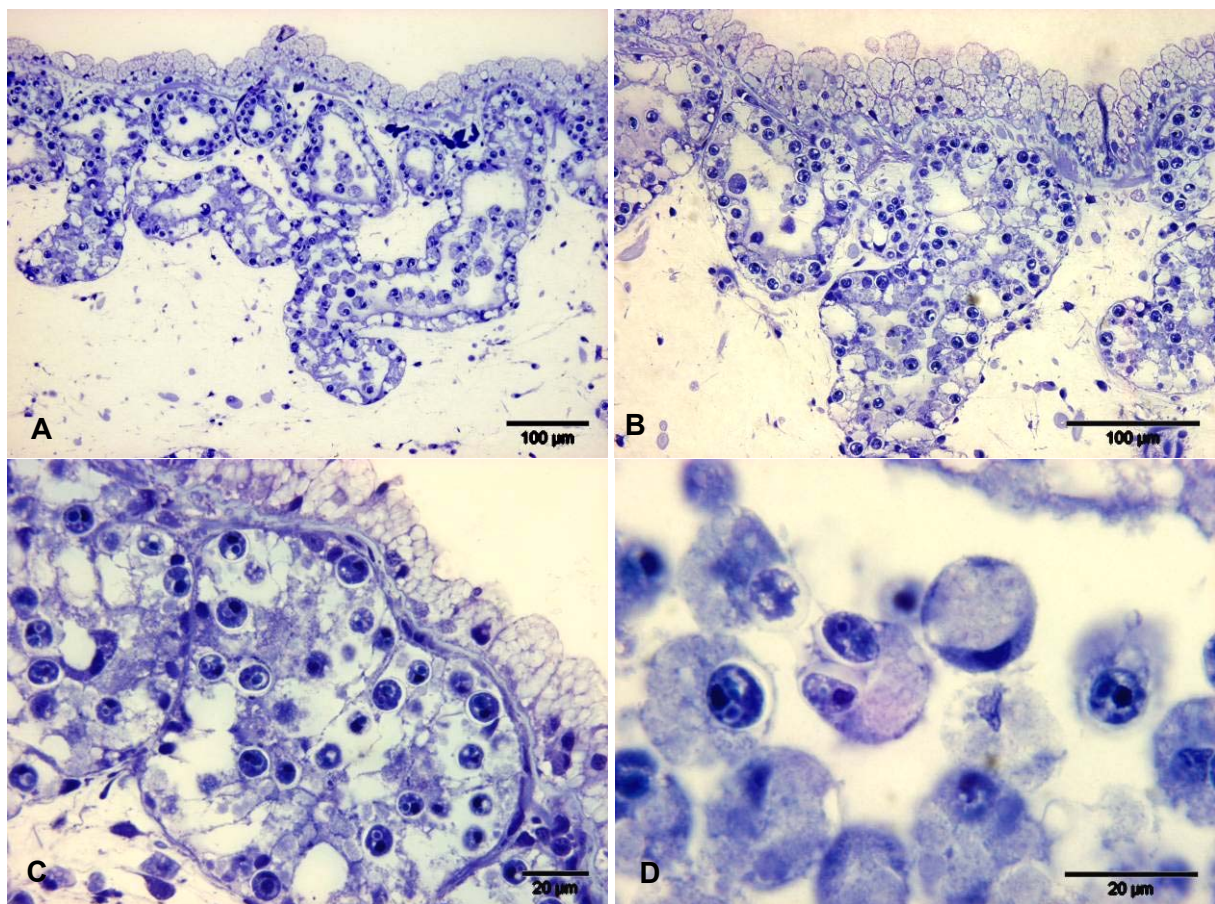


Abbildung 1.20: Dünnschnitte durch histologisches Präparat von *Phyllodesmium rudmani* durch die Mitteldarmdrüse. A + B: Übersicht, C: Detailvergrößerung, D: Vergrößerung von *Symbiodinium* in der Mitteldarmdrüse. Photos: Ingo Brughardt.

Einige Dinoflagellaten, wie auch die Gattung *Symbiodinium* (Abb. 1.19), leben intrazellulär als Zooxanthellen in verschiedensten Organismen und behalten ihre Fähigkeit, Photosynthese zu betreiben. Zu den Partnern dieser Symbiosen zählen unter anderem Bivalvia (Muscheln z. B. Carlos et al. 1999), Ciliophora (Wimperntiere z. B. Lobban et al. 2002), Radiolarien (Rädertierchen), Foraminiferen (Kammerlinge z. B. Pochon et al. 2006; Pochon & Gates 2010), Cnidaria (Nesseltiere) und Mollusken (z. B. Pochon et al. 2001). Dinoflagellaten besitzen in der Regel bis zu zwei Chloroplasten, die von drei Hüllmembranen umgeben sind.

Symbiodinium ist aufgrund seiner Bedeutung für die riffbildenden Korallen in den letzten Jahren verstärkt ins Visier der Forschung geraten. Durch Klimaänderungen bleichen die Korallen ganzer Riffe aus. Das heißt die Korallen „verlieren“ ihre Dinoflagellaten, durch die sie vorher ihre charakteristische Färbung bekamen. Durch den Verlust der Symbionten sterben die Korallen und damit auch langfristig das gesamte Riff. Um das Symbiosesystem zu verstehen, wird an verschiedenen Stellen daran gearbeitet, die Symbionten zu identifizieren und zu charakterisieren. Frühere Studien zählten alle zooxanthellaten Dinoflagellaten zu *Symbiodinium microadriaticum* (Freudenthal 1962), einer pandemischen Spezies. Weiterführende Untersuchungen, basierend auf biochemischen, morphologischen und genetischen Methoden, konnten die zooxanthellaten Dinoflagellaten als heterogene Gruppe mit unklarer Zuordnung zur Spezies identifizieren (Rowan 1998). Diese Aussage wird durch neuere molekulare Analysen unterstützt (Rowan & Knowlton 1995; Wilcox 1998; Baillie et al. 2000; LaJeunesse 2001; van Oppen et al. 2001). Aufgrund fehlender aussagekräftiger morphologischer Merkmale werden die Symbionten mittels molekularer Merkmale in bis zu neun nicht näher beschriebene Gruppen (Clades) von A-I eingeteilt (Pochon et al. 2006; Pochon & Gates 2010).

1.4 Molekulare Analyse

1.4.1 Molekulare Marker für phylogenetische Analysen in der molekularen Systematik

Die Verwendung von geeigneten Markern ist für die molekulare Systematik von großer Bedeutung und setzt bestimmte Eigenschaften voraus. So sollte ein Marker eine der Fragestellung entsprechende Evolutionsgeschwindigkeit aufweisen. Bei zu schnell evolvierenden Genen können Mehrfachsubstitutionen das eigentliche phylogenetische Signal überlagern. Im Gegensatz dazu liefern solche Marker, bei denen nur geringe Substitutionsereignisse stattfanden, für junge Diversifikationsereignisse keine Aussage, da evolutionäre Prozesse noch nicht ausreichend manifestiert sind. Im Folgenden werden die SSU rDNA (18S rDNA), die mtLSU rDNA (16S rDNA) und das Gen für die mitochondriale Cytochromoxidase I (COI) und ihre Bedeutung für die phylogenetische Systematik kurz vorgestellt.

Die SSU rDNA (18S rDNA) ist Bestandteil der cytoplasmatischen kleinen ribosomalen Untereinheit und wird im Zellkern kodiert. Die Gene für die ribosomale RNA sind im Genom in zahlreichen Kopien tandemartig hintereinander angeordnet. Die SSU rDNA ist sehr konserviert, sie evolviert in der Regel langsam und wird erfolgreich in phylogenetischen Fragestellungen mit vermutlich alten Verwandtschaftsbeziehungen eingesetzt (Wollscheid &

Wägele 1999; Wollscheid-Lengeling et al. 2001; Preisfeld et al. 2001; Busse & Preisfeld 2002 a; b; 2003; Vonnemann et al. 2005; Dinapoli & Klussmann-Kolb 2010). Ein besonderes Strukturmerkmal ribosomaler RNA ist die Fähigkeit zur Ausbildung intramolekularer Doppelhelix-Bereiche, die sich zu komplexen dreidimensionalen Strukturen falten können. Mit Kenntnis über die Sekundärstruktur der ribosomalen RNA können hypervariable Sequenzabschnitte identifiziert werden, die nicht homologisierbar und daher für die Analyse nicht verwendbar sind. Mit Hilfe von Sekundärstrukturinformationen können daher Homologiehypthesen exakt überprüft werden.

Die mitochondriale große ribosomale Untereinheit (mtLSU) befindet sich im mitochondrialen Genom. Die ringförmige DNA der Mitochondrien ist in der Regel zwischen 14 – 42 kb groß und in hoher Kopienzahl zu finden (Wolstenholme 1992). Es können zwei Kategorien mitochondrialer Gene unterschieden werden: Mitochondrien besitzen, wie auch Chloroplasten, ein eigenes Translationssystem. Das ribosomale Operon besteht aus zahlreichen Proteinen und aus zwei DNA-Molekülen, die in die ribosomalen RNA-Moleküle umgeschrieben werden, die gemeinsam die funktionelle Einheit des Ribosoms bilden: Zum einen ist dies die kleine ribosomale Untereinheit (12S rRNA oder mtSSU rRNA), und zum anderen die große ribosomale Untereinheit (16S rRNA oder mtLSU rRNA).

Die Cytochromoxidase COI stellt ein Beispiel für ein proteinkodierendes Gen dar. Hierbei handelt es sich um ein von der mitochondrialen DNA kodiertes Protein, welches als Enzym in der Atmungskette die Funktion des terminalen Elektronenakzeptors übernimmt. Die Cytochromoxidase liegt als Protein in zwei Untereinheiten vor, wovon die Untereinheit I für vorliegende Analysen wegen vieler bereits vorhandener Daten besonders geeignet ist. Die Atmungskette ist ein evolutiv sehr alter Stoffwechselweg, entsprechend ist das Gen für die Cytochromoxidase gut konserviert und somit zur Aufklärung alter Verwandtschaften geeignet (Liu & Beckenbach 1992; Castresana et al. 1994; Gray et al. 1999; Burger et al. 2003). Für proteinkodierende Gene, wie der Cytochromoxidase, ist bekannt, dass die dritte Kodonposition gegenüber den Positionen eins und zwei eine gesteigerte Evolutionsgeschwindigkeit aufweist (Söller et al. 2001). Bei der Analyse tieferer systematischer Zusammenhänge, beispielsweise auf Familienebene, kann die dritte Kodonposition entfernt oder geringer gewichtet werden.

Sowohl die ribosomalen als auch die proteinkodierenden mitochondrialen Gene wurden häufig in phylogenetischem Kontext verwendet und eignen sich zur Aufschlüsselung verwandtschaftlicher Fragestellungen innerhalb der Opisthobranchia (Thollesson 1999; Wollscheid-Lengeling et al. 2001; Remigio & Hebert 2003; Grande et al. 2004b; Klussmann-Kolb & Dinapoli 2006; Klussmann Kolb et al. 2008; Dinapoli & Klussmann-Kolb 2010; Pola & Gosliner 2010).

1.4.2 Molekulare Marker zur Identifizierung von *Symbiodinium*

Als Grundlage zur Identifizierung von *Symbiodinium* dienen kernkodierte und plastidäre ribosomale DNA (LaJeunesse 2001; Pochon et al. 2004; van Oppen 2005; Pochon & Gates 2010). Die Entwicklung geeigneter Marker zur Identifizierung von *Symbiodinium* wird durch die Symbiose der Tiere erschwert. Durch DNA-Isolierung erhält man eine Misch-DNA, die aus mehreren Genomen besteht. Dieser Problematik müssen geeignete Marker oder aber geeignete Isolationsmethoden gerecht werden.

Es gibt Ansätze, die Symbionten zu isolieren, in spezifischem Medium zu kultivieren und zu analysieren. In diesem Fall hat man zwar nur noch die drei Genome des Symbionten. Bei Symbionten unbekannter Zusammensetzung kann passieren, dass man nur die Spezies kultiviert, für die geeignete Zuchtbedingungen geboten werden. Die plastidäre LSU, auch cp23S genannt, ist Teil des aus drei verschiedenen Genomen bestehenden genetischen Materials der Chloroplasten in den Dinoflagellaten. Die beiden anderen Systeme sind das genetische Material des Zellkerns und das der Mitochondrien. Durch die Methode der Isolierung können die Symbionten gut analysiert werden, aber es sind keine Aussagen über die tatsächlichen bzw. relativen Mengen der *Symbiodinium* Clades im Wirt möglich.

1.5 Ziele der Arbeit

Im Mittelpunkt vorliegender Arbeit stehen die verwandtschaftlichen Verhältnisse der Aeolidida, einer Gruppe mariner Nacktschnecken (Nudibranchia) und deren Fähigkeit, die photosynthetische Aktivität ihrer Symbionten der Gattung *Symbiodinium* zu nutzen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist ein robustes phylogenetisches System der Aeolidida zu erstellen, an Hand dessen zum ersten Mal evolutionäre Szenarien bezüglich Photosynthese und Nahrung entwickelt werden können. Dazu beschäftigt sie sich mit der Aufklärung der Evolution der Aeolidida, indem durch Hinzunahme neuer Taxa in Verbindung mit konkatinerten Datensatzanalysen (SSU rDNA, mtLSU rDNA, COI) diese rekonstruiert werden sollte. Eine eingehende Sequenzanalyse kann dabei Hinweise auf evolutionäre Schritte ergeben, aus denen sich die heutigen terminalen Taxa entwickelt haben.

Um die umfassenden Datensätze nach phylogenetischen Grundsätzen exakt homologisieren zu können, soll auch die Sekundärstruktur der SSU rRNA untersucht und als Grundlage für ein Alignment verwendet werden. Dabei sollen ebenfalls Veränderungen in der Sekundärstruktur zur Erstellung der Stammbaumhypothesen einfließen.

Als weiterer Schwerpunkt wird die Evolution des Genus *Phyllodesmium* (Facelinidae, Aeolidida) erstmalig auf der Grundlage eines konkatinerten Datensatzes und mit einem deutlich größeren Taxonsampling analysiert werden.

Ein anderer Fokus bezieht sich auf die Symbiose von *Phyllodesmium briareum* mit *Symbiodinium* sowie mit ihren Futterorganismen. Die eingelagerten Symbionten sollen in vorhandenem Probenmaterial (Schnecke + Koralle) identifiziert und in das System der Organismen eingeordnet werden. PAM-Analysen können dabei Auskunft über die Vitalität des Symbiose-Systems geben.

Da eine Identifizierung der Clades von *Symbiodinium* bisher nur selten möglich und in marinen Nacktschnecken nur einmal erfolgt ist (Loh et al. 2006), sollen neue molekulare Tools entwickelt werden, die zur quantitativen Bestimmung der *Symbiodinium* Clades einsetzbar sind.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft des Tiermaterials

Das Material für die Rekonstruktion der Phylogenese stammt zu einem großen Teil von Sammelreisen der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Heike Wägele, Bonn. Die Proben von *Phyllodesmium briareum*, *Spurilla neapolitana* und *Aeolidiella stephanieae* kommen aus der eigenen Zucht und wurden für die Langzeituntersuchung der Symbiose zwischen den Schnecken und *Symbiodinium* verwendet. *Spurilla neapolitana* wurde im November 2007 von Louise Schmekel als juveniles Tier in Banyuls sur Mer (F) gefunden und anschließend im Rahmen dieser Arbeit in Wuppertal gehalten (Tab. 2.1).

Die Zucht von *Phyllodesmium briareum* wurde im Januar 2008 mit zwei Tieren aufgebaut. Die Tiere kamen als Beifang einer Korallenlieferung an die Firma Natur Aquarianer (Schwelm) an. Es folgte ein weiteres Tier, welches wiederum als Beifang bei Zoozajak (Duisburg) gefunden wurde.

Aeolidiella stephanieae wurde von pro-marin bezogen und seit September 2009 in Wuppertal gezüchtet.

Das Tiermaterial wurde zur weiteren Verwendung und als Referenzmaterial in 98 Vol.-% Ethanol fixiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.1: Tiermaterial mit Fundort und untersuchten Genen.

AU: Australien; DE: Deutschland; EG: Ägypten; ES: Spanien; FR: Frankreich; HR: Kroatien; ID: Indonesien; IT: Italien; NL: Niederlande; NO: Norwegen; PH: Philippinen; US: Nordamerika.

		SSU	mtLSU	COI	cp LSU	SSU	mtLSU
Untersuchte Taxa	Herkunft	Schnecke			Symbiont / Nahrung		
Aeolidiidae Gray, 1834							
<i>Aeolidia papillosa serotina</i> (Linnaeus, 1761)		GU227371*	+ *	+ *	+*		
<i>Aeolidia papillosa</i> (Linnaeus, 1761)		+ S	+ *	+ *	+*		
<i>Aeolidiella alderi</i> (Cocks, 1852)	IT, Elba,		+ *	+ *			
<i>Aeolidiella stephanieae</i> Valdes, 2005	DE, Frankfurt Zucht	partiell *	+ *	+ *	+*		
<i>Antaeolidiella indica</i> (Bergh, 1888)	EG, Dahab		+ *		+*		
<i>Berghia coerulescens</i> (Laurillard, 1830)	FR, Banyuls-sur-Meer		+ *	+ *			
<i>Berghia verrucicornis</i> (Costa, 1864)	IT, Elba, San Andrea	GU227364*	+ *	+ *	+*	+*	
<i>Cerberilla affinis</i> Bergh, 1888	AU, Orpheus Island	GU227366*	+ *	+ *	+*		
<i>Limenandra fusiformis</i> (Baba, 1949)	AU, Dingo Beach		+ *	+ *	+*	+*	+*
<i>Limenandra nodosa</i> Haefelfinger & Stamm, 1958	IT, Elba	GU339155 ^V	+ *	+ *	+*		
	EG, Dahab		+ *	+ *	+*		
<i>Spurilla australis</i> Rudman, 1982	AU, Albany	GU227367*	+ *		+*		
	AU, Albany	+*	+ *		+*		
	ET, Dahab		+ *		+*		
<i>Spurilla major</i> (Eliot, 1903)	AU, Dingo Beach	partiell*	GU550051*	+ *	+*		
<i>Spurilla neapolitana</i> (Delle Chiaje, 1823)	IT, Elba	+ *	+ *	+ *	+*		
Embletoniidae Pruvot-Fol, 1954							
<i>Embletonia pulchra</i> (Alder & Hancock, 1844)	HR, Rovinj	+ S	+ S	+ S			
<i>Embletonia</i> sp.	FR, Banyuls-sur-Mer	+ V	+ *	+ *	+		+
Eubbranchidae Odhner, 1934							

		SSU	mtLSU	COI	cp LSU	SSU	mtLSU
Untersuchte Taxa	Herkunft	Schnecke			Symbiont / Nahrung		
<i>Eubranchus farrani</i> (Alder & Hancock, 1844)	IT, Giglio	partiell *	AJ223396		+		
<i>Eubranchus exiguus</i> (Alder & Hancock, 1848)	GenBank	AJ224787	AF249246	AF249792			
<i>Eubranchus sp.</i>	GenBank	AJ224786		AF249791			
Flabellinidae Bergh, 1889							
<i>Calmella cavolini</i> (Verany, 1846)		GU227361*	+ *	+ *	+		
	IT, Elba	+ *			+		
<i>Flabellina sp.</i>	AU, Lizard Island, QLD, Townsville	AY165769	+ *	+ *	+		
<i>Flabellina affinis</i> (Gmelin, 1791)	ES Mittelmeer	AY165767	+ *	AF249783	+		
<i>Flabellina babai</i> Schmekel, 1972	ES, Mittelmeer	AY165768					
	ES, Blanes	partiell *	+ *	+ *	+		
<i>Flabellina bicolor</i> (Kelaart, 1858)	EG, Dahab	+ *		+ *	+		
<i>Flabellina bilas</i> (Gosliner & Willan, 1991)	AU, Lizard Island	partiell *	+ *	+ *	+		
<i>Flabellina exoptata</i> Gosliner & Willan, 1991	AU, Orpheus Island	partiell * S	+ *	+ *	+		
<i>Flabellina falklandica</i> (Eliot, 1907)		+ S	+ S	+ S			
<i>Flabellina ischitana</i> Hirano & Thompson, 1990	IT, Elba	partiell * V	+ *	+ *	+		
<i>Flabellina lineata</i> (Loven, 1846)	FR, Banyuls-sur-Mer		+ *	+ *			
<i>Flabellina pedata</i> (Montagu, 1815)	ES, Ferrol	AJ224788	AF249247	AF249817			
<i>Flabellina rubrolineata</i> (O'Donoghue, 1929)	AU, Lizard Island	partiell *	+ *	+ *	+	+S	+
<i>Flabellina salmonacea</i> (Cuthouy, 1838)	NO, Kongsfjord	partiell *	+ *	+ *	+		
<i>Flabellina verrucosa</i> (Sars, 1829)	GenBank	AF249198	AF249245	AF249790			
Facelinidae Bergh 1889							
<i>Caloria elegans</i> (Alder & Hancock, 1845)	IT, Elba	GU227363*	+ *	+ *	+		
	IT, Giglio	+*	+ *	+ *	+		
<i>Facelina bostoniensis</i> (Couthouy, 1838)	DE, Kiel	AY165763	+ *	AY345031	+		
<i>Facelina drummondii</i> Thompson		GU339157 ^V					

		SSU	mtLSU	COI	cp LSU	SSU	mtLSU
Untersuchte Taxa	Herkunft	Schnecke			Symbiont / Nahrung		
<i>Facelina rubrovittata</i> (A. Costa, 1866)	ES, Blanes	partiell *	+ *	+ *	+		
<i>Facelinopsis marioni</i> (Vayssiere, 1888)	FR, Banyuls-sur-Mer	+*S	+ *	+ *	+	+	
<i>Phidiana indica</i> (Bergh, 1896)	EG, Dahab (SSU); GenBank	+ *	DQ417273	DQ417325	+		
<i>Phidiana lottini</i> (Lesson, 1831)		partiell*	+ *		+		
<i>Phidiana lynceus</i> Bergh, 1867	NL, Niederländische Antillen	AY165765	+ *	+ *	+		
	US, Florida	partiell*	+*	+*			
<i>Phyllodesmium briareum</i> (Bergh, 1896)	ID, Sulawesi, Lembah Strait		GQ403753	GQ403775	+		
	AU, Lizard Island	GU339158 ^V					
	DE, Wuppertal Zucht (N=4)				+		
<i>Phyllodesmium cf. magnum</i>	ID, Sulawesi, Lembah Strait	+ V					
<i>Phyllodesmium colemani</i> Rudman, 1991	ASE, Moalboal, Cebu	GU339159 ^V	GQ403754 ^R	GQ403776 ^R			
<i>Phyllodesmium crypticum</i> Rudman, 1981	AU, Cockle Bay, Pazifik	GU339160 ^V	GQ403770*		+		
<i>Phyllodesmium guamensis</i> Avila, 1998	US, Guam, Cocos lagoon				+	+	
<i>Phyllodesmium hyalinum</i> Ehrenbergh, 1831	EG, Nabaq		GQ403756*	GQ403778*	+		
	EG, Nabaq		+ *		+		
	EG, Dahab				+		
<i>Phyllodesmium jakobsenae</i> Burghardt et al. 2004	ID, Sulawesi, Bunaken Island	GU339162 ^V	GQ403757 ^R	GQ403779 ^R	+		
<i>Phyllodesmium kabiranum</i> Baba, 1991	ID, Sulawesi	partiell*	+ *		+	+	
<i>Phyllodesmium koehleri</i> Burghardt et al. 2008	PH, Cabilao, Calangaman Island	partiell*	GQ403760 ^R	GQ403782 ^R	+		
<i>Phyllodesmium lembehensis</i> Burghardt et al. 2008	ID, Sulawesi, Bunaken Island		GQ403771*		+		
<i>Phyllodesmium lizardensis</i> Burghardt et al. 2008	AU, LIRS Pipeline				+		
	AU, LIRS Pipeline	partiell *	+*				
	AU, LIRS	+ V	GQ403772 ^R		+		
<i>Phyllodesmium longicirrum</i> (Bergh, 1905)	AU, LIRS	GU339161 ^V	GQ403761 ^R	GQ403783 ^R	+		
<i>Phyllodesmium macphersonae</i> (Burn, 1962)	AU, LIRS	partiell*	GQ403768		+	+	
<i>Phyllodesmium magnum</i> Rudman, 1991	EG, Dahab	+ *	GQ403763*	GQ403785*	+		

		SSU	mtLSU	COI	cp LSU	SSU	mtLSU
Untersuchte Taxa	Herkunft	Schnecke			Symbiont / Nahrung		
<i>Phyllodesmium poindimiei</i> (Risbec, 1928)	PH		+ *	+ *	+		
	North oahv	+ *			+		
<i>Phyllodesmium rudmani</i> Burghardt et al. 2006	ID, Bunaken Island, Sulawesi	partiell*	GQ403765*	GQ403787*	+	+	
Favorinidae Bergh, 1889							
cf. <i>Cratena lineata</i>	AU, Townsville Harbour	partiell *	+ *	+ *	+		
<i>Cratena peregrina</i> (Gmelin, 1791)	ES, Roses	GU339156 ^V	+ *	AF249786	+		
	IT, Giglio	partiell*	+ *	+ *	+		
	ES, Blanes	partiell*	+ *	+ *	+		
<i>Favorinus branchialis</i> (Rathke, 1806)	FR, Bretagne, Beg en Fry	+*S	+ *	+ *			
<i>Favorinus sp.</i>	FR, Banyuls-sur-Mer	GU227369*	+ *	+ *	+		
<i>Favorinus tsuruganus</i> Baba & Abe, 1964	EG, Dahab	+ *	+ *	+ *	+		
<i>Godiva banyulensis</i> Portmann et al. 1960	ES, Mittelmeer	AY165764	+ *	+ *	+		
	FR, Banyuls-sur-Mer		+ *				
<i>Nanuca sebastiani</i> Marcus, 1957		+ S	+S ¹	+ S			+
<i>Pteraeolidia ianthina</i> (Angas, 1864)	ID, Sulawesi	partiell*	+ *	+ *			
	AU, Botany Bay	GU227370*	+ *	+ *	+	+	+
Glaucidae Gray, 1827							
<i>Glaucus atlanticus</i> Forster, 1777	ES, El Hirro	partiell*	+ *				
	ES, Fuerteventura	+ S	+ S	+ S	+		
Notaeolidiidae Eliot, 1910							
<i>Notaeolidia depressa</i> Eliot, 1905	Weddel Meer, Antarktis Station 111-9	AY165770	+ *	+ *	+		
Tergipedidae Bergh, 1889							

¹ nur für die phylogenetische Rekonstruktion von *Phyllodesmium* verwendet

		SSU	mtLSU	COI	cp LSU	SSU	mtLSU
Untersuchte Taxa	Herkunft	Schnecke			Symbiont / Nahrung		
<i>Cuthona caerulea</i> (Montagu, 1804)	IT, Elba		+ *	+ *	+		
	GenBank (Kattegatt)	AF249199		AF249807			
<i>Cuthona foliata</i> (Forbes & Goodsir, 1839)	DE, Helgoland	partiell*	+ *	+ *	+		
<i>Cuthona kanga</i> (Edmunds, 1970)	AU, Dingo Beach	partiell* ^S	+ *	+ *	+		
<i>Cuthona nana</i> (Alder & Hancock, 1842)	GenBank (D, Helgoland)	AY165760					
<i>Cuthona sibogae</i> (Bergh, 1905)	AU, Lizard Island, QLD, Townsville	AY165761	GU550049*		+		
	AU, Orpheus Island	partiell*	GU550050*	+ *	+		
<i>Phestilla lugubris</i> (Bergh, 1870)	ID, Sambangan Island, Karimun jawa group	partiell*	+ *	+ *	+		
<i>Phestilla melanobrachia</i> Bergh, 1874	ID, Sulawesi	partiell*	+ *	+ *	+		
<i>Tergipes antarcticus</i> Pelseneer, 1903	D. Schillo	partiell ^S	+ S	+ S			
<i>Tergipes tergipes</i> (Forsk. 1755)	GenBank	AF249197	AY345032	AY345032			
Chromodorididae Bergh, 1891							
<i>Chromodoris krohni</i> (Verany, 1846)	ES, Atlantik, GenBank	AJ224774	AF249239	AF249805			
<i>Hypselodoris villafranca</i> (Riso, 1818)	ES, Atlantik, GenBank	AJ224780	AF249237	AJ223266			
Bathydoridoidea Bergh, 1891							
<i>Bathydoris clavigera</i> Thiele 1912	Antarktis GenBank	AY165754	AF249222	AF249808			
Cnidaria Anthozoa Octocorallia Haeckel, 1866							
<i>Heteroxenia</i> Substrat	EG, Dahab				+		
<i>Heteroxenia</i> Substrat	AU, LIRS, Pipeline				+		
<i>Heteroxenia</i>	AU, LIRS, North Point				+		
Xeniidae	AU, LIRS, Loomis Reef				+		
<i>Clavularia</i> sp.	AU, LIRS, Blue Lagoon				+		
<i>Briareum</i> sp.	AU, LIRS North Point				+		
<i>Briareum</i> sp.	DE, Wuppertal Zucht				+		

		SSU	mtLSU	COI	cp LSU	SSU	mtLSU
Untersuchte Taxa	Herkunft	Schnecke			Symbiont / Nahrung		
<i>Briareum sp.</i>	DE, Wuppertal Zucht				+		
<i>Heteroxenia</i>	AU, LIRS				+		
Cnidaria Anthozoa Hexacorallia Haeckel, 1866							
<i>Cladocora caespitosa</i> (Linnaeus, 1767)	IT, Giglio, Conquese				+		
<i>Aiptasia mutabilis</i> (Gravenhorst, 1831)	DE, Wuppertal Zucht						
Cnidaria Hydrozoa Owen, 1843							
Hydrozoa	AU, LIRS, North Point				+		
<i>Millepora dichotoma</i> Forskål, 1775	EG, Dahab				+		
Substrat von							
<i>Pteraeolidia ianthina</i> 34 Pi; <i>Flabellina bicolor</i> 36 Fb	EG, Dahab				+		
<i>Phyllodesmium hyalinum</i> 41Pj	EG, Dahab				+		
<i>Phyllodesmium hyalinum</i> 43Pj	EG, Dahab				+		
<i>Phyllodesmium hyalinum</i> 45Pj & 46Pj	EG, Dahab				+		
<i>Phyllodesmium hyalinum</i> 48Pj	EG, Dahab				+		
<i>Phyllodesmium hyalinum</i> 50Pj	EG, Dahab				+		

Die Sequenzen wurden erstellt von: V = V. Vonnemann; S = D. Schillo; R = M. Raupbach; +*/ + S. Bleidißel. Die GenBank Nummern sind teilweise noch unveröffentlicht. Länderkürzel befinden sich in der Tabellenüberschrift. (Autor, Jahr) Erstbeschreibung unter anderem Gattungsnamen ggf. in Klammern.

2.2 Molekulare Methoden

Mit Hilfe molekularer Methoden wurden Hypothesen zur Phylogenese der Aeolidida aufgestellt, die Sequenzeigenschaften bestimmt, die Clade-Zugehörigkeit der Symbionten festgestellt und die Mengenverhältnisse bestimmter *Symbiodinium*-Clades ermittelt.

2.2.1 Isolierung der DNA

Die Gesamt-DNA der verwendeten Organismen wurde mit dem DNeasy Plant Kit (Fa. Qiagen) oder mit dem E.Z.N.A. Invertebrate DNA Kit (Fa. Peqlab) isoliert. Abweichend vom Protokoll wurde ein kleines Stück Gewebe (ca. 3 mm³) der Organismen präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend durch Mörsern aufgebrochen. Die weiteren Isolationschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

Bei dieser Isolierung werden zuerst Proteine und Polysaccharide ausgefällt und durch Zentrifugieren über eine Säule zurückgehalten. Die DNA wird anschließend an eine Membran aus Silikagel gebunden, durch mehrere Waschschriffe von restlichen Protein-, Polysaccharid- und Salzanteilen befreit und mit sterilem bidest. Wasser (H₂O) eluiert.

2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Gelelektrophorese zur Trennung der DNA wurde in Midi 1 Elektrophorese-Kammern (Fa. Roth) durchgeführt. Das Gelmaß betrug 10 x 11,5 cm (B x L), die Kammer fasste ein Puffervolumen von 450 mL. Für die Elektrophorese wurde 1-2 % Agarose (Fa. Roth) mit 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlen der Agarose auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromidlösung (Fa. Roth) (3 µL je 100 mL Agarose) hinzu gegeben. Anschließend wurde das Gel direkt in die Kammer gegossen.

Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert, dient es dem späteren Sichtbarmachen der DNA-Banden.

Nach dem Auspolymerisieren des Agarosegels wurden 6 Volumeneinheiten DNA mit 1 Volumeneinheit des 6x Orange Loading Dye (Fa. Fermentas) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die DNA wurde für 40 - 60 min bei 100 V aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer, als Längenstandard für den Bereich 250 – 10000 bp der Marker O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fa. Fermentas) verwendet. Für kleinere DNA-Fragmente wurde der O'GeneRuler DNA Ladder Low Range (Fa. Fermentas) verwendet.

Die Detektion der DNA erfolgte mittels UV- Durchlicht Apparatur mit angeschlossener CCD-Kamera (Fa. Intas).

Lösungen für die elektrophoretische Trennung von DNA

Tabelle 2.2:TAE-Puffer 50x.

Zutat	Menge / Konzentration
Tris	243,3 g/L
EDTA (Triplex III)	16,62 g/L

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 7,8 eingestellt, der Puffer autoklaviert und anschließend bei RT (Raumtemperatur) gelagert. Endkonzentration nach Verdünnung des TAE-Puffers auf 1x: Tris 40 mM, EDTA (Triplex III) 1 mM.

2.2.3 PCR Bedingungen

Mit der von Mullis et al. (1986) entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist es möglich, aus kleinsten Zell- oder Gewebemengen DNA-Fragmente, deren flankierende Sequenzen bekannt sind, in großen Mengen zu amplifizieren.

Das PCR Prinzip basiert auf einer Abfolge vieler Amplifikationsschritte, die jeweils zu einer Verdoppelung der DNA-Abschnitte führen. Einen Amplifikationsschritt bezeichnet man auch als Zyklus, welcher sich aus drei Phasen zusammensetzt. In Phase eins werden die DNA-Doppelstränge bei 94 °C denaturiert, an die sich in Phase zwei kurze Oligonukleotide (Primer) anlagern (Annealing). Die eingesetzten Primer dienen in der Reaktion als Startermolekül, sie sind 18 – 25 bp (Basenpaare) lang und für jeden Abschnitt spezifisch. Nach der Primeranlagerung erfolgt in Phase drei (Extension) eine Verlängerung des DNA Stranges ausgehend von den Primern. Dies geschieht von 5'- in 3'- Richtung. Dieser Schritt wird von der *Taq*-Polymerase (von *Thermus aquaticus*, *Taq*), einem temperaturstabilen Enzym, katalysiert (Fa. Bio & Sell).

Den Zyklen wird eine 4 minütige Denaturierungsphase vorangestellt, um sicherzustellen, dass die gesamte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Am Ende der PCR wird eine 5 - 10 minütige Elongationsphase angehängt, so werden alle PCR Produkte vervollständigt.

Für das PCR Ergebnis ist die Wahl der richtigen Annealingtemperatur entscheidend. Wird sie zu niedrig gewählt, bindet der Primer unspezifisch und es treten unerwünschte Nebenprodukte auf. Bei einer zu hohen Annealingtemperatur ist es möglich, dass keine Bindung des Primers an die DNA-Matrize stattfindet. Hier würde kein PCR Produkt entstehen. Die maximal zu wählende Annealingtemperatur kann anhand der folgenden Formel berechnet werden. $T_m = [4^{\circ}\text{C} \times (\text{G}+\text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T})]$

T_m entspricht der maximalen Annealingtemperatur und ergibt sich aus der Summe der Anzahl der einzelnen Basen in den Primern, die mit einem spezifischen Faktor multipliziert werden. Oberhalb dieser Temperatur ist eine Bindung des Primers an die Template DNA nicht gewährleistet. Aufgrund der heterogenen Probenauswahl, muss die optimale Annealingtemperatur für jede Zielsequenz empirisch ermittelt werden.

Tabelle 2.3: PCR Primer.

Name	Sequenz 5' - 3'	Referenz
<u>cpLSU rDNA (<i>Symbiodinium</i>)</u>		
23S1	GGC TGT AAC TAT AAC GGT CC	Zhang et al. (2000)
23S2	CCA TCG TAT TGA ACC CAG C	Zhang et al. (2000)
23SHYPERUP	TCA GTA CAA ATA ATA TGC TG	Santos et al. (2003)
23SHYPERDNM	TAT CGC CCC AAT TAA ACA GT	mod. nach Santos et al. (2003a)
<u>SSU rDNA (Aeolidida)</u>		
18A1 for	CTG GTT GAT CCT GCC AGT CAT ATG C	mod. nach Vonnemann et al. (2005)
1800R	GAT CCT TCC GCA GGT TCA CCT ACG	Vonnemann et al. (2005)
400F for	ACG GGT AAC GGG GAA TCA GGG	Wollscheid & Wägele (1999)
400R	CCC TGA TTC CCC GTT ACC CGT	Wollscheid & Wägele (1999)
700F for	GTC TGG TGC CAG CAG CCG CG	Wollscheid & Wägele (1999)
700R	CGC GGC TGC TGG CAC CAG AC	Wollscheid & Wägele (1999)
1155F for	CTG AAA CTT AAA GGA ATT GAC GG	Wollscheid & Wägele (1999)
1155R	CCG TCA ATT CCT TTA AGT TTC AG	Wollscheid & Wägele (1999)
<u>mtLSU rDNA (Aeolidida)</u>		
LR-J-12887	GGA GCT CCG GTT TGA ACT CAG ATC	Simon et al. (1994)
LR-N-13398	CGG CCG CCT GTT TAT CAA AAA CAT	Simon et al. (1994)
<u>COI (Aeolidida)</u>		
C1-N-2329	ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CA	Simon et al. (1994)
C1-J-1718	GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC	Simon et al. (1994)
LCO (1490)	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Folmer et al. (1994)
HCO (2198)	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	Folmer et al. (1994)
<u>Sequenzierprimer</u>		
M 13 forward	GTA AAA CGA CGG CCA G	Standardprimer
M 13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Standardprimer
<u>cpLSU rDNA cladespezifisch (<i>Symbiodinium</i>)</u>		
Acp23Sfor	CCC AAG AAG CGA GAC GAT GAC	alle entwickelt S. Bleidißel
Acp23Srev	AAG CTT ATC GCC CCA ATT AAA CAG T	
Ccp23Sfor	GCT GAC TAA AGT TTA TTA ACA	
Ccp23Srev	CTA CTT TAG CTG GCA TGC AAT AAG A	
Dcp23Sfor	GGT GAA CAA AGC GAT ACA AGG ATT C	
Dcp23Srev	TCA TTA ACA GCC TAG GCC AAT CG	
Allcp23Sfor	AGG TAG CAA ATT TCC TTG TCG TCC TA	
Allcp23Srev	GTG TGT GCA AGA CAG CTA TCG AAT C	

Die für die vorliegende Untersuchung verwendeten Primer benötigten unterschiedliche Temperaturprofile und Salzkonzentrationen.

Die Primer wurden von Eurofins MWG bezogen.

Das Primerpaar 23S1/23S1 amplifiziert die stark konservierte Region der plastidären LSU rDNA (cp23S) und ergibt ein ca. 0,7 kb (Kilobasenpaare) großes Fragment. Der amplifizierte Bereich liegt in der Domäne V der cpLSU rDNA (Harris et al. 1994). Das Primerpaar 23SHYPERUP/23SHYPERDNM amplifiziert ein ca. 0,2 kb großes Fragment der Region V der cp23S rDNA. Dieses Primerpaar diente als interne Kontrolle für die mit dem 23S1/23S1 Primerpaar erstellten Fragmente.

Tabelle 2.4: Temperaturprofil der cpLSU PCR. *Symbiodinium*-spezifisch.

	Wiederholungen	Temp.[°C]	Zeit[s]
Initialdenaturierung		95	240
Amplifizierung	30	95	45
		55	45
		72	90
Abschluss		72	350

Die neu entwickelten, cladespezifischen Primer der cpLSU rDNA dienten dazu, das vorhandene Probenmaterial gezielt auf das Vorhandensein von *Symbiodinium* Clade A, C und D zu untersuchen. Für Clade A wurde das Primerpaar Acp23Sfor /Acp23Srev, für Clade C Ccp23Sfor /Ccp23Srev und für Clade D Dcp23Sfor /Dcp23Srev verwendet. Die Ramp Rate betrug, wenn nicht anders angegeben, 3 °C pro Sekunde.

Tabelle 2.5: Temperaturprofil für Clade A, D und All (All erfasst alle *Symbiodinium* Clades). Die Bedingungen für Clade C entsprechen denen aus Tab. 2.4, die Annealingtemperatur wurde jedoch auf 60 °C reduziert.

	Wiederholung	Temp.[°C]	Zeit[s]
Initialdenaturierung		94	240
Amplifizierung	35	94	30
		62	30
		72	45
Abschluss		72	350

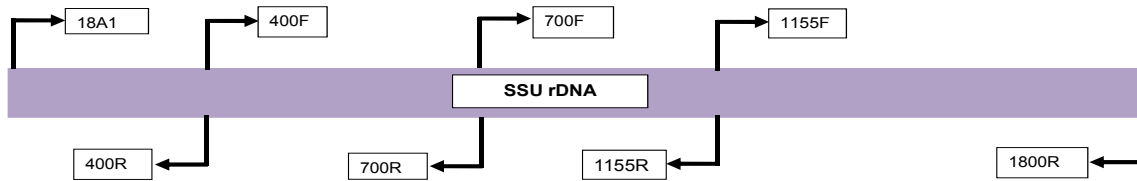


Abbildung 2.1: Lage der SSU rDNA Primer.

Die Primer 18A1, 1800R, 400F, 400R, 700F, 700R, 1155F und 1155R (SSU rDNA) wurden zur Amplifizierung der Gene für die Phylogenie der Aeolidida verwendet (Abb. 2.1). Sie wurden in wechselnder Zusammensetzung, beginnend bei der Kombination 18A1-1800R bearbeitet. Bei schwierigen Taxa (ungünstige Fixierung oder / und Lagerung, altes (>10 Jahre) und / oder wenig Ausgangsmaterial) wurde die Kombination 18A1-1155R und 1155F-1800R, bzw. 18A1-700R 700F-1155R benutzt. Die anderen Primer dienten als interne Kontrolle. Bei den schon angesprochenen schwierigen Taxa wurden neben der Primerkombination auch die PCR-Bedingungen drastisch geändert. Die Annealingtemperatur wurde auf bis zu 44 °C und die Ramp Rate der PCR-Maschine auf 2 °C pro Sekunde verringert, zusätzlich wurde an die normale PCR eine PCR angeschlossen, die als DNA-Template das PCR Produkt der vorausgegangenen PCR nutzte.

Tabelle 2.6: Temperaturprofil der PCR für die Amplifikation der SSU rDNA. Die PCR von vorherigen PCR durchlief ebenfalls das aufgeführte Temperaturprofil.

	Wiederholung	Temp.[°C]	Zeit[s]
Initialdenaturierung		95	240
Amplifizierung	30	95	45
	30	44-52	45
	30	72	120
Abschluss Elongation		72	350

Die PCR wurde per Gelelektrophorese überprüft, etwaige Doppelbanden aus dem Gel extrahiert (Fa. Omega E.Z.N.A[®] Gel Extraction Kit) und weiterbearbeitet. Mit den internen Primern wurden die ausgeschnittenen und aufgereinigten PCR Produkte in einer erneuten PCR überprüft.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der PCR Reaktionsansätze (25 µL Gesamtvolumen).

Chemikalien	Einsatz [µL]
Primer (10 pmol/µL)	0,2
Puffer (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5
dNTP (20 pmol/µL)	0,2
ddH ₂ O	16,2
DNA	1,0
Taq-Polymerase 5 U/µL	0,2

Zur Kontrolle wird das PCR Produkt auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.4 Aufreinigung der PCR Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit dem E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Fa. Omega) nach Protokoll des Herstellers gereinigt. Das Prinzip dieser Reinigung beruht auf der Bindung der PCR-Produkte an eine Silikagel-Membran. Durch die anschließenden Waschschriffe werden alle anderen Komponenten des PCR-Ansatzes entfernt. Das gereinigte PCR-Produkt wird in sterilem ddest. H₂O aufgenommen.

2.2.5 Klonierung der PCR Produkte

Für die Klonierung der PCR Produkte wurde der TOPO™ TA Cloning® Kit (Fa. Invitrogen) verwendet. Es wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen des Stammes DH5α™ eingesetzt. Die Plasmidvektoren des Kits (pCR®2.1-TOPO®) liegen linearisiert vor und besitzen an den 3'-Enden Thymidin-Überhänge, an die die Topoisomerase I gebunden ist. Die Ligation der PCR Produkte erfolgt über die Bindung der von der *Taq*-Polymerase an die 3'-Enden des amplifizierten Produktes angehängten Poly (A) – Enden mit den Thymidin-Anhängen des Vektors. Dieser Vorgang wird durch die Topoisomerase I katalysiert (Shuman 1994). Die vom Hersteller empfohlene Menge für einen Ligationsansatz wurde um die Hälfte reduziert.

Die Plasmide werden in der anschließenden Transformation mittels Hitzeschock in die Bakterienzelle geschleust. Der Stoffwechsel der Bakterienzelle wird durch Inkubation in einem Nährmedium (SOC) aktiviert. Die Bakterien, die Plasmide aufgenommen haben, besitzen nun vermittelt durch die β -Lactamase eine Ampicillinresistenz. Über dieses Antibiotikum können sie selektiert werden. Diese Plasmide enthalten das *lacZ*-Gen, welches für die β -Galactosidase kodiert. Die Expression dieses Gens wird durch das Lactoseanalogon Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die β -Galactosidase spaltet nachfolgend 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranosid (X-Gal) in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlorindigo und in Allolactose. Die Fremd-DNA wird an definierter Stelle im *lacZ*-Gen in die Plasmide eingebracht. Dies führt dazu, dass keine β -Galactosidase mehr gebildet wird. Dadurch erfolgt keine X-Gal Spaltung, die Klone sind nicht gefärbt. Die Klone der Bakterien, die keine Fremd-DNA aufgenommen haben, sind dunkelblau gefärbt.

Für jede Klonierung wurden auf zwei LB Amp⁺ Platten 100-150 μ L der Transformationsansätze ausplattiert. Die Platten wurden anschließend für 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

Medien und Lösungen für die Klonierung

Hitzelabile Komponenten wie z. B. Antibiotika und nicht autoklavierbare Bestandteile wurden vor ihrer Verwendung mit einem Membranfilter sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur unterhalb von 60 °C nachträglich zugesetzt.

Tabelle 2.8: SOB Medium (Hanahan 1983).

Zutat	Menge / Konzentration
Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	0,58 g/L
KCl	0,19 g/L
nach dem Autoklavieren:	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (1M)	10 mL/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (1M)	10 mL/L

Tabelle 2.9: SOC (Hanahan 1983).

Zutat	Menge / Konzentration
D-Glucose	3,6 g/L

Das SOC Medium wird zum SOB Medium hinzugegeben.

Tabelle 2.10: LB-(Luria Bertani) Medium (Miller 1972).

Zutat	Menge / Konzentration
Trypton	10 g/L
NaCl	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L

Mit NaOH den pH auf 7,2-7,5 einstellen.
Für LB Agarplatten wird 1.5 % (w/v) Agar (Fa. AppliChem) hinzugefügt.

- **Ampicillin Stammlösung** (50 mg / mL H₂O)
200 µL / 100 mL Lagerung bei -20°C
- **Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid**
IPTG (20 mg / mL H₂O) Lagerung bei -20°C
- **5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranosid**
X - Gal (20 mg / mL Dimethylformamid) Lagerung bei -20 °C unter Lichtabschluss

Flüssigkulturen

Um für weitere Untersuchungen eine ausreichende Menge an amplifizierter DNA zur Verfügung zu haben, erfolgte der Ansatz von Flüssigkulturen. Dazu wurde in sterilisierte Reagenzgläser 5 mL LB-Medium gegeben, mit autoklavierten Pipettenspitzen einige Zellen der zu untersuchenden Klone von den Agarplatten abgenommen und in das Medium überführt. Die Kulturen wurden anschließend für 12-16 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler inkubiert. Um in der nachfolgenden Charakterisierung der Plasmide eindeutige Aussagen über das Vorhandensein eines Inserts machen zu können, wurden als Negativkontrolle zusätzlich dunkelblau angefärbte Klone ohne Insert in Flüssigkultur genommen.

2.2.6 "Colony"-PCR zur Charakterisierung der Inserts

Diese Methode wird durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei den Inserts auch wirklich um die gesuchten Gene handelt und nicht um mögliche einklonierte Verunreinigungen, die zufällig eine identische Größe aufweisen. In einer Colony-PCR (CPCR) dienen Klonzellen aus den Kolonien oder die aus den Klonen angesetzten Flüssigkulturen als Ausgangsmaterial für die PCR. Mit sterilen Pipettenspitzen wurden aus den Kolonien Zellen abgenommen und direkt in der PCR eingesetzt. Diese wurde mit den Primern durchgeführt, mit denen das PCR-Produkt für die Klonierung erhalten wurde und zusätzlich mit internen Primern. Unterschiede im Vergleich zu einer PCR mit DNA als Ausgangsmaterial bestehen in einer verlängerten initialen Denaturierungsphase (10 min.), die den Aufbruch der Bakterienzellen bewirkt und in einer Reduzierung der Extensionszeit (30 s) und Zyklenzahl (25 Zyklen), da das Template in hohen Mengen vorliegt.

2.2.7 Aufreinigung und dauerhafte Lagerung der Klone

Die Plasmid DNA wurde aus den LB Flüssigkulturen mit dem E.Z.N.A Plasmid Mini Kit II (Fa. Omega) nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgte in sterilem ddest. H₂O.

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Klonen wurden je 850 µL der Flüssigkultur mit 150 µL sterilem Glycerin vermischt und wenn möglich sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.8 Restriktionsanalyse

Die Primer 23S1 und 23S2 stammen aus konservierten Bereichen der cp23S rDNA (Harris et al. 1994) und erfassen alle bekannten *Symbiodinium* Clades, ohne zwischen den Clades zu differenzieren. Die Restriktionsanalyse wurde eingesetzt, um die erhaltenen Klone unterscheiden zu können. Folgende Enzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet:

NruI, HaeIII, SphI, Tse I, Tsp RI (alle Fa. New England Biolabs).

2.2.9 Sequenzierung der Plasmide und Erstellung der Konsensussequenzen

Vor der weiteren Bearbeitung der Proben wurde die Konzentration der Plasmid-DNA mit der TrayCell - Faseroptische Ultra-Mikro-Messzelle (Fa. Hellma) bestimmt. Dazu wurden jeweils 3 µL der Plasmid-DNA eingesetzt. Anfänglich wurde die Konzentration der Plasmid-DNA mit Hilfe eines 1 %igen Agaroseminigels und eines Längenstandards (1 kb Längenstandard Fa. Fermentas) abgeschätzt.

Die Plasmide wurden zur Sequenzierung an die Firma IIT Biotech bzw. Eurofins MWG Operon gesendet. In der Regel wurde mittels M13 Standardprimer sequenziert.

Die nach der Sequenzierung erhaltenen Chromatogramme wurden mit ChromasPro Version 1.5 (© 2009 Technelysium Pty Ltd) ausgewertet.

Um Lesefehler aufzudecken und auszuschließen, wurde jeder DNA Abschnitt aus beiden Richtungen sequenziert und die Chromatogramme miteinander verglichen.

2.2.10 Überprüfung der DNA-Sequenzen

Mit dem Suchalgorithmus BLAST 2.0 (Altschul et al. 1990) wurde die experimentell gewonnene DNA-Sequenz mit den in der Gendatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) bereits veröffentlichten Sequenzen verglichen. Als Ergebnis wurden Gegenüberstellungen der erstellten Sequenz mit ähnlichen Sequenzen aus der Datenbank angezeigt. Zu jeder Gegenüberstellung wurde angezeigt, wie signifikant ein Treffer ist. Die Identität der Sequenz wurde als gesichert angesehen, wenn die größten Übereinstimmungen mit bereits veröffentlichten Sequenzen von *Symbiodinium* bzw. der Aeolidida bestanden.

2.2.11 Zuordnung der *Symbiodinium*-Sequenzen

Die neu erstellten *Symbiodinium*-Sequenzen aus den Schnecken und aus deren Futterkorallen wurden mittels BLAST-Analyse mit den bekannten Sequenzen der GenBank verglichen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die neuen Sequenzen mit bereits bekannten, und den *Symbiodinium* Clades A-I zugeordneten Sequenzen aus der GenBank in einer phylogenetischen Rekonstruktion nach dem Bayesianischen-Verfahren analysiert.

Aus der GenBank wurden folgende Sequenzen verwendet: Clade A: AY035404, AY035410, AY035412, AY035406. Clade B: AY055231, AY035419, AY035421, AY035420. Clade C: AJ872086, AJ872080, AJ872079, AJ872085, AJ872084, AY035425, AJ872083, AJ872082, AJ872081, AJ872078. Clade D: AJ872089, AJ872088, AJ872087, AY035429. Clade E: AY055240. Clade F: AJ872105, AJ872104, AJ872103, AJ872102, AJ872101, AJ872098,

AJ872100, AJ872099, AJ872091, AJ872090, AJ872097. Clade G: AJ872108, AJ872106, AJ872107. Clade H: AJ872113, AJ872112, AJ872111, AJ872109, AJ872110. Clade I: FN561564, FN561563, FN561565, FN561566. Außengruppe: AJ872114 *Gymniodinium simplex*.

2.2.12 Die quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) ist eine auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR basierende Methode der Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Im Gegensatz zur normalen PCR, besteht bei der qPCR die Möglichkeit zur Quantifizierung des PCR-Produkts in Echtzeit. In allen gängigen qPCR-Methoden werden die Produkte mittels Fluoreszenzsignalen detektiert.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode detektiert das PCR-Produkt mit Hilfe eines fluorophoren Farbstoffs, dessen Fluoreszenzaussendung eine DNA-Bindung bedingt. Es handelt sich um den grün fluoreszierenden SYBR[®] Green Farbstoff (Fa. Applied Biosystems), welcher mit der doppelsträngigen DNA interkaliert.

Bei 497 nm erfolgt die Anregung des SYBR[®] Green Farbstoffes, die emittierte Fluoreszenz wird bei 520 nm gemessen. Der passive Referenzfarbstoff ROX wird bei 584 nm angeregt, die emittierte Fluoreszenz wird bei 612 nm gemessen. ROX ist im Power SYBR[®] Green Master Mix enthalten und dient als interne Referenz, mit der das SYBR[®] Green Fluoreszenzsignal zur Datenanalyse normalisiert wird. Die Auswertung erfolgt mit der StepOne[™] Software v2.1 bzw. der MxPro qPCR Software.

Die durch SYBR[®] Green bedingte Fluoreszenz verhält sich proportional zur DNA Menge. Dadurch kann der Verlauf der qPCR und die Zunahme an PCR Produkten mit Hilfe von SYBR[®] Green gemessen werden. In der Startphase (Beginn der qPCR) ist die DNA Menge gering, im Idealfall verdoppelt sich mit jedem Zyklus die Anzahl der gebildeten PCR Produkte und zum Schluss ist die Menge neu gebildeter PCR Produkte so hoch, dass die DNA-Synthese gehemmt wird. Diese Phase wird auch als Plateauphase bezeichnet. Die für die Quantifizierung wichtige Phase, ist die als exponentielle Phase bezeichnete Phase, welche zwischen Start und Plateauphase liegt. Der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig deutlich über das Hintergrundrauschen ansteigt, wird als Schwellenwert (Ct-Wert) angegeben.

Da SYBR[®] Green an jede doppelsträngige DNA bindet, also auch an unspezifische PCR-Produkte, muss am Ende des qPCR-Laufes eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Dabei wird das Reaktionsgemisch von 50 °C auf 95 °C in 1 °C Schritten erhitzt und kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Der Punkt, an dem die Fluoreszenz abfällt,

kennzeichnet das Schmelzen der doppelsträngigen DNA, der interkalierende Farbstoff wird dissoziiert. Wenn die PCR optimal eingestellt ist, sollte ein spitz zulaufender Peak zu sehen sein. Dieser Schmelzpunkt stellt das spezifische, zu erwartende Produkt dar. Unterschiedlich große Produkte und Produkte anderer Sequenz haben verschiedene Schmelzpunkte. Es ist so möglich, ein spezifisches Produkt von Artefakten zu unterscheiden (Ririe et al. 1997; Vandesompele et al. 2002).

Um das relative Verhältnis der *Symbiodinium*-Clades zueinander zu bestimmen, wurden für die Clades A, C und D spezifische Primer entwickelt. Zusätzlich wurde als Referenz ein für *Symbiodinium* universelles Primerpaar entwickelt. Die Primersequenzen sind unter Punkt 2.3 aufgeführt.

Die Quantifizierung kann relativ oder absolut erfolgen. Verwendet wurde hier die relative Quantifizierung. Es gibt zwei gebräuchliche Arten der Berechnung, die Standardkurvenmethode und die $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Beide Methoden benötigen neben der Zielsequenz eine endogene Kontrolle, auch Referenzgen genannt. In dieser Arbeit wurde ein universelles Primerpaar für das plastidäre LSU rDNA Gen verwendet, welches für die gesamte *Symbiodinium*-Gruppe geeignet ist. Als plastidäres Gen kommt das LSU-Gen nur in *Symbiodinium* vor, nicht in den Genomen der Korallenpolyphen und Schnecken. Dadurch wird dem Problem der Misch-DNA Rechnung getragen. Zur Quantifizierung werden die Ct-Werte miteinander verglichen.

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen (Symbiodinium Clade A)} - Ct \text{ Referenzgen (Symbiodinium ALL)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Schnecke} - \Delta Ct \text{ Koralle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Bei dem gerade vorgestellten Berechnungsschema wird eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus vorausgesetzt. Die Effizienz der Reaktion würde bei 2 liegen. Ausgehend von der qPCR-Effizienz und der oben vorgestellten „ $\Delta\Delta Ct$ “ Quantifizierungsmethode wurde das effizienzkorrigierte relative Quantifizierungsmodell entwickelt.

$$\text{Ratio} = \frac{E_{(\text{Zielgen})}^{\Delta Ct \text{ Zielgen (Koralle-Schnecke)}}}{E_{(\text{Referenzgen})}^{\Delta Ct \text{ Referenzgen (Koralle-Schnecke)}}$$

Die Effizienz der qPCR eines bestimmten Gens lässt sich auf verschiedene Weisen berechnen. In dieser Arbeit wurde die Effizienz mit Hilfe von Standardkurven bestimmt. Die Effizienz berechnet sich nach folgender Formel:

$$E = 10 \left(\frac{-1}{\text{Steigung}} \right)$$

Der DNA Gehalt der Proben wurde photometrisch mittels NanoDrop (Fa. Thermo Scientific) ermittelt und mit ddest. H₂O auf eine Konzentration von 10 ng DNA / 7 µL verdünnt. Die Verdünnungsreihe für die Primertests enthielten folgende Verdünnungsstufen: 1/ 10⁻¹/ 10⁻²/ 10⁻³ ng/µL.

Tabelle 2.11: qPCR Ansatz.

qPCR Ansatz	
DNA (10 ng)	7 µL
Primer Mix (je 25 pmol/µL)	3 µL
Power SYBRGreen® Master Mix (Fa. Applied Biosystems)	10 µL

Tabelle 2.12: Reaktionsprofil der qPCR.

	Wiederholungen	Temp.[°C]	Zeit[s]	Messpunkt
		50	120	
Initialdenaturierung	40	95	600	
Denaturierung	40	95	15	einfach
Annealing	40	60	60	
Schmelzkurve		50-95		kontinuierlich

Die qPCR-Läufe wurden im 7300 Real-Time PCR System (Fa. Applied Biosystems) und im Mx3005P (Fa. Agilent) durchgeführt.

Analysiert wurden *Phidiana indica*, *Phylloidesmium hyalinum*, *Phylloidesmium briareum*, *Pteraeolidia ianthina* und, soweit vorhanden, die dazugehörigen Futterorganismen (bzw. Substrate). Detaillierte Angaben zu den Versuchstieren sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

2.3 Phylogenetische Analyse der molekularen Daten

Die Cladezugehörigkeit der erstellten cpLSU rDNA-Sequenzen von *Symbiodinium* wurde mittels des oben beschriebenen BLAST 2.0 Suchalgorithmus ermittelt. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hilfe einer phylogenetischen Analyse erneut überprüft. Auf Grundlage molekularer Daten und wegen einer zu geringen Anzahl morphologischer Merkmale wird *Symbiodinium* in bis zu neun Clades eingeteilt (Pochon et al. 2006; Pochon & Gates 2010). Mit Hilfe der phylogenetischen Analyse wurden die neuen Sequenzen zusammen mit bereits bestehenden Sequenzen aus der GenBank analysiert. Die Sequenzen aus der Genbank besitzen eine genau definierte Cladezugehörigkeit und können helfen, die neu erstellten Sequenzen einzuordnen.

2.3.1 Alinierung

Die Basis der weiteren phylogenetischen Bearbeitung der gewonnenen Sequenzdaten bildet die positionelle Homologisierung (Alinierung) der Sequenzen. Besitzen mehrere Sequenzen eine ähnliche Nukleotidabfolge an bestimmten Positionen, können sie mit großer Wahrscheinlichkeit als homolog betrachtet werden. Diese Positionshomologie der Nukleotidabfolge kann mit Alinierungsprogrammen bestimmt werden. Die einzelnen Sequenzen werden dabei untereinander gelegt, homologe Basen stehen jeweils in einer Spalte. Die Alinierungen wurden mit Hilfe des Programmes MAFFT Version 6 (Kato et al. 2009) (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) erstellt. Eine Nachkorrektur erfolgte nochmals mit dem Programm BioEdit (Hall 1999) (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Die Homologie der SSU rDNA ist aufgrund der Sekundärstruktur der RNA sehr gut überprüfbar. Die SSU rDNA bringt die SSU rRNA der kleinen Untereinheit der Ribosomen hervor. Für das Funktionieren eines Ribosoms ist die räumliche Struktur der RNA von großer Bedeutung. Sequenzen nahe der core-Region des Ribosoms müssen hochkonserviert sein, entferntere Sequenzen können nach außen gefaltet werden und variabel sein. Daher kann man die Sekundärstruktur der RNA als Leitfaden für die Alinierung der Sequenzen nehmen. Da die Sekundärstruktur der SSU rRNA aus früheren unveröffentlichten Arbeiten von Robakowski bekannt ist, kann das in MAFFT erstellte Alignment überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

Die folgende Abbildung stellt die schematische Sekundärstruktur der SSU rRNA da. Auf markierte Expansionsegmente wird im Abschnitt Sekundärstrukturanalyse der SSU rRNA (2.3.5.6) näher eingegangen.

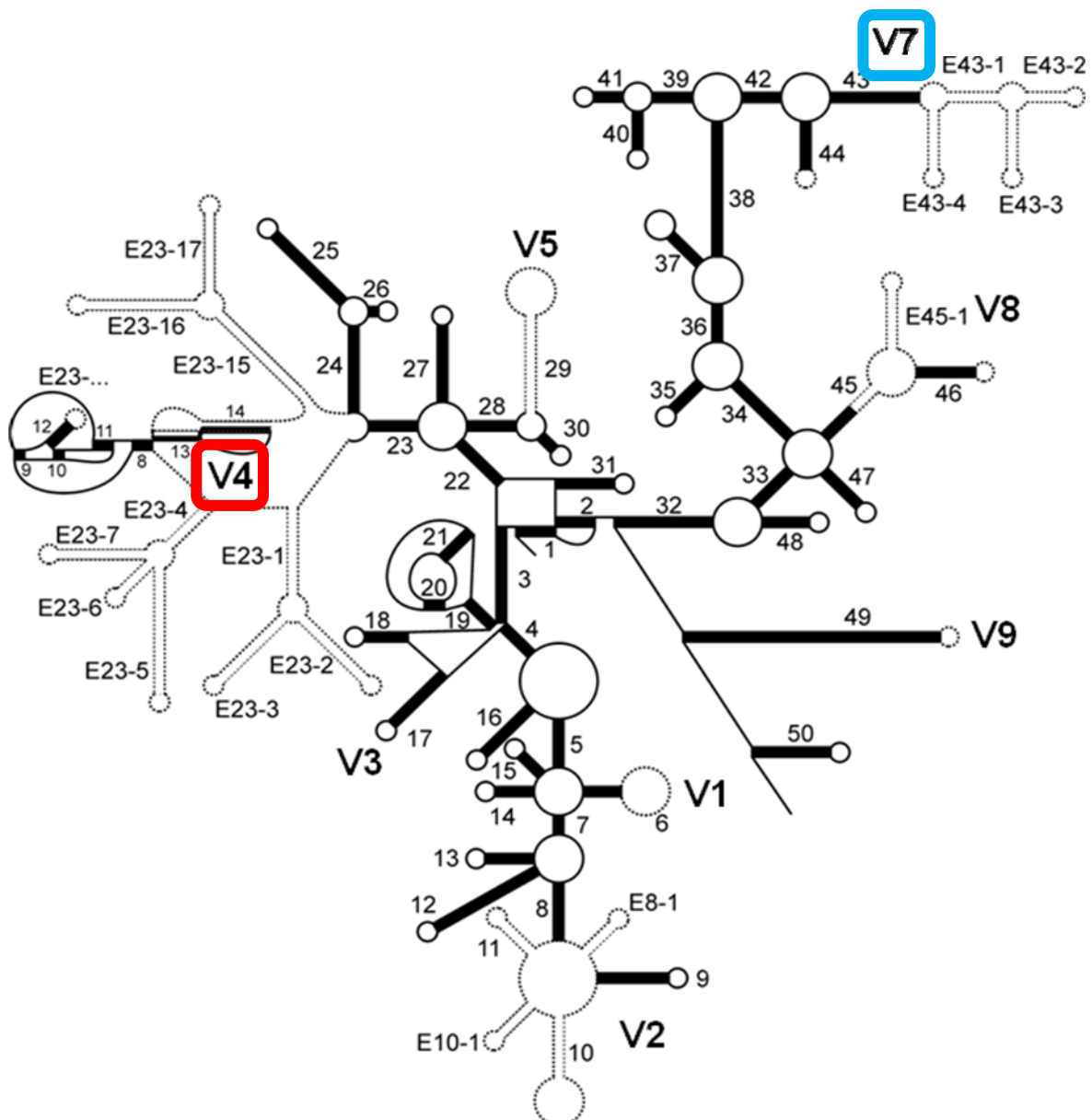


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der SSU rRNA. Die Helices und Expansions-segmente sind vom 5`- zum 3`-Terminus nummeriert. **Rot:** Expansionssegment V4;

Blau: Expansionssegment V7 (verändert nach Wuyts et al. 2001).

2.3.2 Konkatenierte Datensätze

Die ausschließliche Verwendung einzelner Gene für die molekulare Phylogenie führt oftmals zu dem Problem, dass das verwendete Gen aufgrund von Substitutionssättigung und somit fehlendem phylogenetischen Signal (molekulare Synapomorphien) nicht informativ genug ist, um eine komplette Auflösung der Taxa innerhalb einer Rekonstruktion zu erhalten. Diesem Problem begegnet man durch die Verwendung multipler Datensätze. Die Methode der konkatenierten Datensätze fasst mehrere Gene in einem Datensatz zusammen. Die

unterschiedlichen Gensequenzen werden für jedes Taxon innerhalb des Alignments in Blöcken hintereinander gestellt und erneut homologisiert. Die konkatenierten Datensätze wurden mittels BioEdit (Hall 1999) erstellt und anschließend mit PAUP*4.0b10 (Swofford 2003) analysiert.

Aufgrund des unterschiedlichen Informationsgehalts der drei Sequenz-Blöcke, musste vor Beginn der Maximum-Parsimony-Analysen eine Gewichtung der einzelnen Blöcke durchgeführt werden. Mittels PAUP wurden dafür die informativen Merkmale der Blöcke ermittelt und anschließend in Relation zueinander gesetzt.

Tabelle 2.13: Gewichtung der Datensätze für die Phylogenese der Aeolidida.

	Position	Parsimony informative Merkmale	Gewichtung (178 / Parsimony Merkmale)
SSU rDNA	1-1590	557	0,320
mtLSU rDNA	1591-1962	178	1,000
COI	1963-2554	280	0,636

2.3.3 Alinierung der plastidären LSU rDNA

Die Sequenzen der plastidären LSU rDNA von *Symbiodinium* wurden zur genauen Identifizierung in ein Alignment mit bekannten Sequenzen eingefügt. Die bereits bekannten Sequenzen gehören den acht identifizierten *Symbiodinium*-Clades an und wurden der GenBank entnommen.

2.3.4 Statistische Verfahren

Um Hypothesen zur Phylogenese der Aeolidida zu erstellen, wurde der molekulare Datensatz umfassend analysiert. Die Analysemethoden sind im Folgenden beschrieben.

2.3.4.1 Basenzusammensetzung

In phylogenetischen Rekonstruktionen führen extrem unterschiedliche Nukleotidzusammensetzungen der zu untersuchenden Sequenzen oftmals zu fragwürdigen Stammbäumen. Die Anordnung der Taxa ist hier nicht auf genealogische Verwandtschaft zurückzuführen, sondern auf eine ähnliche Basenzusammensetzung (Olsen 1988; Hasegawa & Hashimoto 1993; Steel et al. 1993; Simon et al. 1994). Mit Hilfe von PAUP*4.0b10 (Swofford 2003) wurde die Basenzusammensetzung der SSU rDNA, der mtLSU rDNA und der COI für jedes Taxon untersucht. Zusätzlich wurden die Sequenzen mittels des in PAUP* implementierten Chi-Quadrat Tests auf eine signifikante Heterogenität überprüft.

2.3.4.2 Sequenzlängen der SSU rDNA

Die Sequenzlängen der SSU rDNA wurden mit PAUP*4.0b10 (Swofford 2003) bestimmt. Für eine vergleichende Analyse wurden Bereiche am Anfang und Ende des Alignments von der Analyse ausgeschlossen, da diese Bereiche nicht für alle Taxa vorhanden waren. Gelöschte Positionen im Alignment: Von 1 bis 45 (Anfang bis Beginn Stem 4) und von 3236 bis 3273. (Ende Stem 50 bis Ende Sequenz).

Neben der Gesamtlänge wurden speziell die variablen Regionen V4 und V7 untersucht. Es wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der Sequenzlängenverteilung und der Verwandtschaft der entsprechenden Taxa gibt.

2.3.4.3 Substitutionssättigung

Ein Datensatz ist dann gesättigt, wenn die messbare genetische Distanz zweier oder mehrerer Taxa auch mit steigender evolutionärer Distanz nicht größer wird. Transversionen und Transitionen werden als sichtbare Distanzen bezeichnet.

Je größer die Divergenzzeit ist, die zwei Taxa von ihrem letzten gemeinsamen Ahn trennt, desto mehr Substitutionsereignisse können zu verzeichnen sein. Die beobachteten Distanzen zwischen zwei Sequenzen erscheinen kleiner als die tatsächlichen evolutionären Distanzen, wenn an gleichen Sequenzpositionen Mehrfachsubstitutionen auftreten. Um die Substitutionssättigung der Daten zu ermitteln, werden die sichtbaren Distanzen (p-Distanzen) gegen die korrigierten Distanzen aufgetragen. Das entsprechende Evolutionsmodell zur Korrektur der Distanzen wurde für die einzelnen Gene mit Hilfe von Modeltest (Posada & Crandall 1998) berechnet. Die anschließenden Analysen zur Substitutionssättigung erfolgten mit PAUP*4.0b10 (Swofford 2003).

2.3.4.4 Sequenzdivergenz

Einzelne Innengruppentaxa, welche durch hohe Substitutionsraten eine große Sequenzdivergenz aufweisen, führen häufig zu einer sogenannten „long branch attraction“ (Felsenstein 1978; 1988; Hendy & Penny 1989). Im Phylogramm werden solche Taxa manchmal durch besonders lange Äste sichtbar und im äußersten Fall sogar der Außengruppe zugeordnet. Die Analyse alter Verwandtschaftsbeziehungen wie in vorliegender Analysen setzt manchmal voraus, dass solche Außengruppen-Taxa gewählt werden, die eine genügend große Entfernung bei dennoch ausreichender Nähe zur Innengruppe aufweisen. Long branch attractions können oftmals durch einen paarweisen Vergleich der Sequenzdivergenz aufgedeckt werden. Die Berechnungen der Sequenzdivergenz erfolgten mit PAUP*4.0b10 (Swofford 2003) nach unten stehender Formel.

$$\text{Sequenzdivergenz} = (\text{Transversion} + \text{Transition}) \cdot 100 \cdot (\text{NAlignmentpositionen})^{-1}$$

2.3.4.5 Bestimmung der relativen Substitutionsraten

Der relative-rate Test gestattet einen Vergleich der Substitutionsraten zweier nah verwandter Taxa. Dabei werden die Substitutionsunterschiede zwischen den nah verwandten Taxa mit einem dritten, verwandtschaftlich weiter entfernten Taxon verglichen. Der hier verwendete two-cluster relative rate Test (Takezaki et al. 1995) wurde mittels des Computerprogrammes PHYLTEST (Kumar 1996) durchgeführt.

2.3.4.6 Bootstrap Test

Das 1985 von Felsenstein eingeführte Verfahren dient zum Testen phylogenetischer Stammbäume. Grundlage des Verfahrens ist die zufällige Auswahl von Merkmalen aus dem Ursprungsdatensatz. Es werden solange unabhängige Einzelstichproben gezogen, bis die Gesamtzahl der Einzelstichproben wieder der, der ursprünglichen Matrix entspricht. Dabei finden nicht alle Merkmale des Ursprungsdatensatzes Verwendung, andere wiederum fließen doppelt in den neuen Datensatz ein. Die auf Grundlage neuer Datensätze erstellten Stammbäume werden zu einem Konsensusbaum zusammengefasst. An den Knoten des Konsensusbaumes stehen prozentuale Angaben über die Häufigkeit des Knotens innerhalb der Bootstrappleikate.

2.3.4.7 Topologische Tests

Um zwei unterschiedliche Topologien miteinander vergleichen zu können, nutzt man die Hilfe topologischer Tests. So kann untersucht werden, ob sich die Topologien signifikant unterscheiden. Zur Anwendung kommt seit einiger Zeit der Approximately Unbiased Test (AU-Test) welcher erstmals 2002 von Shimodaira verwendet wurde und unter anderem im Programm CONSEL Version 0.1 verfügbar ist (Shimodaira & Hasegawa 2001).

2.3.5 Methoden zur Stammbaumrekonstruktion

2.3.5.1 Wahl der Außengruppe für die Phylogenese der Aeolidida

Bei der Erstellung phylogenetischer Rekonstruktionen kann zunächst keine Aussage über die evolutionäre Richtung der Merkmalsänderungen getroffen werden. Die Richtung wird erst durch die Verwendung einer Außengruppe festgelegt. Die Außengruppe muss sich durch Merkmale klar von der zu untersuchenden Innengruppe unterscheiden, andererseits aber auch gemeinsame Merkmale mit der Innengruppe aufweisen. Als Außengruppe dienten Taxa außerhalb der Cladobranchia. Die nächsten Verwandten der Aeolidida innerhalb der Cladobranchia kamen nicht in Frage, da sie zu viele gemeinsame Merkmale mit der Innengruppe haben. Als Außengruppe dienten *Bathydoris clavigera* (Bathydoridoidea), *Chromodoris krohni* und *Hypselodoris villafranca* (beide Doridoidea).

2.3.5.2 Distanzverfahren

Um die Distanz zweier alignierter Sequenzen zu bestimmen, werden im einfachsten Fall die Substitutionen zwischen den Sequenzen gezählt. Dividiert man die Substitutionen durch die Gesamtzahl an alignierten Positionen, erhält man die beobachtete Distanz. Diese wird auch als sichtbare Distanz oder p-Distanz bezeichnet. Bei Vorhandensein von Mehrfachsubstitutionen innerhalb der Sequenzen kann die beobachtete p-Distanz nicht als evolutionäre Distanz (d-Distanz) betrachtet werden. Diese Analyse wird für alle möglichen Sequenzpaare durchgeführt. Die Werte der sichtbaren Distanzen werden in eine Matrix überführt und anhand eines Evolutionsmodelles in evolutionäre Distanzen transformiert. Das Evolutionsmodell wird mittels Modeltestanalyse des Programms modeltest Version 3.7 (Posada & Crandall 1998) bestimmt.

2.3.5.3 Maximum-Parsimony

Die Maximum-Parsimony-Analyse basiert auf der Annahme, dass bei der Deutung empirischer Ergebnisse die sparsamste Erklärung wissenschaftlichen Charakter hat. Jede Merkmalsänderung wird als ein Schritt gezählt. Dieses Verfahren minimiert die zur Erstellung eines Stammbaumes nötigen evolutiven Schritte, ohne Annahmen über Evolutionsprozesse zu berücksichtigen. Der optimale Stammbaum ist bei der Maximum-Parsimony-Analyse der „kürzeste“ Baum. Die Analyse wird mit dem Programm PAUP*4.0b10 (Swofford 2003) durchgeführt. Werden mehrere kürzeste Bäume gefunden, werden diese als Consensus-Baum dargestellt.

2.3.5.4 Maximum-Likelihood

Im Gegensatz zur Parsimony-Analyse liegen der Maximum-Likelihood-Analyse konkrete Evolutionsmodelle zugrunde. Diese legen fest, mit welcher Wahrscheinlichkeit Sequenzsubstitutionen auftreten können. Für die Evolutionsmodelle werden verschiedenste Baumtopologien berechnet, der Baum mit dem größten Maximum-Likelihood Wert wird angezeigt. So erhält man das für den Datensatz geeignete Model. Das Ziel der Maximum-Likelihood-Analyse ist es dann, für den analysierten Datensatz, nach Vorgabe eines Evolutionsmodells, unter allen alternativen Dendrogrammen das zu finden, welches die Entstehung der terminalen Sequenzen erklärt. RAxML-7.4.0 ist ein von Stamatakis (2006) entwickeltes Programm, welches die Maximum-Likelihood-Analyse durchführt und hier verwendet wird.

2.3.5.5 Bayesianische Analyse

Die Bayesianische Analyse ist eine Variante des Maximum-Likelihood-Verfahrens. Anders als beim Maximum-Likelihood-Verfahren, ist die Grundlage der Bayesianischen-Analyse die Berechnung eines Baumes auf Grundlage des Datensatzes. Möglich wird dies durch das von dem Theologen und Mathematiker Thomas Bayes (1702-1761) entwickelte Theorem. In der molekularen Phylogenie fand es erstmals bei Huelsenbeck et al. (2001) Verwendung. Der Unterschied zum oben beschriebenen Likelihood-Verfahren, liegt in der Konvertierung der Likelihoodwerte in a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten, den sogenannten „posterior probabilities“.

Die Berechnung der a-posteriori Wahrscheinlichkeiten aus Zufallsstichproben von Bäumen bildet die Grundlage. Die mathematische Basis stellt die Metropolis-coupled Markov-Chain-Monte Carlo Simulation (mcmc) dar (Larget & Simon 1999). Mittels Bayesianischer Analyse wird ein Konsensusbaum erstellt, an dessen Knoten die jeweils berechneten a-posteriori Werte angegeben sind. Sie zeigen an, wie häufig die Knoten in allen rekonstruierten Bäumen aufgetreten sind. Ein hoher Wert wird als gutes phylogenetisches Signal interpretiert.

2.3.5.6 Sekundärstrukturanalysen der SSU rRNA

Die Sequenzen der ribosomalen RNA Gene haben sich als zuverlässige molekulare Marker für phylogenetische Fragestellungen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen etabliert. Daneben erlangt die Untersuchung ihrer Sekundärstruktur eine zunehmende Bedeutung. Zum einen kann ein verbessertes Verständnis der RNA-Struktur zu einer Optimierung der Alinierung und damit zu zuverlässigen Homologiehypthesen und phylogenetischen Analysen führen. Zum anderen werden die Merkmale der Sekundärstruktur in zunehmendem Maße für phylogenetische Fragestellungen verwendet (z. B. Billoud et al. 2000; Busse & Preisfeld 2002b; Caetano-Anolles 2002a; b; Voigt et al. 2008; Linton et al. 2010). Das Gen für die RNA-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU rDNA) umfasst gewöhnlich zwischen 1800-1900 Basenpaare und lässt sich auf Ebene der Primärstruktur in evolutionär konservierte und variable Bereiche einteilen (Ware et al. 1983). Die variablen Bereiche sind nicht nur Orte einer erhöhten Substitutionsrate, sondern auch besonders anfällig für Insertions- und Deletionsereignisse. Aus diesem Grund findet man in diesen Regionen ausgeprägte Längenunterschiede, die zur Prägung der synonym verwendeten Begriffe Expansionssegmente (Ware et al. 1983, Clark et al. 1984), variable bzw. V-Regionen (Chan et al. 1983; Gorski et al. 1987) oder divergente bzw. D-Domänen (Hassouna et al. 1984; Michot et al. 1984) führte. Innerhalb der SSU rRNA werden insgesamt neun variable Regionen unterschieden (V1 – V9).

In dieser Arbeit werden die Regionen V4 und V7 näher betrachtet (vergl. Abb. 2.3). Mit dem Computerprogramm PAUP*4.0b10 (Swofford 2003) werden die Längen sowie der GC-Gehalt der Regionen ermittelt. Die Sekundärstruktur der variablen Region 7 wird mit dem Programm mfold (Mathews et al. 1999; Zucker 2003) ermittelt und mit RnaViz Version 2 (De Rijk & De Wachter 1997; De Rijk et al. 2003) grafisch bearbeitet.

2.4 Etablierung verschiedener Symbiosesysteme im Aquarium

Um die Symbiose zwischen ausgewählten Aeolidida (*Phyllodesmium briareum*, *Aeolidiella stephanieae*) untersuchen zu können, wurden die Symbiosesysteme unter Laborbedingungen langfristig kultiviert. Abbildung 2.4 zeigt zwei Tiere der Zucht. Die Versuchstiere wurden in weiten Bechergläsern mit einem Durchmesser von 95 mm und einer Höhe von 50 mm angezogen. Das Wasser in den Gläsern ist 3 Mal pro Woche gegen „eingefahrenes“ Meerwasser aus den Aquarien



gewechselt worden. Frisches Meerwasser für das Aquarium wurde mit Meersalz der Firma Tropic Marin in vollentsalztem Wasser angesetzt. Die Dichte betrug durchschnittlich 1023 g/m^3 , die durchschnittliche Temperatur lag bei $24,8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ein 300 Liter sowie zwei 60 Liter Meerwasseraquarien standen für die weitere Hälterung adulter Tiere bereit. Die Becken waren ausgestattet mit Strömungspumpe, Abschäumer, Filter sowie Lebendgestein, welches den sessilen Organismen als Substrat zur Verankerung dient. Die Beleuchtung mit einer Dauer von 10 h wird durch Aquarienlampen erzeugt (Power Glo 48 122 cm 40 Watt T8; Marine Glo 48 122 cm 40 Watt T8). Im Aquarium gab es keinen Fischbesatz. Die Schnecken wurden in Schwimmkästen mit einer minimalen Größe von 80 x 80 x 40 mm gehalten.



Abbildung 2.4: 300 Liter Meerwasserbecken.

2.5 Identifizierung der Futterorganismen

Die Aeolidida sind Nahrungsspezialisten. Häufig ernähren sie sich von einem einzigen Futterorganismus. Zu dieser Spezialisierung sind einige Taxa in der Lage, die mit der Nahrung aufgenommenen photosynthetischen aktiven Symbionten der Futterorganismen dauerhaft zu kultivieren. Sie übernehmen sozusagen die Symbiose ihres Futterorganismus. Um ein „Netz“ der Verknüpfungen Futterorganismus – Symbiont – Schnecke aufbauen zu können, wird mit den zu Verfügung stehenden Mitteln, nach Informationen zu den Futterorganismen der Schneckenarten, den Symbionten in den Schnecken und den Symbionten in den Futterorganismen geforscht. Da diese Symbiose innerhalb der Gattung *Phyllodesmium* besonders häufig etabliert ist, wurden alle in der Phylogenie enthaltenen Arten analysiert. Es wurden Literaturangaben und Freilandbeobachtungen aufgeführt. Bei ausgewählten Arten erfolgte eine Analyse des Nahrungsverhaltens unter Laborbedingungen. Im Einzelnen handelt es sich um folgende Tiere: *Cratena peregrina*, *Godiva banyulensis*,

Spurilla neapolitana, *Aeolidiella stephanieae*, *Phyllodesmium briareum*, *Dermatobranchus albus* und eine bisher unbeschriebene *Marionia* sp.. Bis auf *Godiva banyulensis* wurden alle Tiere in Wuppertal gehältert. Die Daten zu *Godiva* wurden auf einer Exkursion nach Banyuls-sur-Mer (F) 2006 aufgenommen. Durch Präsentation verschiedener Futterorganismen konnten Informationen zur bevorzugten Nahrungsquelle erhoben und dokumentiert werden. Es war zusätzlich möglich, aus *Flabellina ischitana*, *Flabellina rubrolineata* und *Phyllodesmium kabiranum* die DNA der Futterorganismen zu isolieren, zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die Sequenzen ließen sich den Futterorganismen zuordnen.

2.6 Fluoreszenzmessung als Methode zur Detektion von Photosyntheseaktivität

Absorbiert das Photosystem II (PS II) ein Photon, kann es photochemisch zum Akzeptor geleitet, in Form von Wärme abgegeben oder als Fluoreszenz reemittiert werden. Dies hängt davon ab, ob sich das PS II im oxidierten („offenen“) oder reduzierten („geschlossen“) Zustand befindet. Mittels einer Fluorometrie wird die relative Elektronentransferrate des PS II gemessen. Einfallende Photonen regen die Elektronen des Chlorophyll a im PS II an. Dadurch werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und in der Reaktionskaskade weitergeleitet. Findet keine Weiterleitung der Elektronen statt, fallen die Elektronen in den Ausgangszustand zurück. Dabei wird Energie in Form von Fluoreszenz freigesetzt. F_0 und F_m (F_m = Fluoreszenz bei geschlossenen Reaktionszentren nach Dunkeladaption) sind als minimale und maximale Fluoreszenzausbeute einer dunkel-akklimatisierten Pflanze definiert, können aber problemlos auf die Chloroplasten von *Symbiodinium* übertragen werden.

Da auch eine Vorverdunklung des Messobjekts die völlige Oxidation nicht unbedingt gewährleistet, wird F_0 auch als Dunkelfluoreszenz bezeichnet. Die Dunkel- oder auch Grundfluoreszenz (F_0) wird gemessen, indem ein energetisch geringer Lichtimpuls gegeben wird, der nicht stark genug ist, die Photosynthese zu induzieren. Dieser Reiz hebt wie oben beschrieben die Elektronen des PS II auf ein höheres Energieniveau. Die Energie, die dann beim Rückfall der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau in Form von Fluoreszenz abgegeben wird, kann gemessen werden. Der Parameter $\Phi_{IIe-max}$ wird als Yield-Wert bezeichnet („maximum quantum Yield“ der Fluoreszenz des PSII) und gibt die relative Quantenausbeute an. Der Yield berechnet sich aus den gegebenen Werten nach folgender Gleichung.

$$\Phi_{IIe-max} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Mit $\Phi_{\text{Ile-max}}$ wird also die relative Menge der photosynthetisch aktiven Reaktionszentren der Chloroplasten beschrieben. Der Wert kann zwischen 0 und 1 liegen. Bei 0 sind alle Reaktionszentren reduziert oder aber zerstört. Das kann im Fall der Symbionten *Symbiodinium* in den Schnecken sein, wenn die aufgenommenen Symbionten von der Schnecke verdaut werden oder aber auf natürlichem Wege sterben und abgebaut werden. In beiden Fällen werden die Chloroplasten nicht mehr vom Symbionten gegen die Verdauungsenzyme der Schnecke geschützt. Bei einem theoretischen Wert von 1 wären alle Reaktionszentren oxidiert, das heißt intakt. Dieser Wert wird selbst mit voll aktiven, dunkelakklimatisierten Pflanzen nicht erreicht, hier werden Werte um 0,84 berichtet (Kitajima & Butler 1975; Bjorman & Demming 1987). Die nicht-photochemisch genutzte Energie gibt Auskunft über die Effektivität der Lichtnutzung (Renger et al., 1987). $\Phi_{\text{Ile-max}}$ wird auch als „algal health parameter“ bezeichnet (Kromkamp & Forster 2003).

Zur Untersuchung der Photosyntheseaktivität wurde ein „Pulse Amplitude Modulated Fluorometer“ (PAM) (Fa. WALZ) verwendet. Die Versuchstiere (*Phyllodesmium briareum*) wurden unter unterschiedlichen Bedingungen gehältert, zur Messung aber einheitlich dunkel akklimatisiert. Bei der Messung platziert man die Fiberglas-Optik in einer Entfernung von 1 cm zum Versuchstier. Die Fiberglas-Optik wird immer so gesetzt, dass der Bereich hinter dem Kopf der Schnecke im Mittelpunkt der Messung steht. Mittels des Mini-PAM wird die Fluoreszenz dunkelakklimatisierter Proben vor und nach der Gabe eines Lichtimpulses ($10^4 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ für 0,8 Sekunden) gemessen. Die Versuchsaufbauten werden im Folgenden beschrieben.

Photosyntheseaktivität der Symbionten von *Phyllodesmium briareum*

Aus der Literatur sind Photosynthesedaten der Symbionten von *Phyllodesmium briareum* bekannt (Burghardt et al. 2005). Aufgrund der Größe konnte man dort zwischen Juvenil- und Adultstadium unterscheiden, aber bisher gibt es keine Angaben darüber, wie alt die Tiere werden können. Um eventuelle Schwankungen oder Rückgänge der Photosyntheseraten aufgrund des Alters der Versuchstiere besser zuordnen zu können, ist es wichtig, Informationen über den Lebenszyklus der Tiere zu gewinnen. Dazu wurden frisch geschlüpfte Tiere auf ihren Futterorganismus *Briareum* sp. separiert und beobachtet. Ab einer Körpergröße von 10 mm wurde die Photosyntheserate gemessen. Die Tiere wurden wie unter Punkt 2.4 beschrieben gehältert.

Photosyntheseaktivität unter verschiedenen Beleuchtungsstärken bei hungernden *Phyllodesmium briareum*

Eine physiologische, abgeleitete Größe ist die photosynthetisch aktive Strahlung (PAR, photosynthetically active radiation), die den Energie- oder Quantenfluss auf den Bereich 380-710 nm eingrenzt. Helles Tageslicht liefert beispielsweise eine photosynthetisch aktive Strahlung von 0,3-0,4 kW m⁻² (1,5-2,0 mmol m⁻²s⁻¹). Um der Frage nachzugehen, wie die Lichtstärke die Symbiose von *Phyllodesmium briareum* und *Symbiodinium* beeinflusst, wurden drei Versuchsgruppen unter verschiedenen Lichtstärken gehältert. Alle Versuchstiere stammen aus der eigenen Zucht, waren zwischen 10 und 25 mm groß und wurden ab Versuchsbeginn ohne Futter gehältert. Die Aufzucht und Hälterung bis zum Versuchsbeginn erfolgte bei einer Lichtstärke von 40 µmol quanta m⁻²s⁻¹.

Tabelle 2.14: Versuchsaufbau Photosyntheserate der Symbionten von *Phyllodesmium briareum* unter verschiedenen Beleuchtungsstärken. 1-3 : Gruppen; N: Anzahl Versuchstiere. Wasserwechsel und Reinigung der Bechergläser erfolgten bei jeder PAM Messung (3-mal pro Woche) jede Messreihe umfasste 5 Messungen pro Tier. Zwischen jeder Messung wurden die Tiere erneut dunkelakklimatisiert.

	N	Futter	PAR [µmol quanta m ⁻² s ⁻¹]
1	16	Nein	47
2	24	Nein	8
3	13	Nein	0

Einfluss der Mikrofauna auf die Hälterung von *Phyllodesmium briareum*

Eingefahrenes Meerwasser besitzt eine reichhaltige Mikrofauna. Um die Frage zu klären, ob diese bereits ausreicht, *Phyllodesmium briareum* in völliger Dunkelheit ohne zusätzliche Nahrungsaufnahme zu ernähren, wurde eine Versuchsreihe mit sterilem Meerwasser durchgeführt. Zwei Tiere wurden in frisch angesetztem und autoklaviertem Meerwasser ohne Futter gehältert. Eine Vergleichsgruppe aus zwei Tieren wurde in eingefahrenem Meerwasser, ohne Futter gehältert. Die Hälterung fand in Dunkelheit statt. Einziger Lichtreiz war die Messung der Photosyntheserate. Diese wurde drei Mal pro Woche gemessen. Jede Messreihe bestand aus fünf Einzelmessungen pro Tier.

Photosyntheseaktivität der Symbionten von *Aeolidiella stephanieae*

Aeolidiella stephanieae gehört zu den Aeolidiidae, diese sind mit den Facelinidae, zu denen *Phyllodesmium* gehört, nahe verwandt und dient in dieser Arbeit dazu, Informationen über ähnliche Symbiosesysteme wie das von *Phyllodesmium briareum* zu bekommen.

Die Tiere stammen aus der Zucht von Pro Marin und wurden bei ihrer Ankunft in die Versuche übernommen, über das Alter der Tiere liegen keine Informationen vor. Vier Tiere wurden unter normalen Lichtbedingungen gehältert. Die Fütterung der Versuchstiere erfolgte mit *Aiptasia* sp. immer nach den PAM Messungen (drei Mal pro Woche).

Photosyntheseaktivität von *Symbiodinium* bei hungernden *Aeolidiella stephanieae*

Vier Tiere wurden direkt nach Ankunft separiert, unter normaler Beleuchtung gehalten und dabei nicht gefüttert. Die Messung der Photosyntheserate erfolgte drei Mal pro Woche, die Versuchstiere wurden vor jeder Messung dunkelakklimatisiert. An den Messtagen wurde ein Wasserwechsel vorgenommen. Vor jedem Wasserwechsel wurden Kotproben genommen.

3. Ergebnisse

Die hier dokumentierten Ergebnisse haben als erstes großes Ziel, die verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der Aeolidida aufzuklären. Nach den phylogenetischen Analysen werden die Ergebnisse zur Sequenzanalyse dargestellt, die dazu dienen können, grundlegende Eigenschaften in den Genen zu identifizieren **und** sie auf ihre Eignung als zusätzliche Merkmale zu testen. Eine Nahrungsanalyse für die Aeolidida und besonders für die Gattung *Phyllodesmium* beschließt die Rekonstruktion der Phylogenese der Aeolidida.

Ein zweites großes Ziel ist die Identifizierung der Symbionten der Gattung *Symbiodinium*, welche zu den Dinoflagellaten gehören. Hierzu war es zunächst notwendig, funktionelle *in-vivo*-Systeme zu etablieren, die reproduzierbare Ergebnisse ermöglichen. Diese Systeme werden analysiert und die Photosynthesefähigkeit von Koralle und Meeresnacktschnecke unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Anschließend werden mit Hilfe neu zu entwickelnder Methoden verschiedene *Symbiodinium*-Clades als Symbiosepartner identifiziert.

3.1 Rekonstruktion der Phylogenese der Aeolidida

Zur Rekonstruktion der Stammesgeschichte der Aeolidida können sowohl morphologische als auch molekulare Daten verwendet werden. Die phylogenetische Analyse auf molekularer Ebene beruht auf der im Zellkern kodierten SSU rDNA sowie den mitochondrialen Genen mtLSU rDNA und Cytochromoxidase I (COI). Für die Stammbaumrekonstruktionen werden die bereits beschriebenen Algorithmen und Evolutionsmodelle verwendet.

Die Datensätze einzelner Gene besitzen oftmals zu wenige Informationen, um eine Auflösung aller Taxa innerhalb der Analyse zu erreichen. Die Methode der kombinierten Datensätze (konkatenierte Datensätze) bietet eine Lösung für dieses Problem, indem Sequenzen von verschiedenen Genen in einem gemeinsamen Datensatz (hintereinander aligniert) analysiert werden.

3.1.1 Alinierungen der Sequenzen

Die Gene für die RNA-Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit variieren in ihrer Länge. So ist beispielsweise die SSU rDNA von *Flabellina babai* (Flabelliniden) 1865 bp lang, während die von *Caloria elegans* und *Phidiana indica* (Favorinidae) eine Länge von 2087 Nukleotiden aufweist. Die Nukleotide aus diesen zusätzlichen Bereichen müssen für die Rekonstruktion der Phylogenie der Aeolidida ausgeschlossen werden, da eine Homologisierung der Sequenzen aller Taxa sonst nicht möglich wäre. Sie können jedoch zur

phylogenetischen Aufschlüsselung nah verwandter Gruppen nützlich sein und als molekulare Autapomorphie der jeweiligen Gruppe betrachtet werden. Die variablen, nicht homologisierbaren Bereiche der Sequenzen werden auf Grundlage der Sekundärstruktur von der Analyse ausgeschlossen¹.

Einige Teile der unter Punkt 3.1.3 dargestellten Sequenzanalysen stellen wichtige Voraussetzungen zur korrekten Stammbaumrekonstruktion dar. In die Analyse fließen daher auch schon Daten aus der Sequenzanalyse ein. Um dennoch den Gesamtzusammenhang zu gewährleisten, werden die Sequenzanalysen später im eigentlichen Kontext zusammen beschrieben.

SSU rDNA

Das optimierte Alignment der SSU rDNA beinhaltet einschließlich der drei Außengruppentaxa 63 Taxa und hat eine Länge von 1590 bp. Davon sind 904 bp konstant, 129 variabel, aber Parsimonie-uninformativ und 557 bp variabel und Parsimonie-informativ. Die Sequenzen von 44 Taxa sind vollständig (Tab. 3.5). *Calmella cavolini* (85), *Flabellina bicolor* und *Pteraeolidia ianthina* (INO, Sulawesi) sind nicht in die Multigenanalyse eingeflossen, da hier sowohl die COI als auch die mtLSU rDNA Daten fehlen. Acht Taxa mit unvollständigen SSU rDNA Sequenzen (<1100 bp) wurden von der SSU rDNA-Analyse ausgeschlossen, konnten aber aufgrund ausreichend vieler Basenpaare in der Multigenanalyse enthalten bleiben (*Flabellina rubrolineata*, *Phestilla lugubris*, *Caloria elegans* (IT, Giglio), *Facelina rubrovittata*, *Phyllodesmium lizardensis*, *Aeolidiella stephanieae*, *Cratena lineata*, *Favorinus branchialis*).

mtLSU rDNA

Die Sequenzen der mtLSU rDNA sind gut alignierbar, d.h. es sind viele homologisierbare Bereiche vorhanden, so dass Alinierungslücken nur in wenigen Fällen eingefügt werden müssen. Auch hier werden die variablen, nicht homologisierbaren Positionen von der Analyse ausgeschlossen. Das optimierte Alignment für die partielle mtLSU rDNA enthält 58 Taxa (55 Innengruppe) und hat eine Länge von 372 bp. Davon sind 159 Positionen konstant, 35 Positionen variabel, aber Parsimonie-uninformativ und 178 Positionen variabel und Parsimonie-informativ. Für folgende Tiere konnten die Sequenzen der mtLSU rDNA nicht amplifiziert und sequenziert werden: *Eubbranchus* sp., *Nanuca sebastiani*.

Cytochromoxidase I

Die Alinierung der Cytochromoxidase für die Aeolidida umfasst 55 Sequenzen (52 Innengruppe, 3 Außengruppe). Von *Spurilla australis* (Tier 208; Tier 211), *Phyllodesmium crypticum*, *Phyllodesmium lizardensis*, *Phyllodesmium macphersonae* und *Phyllodesmium rudmani* welche im Multigen-Alignment verwendet wurden, lagen für die COI keine Sequenzdaten vor.

Das Alignment zeigt eine Länge von 582 bp mit 264 konstanten Positionen, 63 variablen, jedoch Parsimonie-uniformativen und 280 variablen und Parsimonie-informativen Merkmalen.

Konkatenierter Datensatz

Der zusammengefasste Datensatz aus den Sequenzen der SSU rDNA, der mtLSU rDNA und der Cytochromoxidase I hat eine Länge von 2554 bp. Davon sind 1333 bp konstant, 203 bp variabel, aber Parsimonie-uninformativ und 1018 bp variabel und Parsimonie-informativ. Er enthält die Sequenzen von 57 Innengruppen-Taxa sowie drei Taxa in der Außengruppe. Die analysierten Positionen entsprechen denen der drei Einzeldatensätze.

3.1.2 Stammbaumrekonstruktion der Aeolidida

Maximum-Parsimonie-Analyse

Im Maximum-Parsimonie-Verfahren wird die Baumtopologie gesucht, die die wenigsten Merkmalsänderungen benötigt um evolutionäre Schritte zu rekonstruieren. Wie im Abschnitt 2.3.2 bereits gezeigt, unterscheiden sich die drei Gene in der Anzahl ihrer Parsimonie-informativen Merkmale. Da aber die Anzahl dieser Merkmale eine wesentliche Rolle bei der Erstellung der korrekten Baumtopologie spielt, war es notwendig, den Datensatz so zu gewichten, dass von jedem Gen der gleiche Anteil Parsimonie-informativer Merkmale in die Analyse einfließt. Dadurch wird verhindert, dass ein Gen aufgrund höherer Anzahl an Parsimonie-informativen Merkmalen die Topologie bestimmt. Als Grundlage wurde die Analyse zunächst mit dem ungewichteten Datensatz durchgeführt. Die Topologie wird mittels Bootstrap-Analyse (1000 Replikate) überprüft, die verwendeten Suchparameter entsprechen denen der heuristischen Suche.

Die Analyse, welche gemäß den Parsimonie-Kriterien für den ungewichteten Datensatz der Aeolidida durchgeführt wurde, ergab zehn gleich kurze Bäume mit einer Baumlänge von 6629 Schritten. Die Analyse mit dem gewichteten Datensatz ergab aufgrund der geeigneteren Bedingungen einen kürzesten Baum von 4029 Schritten (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Parsimonie-Analyse des kombinierten Datensatzes der Aeolidida. Gewichteter und ungewichteter Datensatz.

	gewichtet	ungewichtet
Bäume	1	10
Schritte	4029	6629
CI	0,247	0,298
RI	0,602	0,720
HI	0,753	0,702

Das in Abbildung 3.1 dargestellte Kladogramm wurde anhand der gewichteten Datenblöcke rekonstruiert. Es unterscheidet sich an wenigen Splits von dem Kladogramm des ungewichteten Datensatzes, sichtbar an der Unterstützung in Form von Bootstrap-Werten (oberhalb der Splits: gewichtet; unterhalb der Splits: ungewichtet).

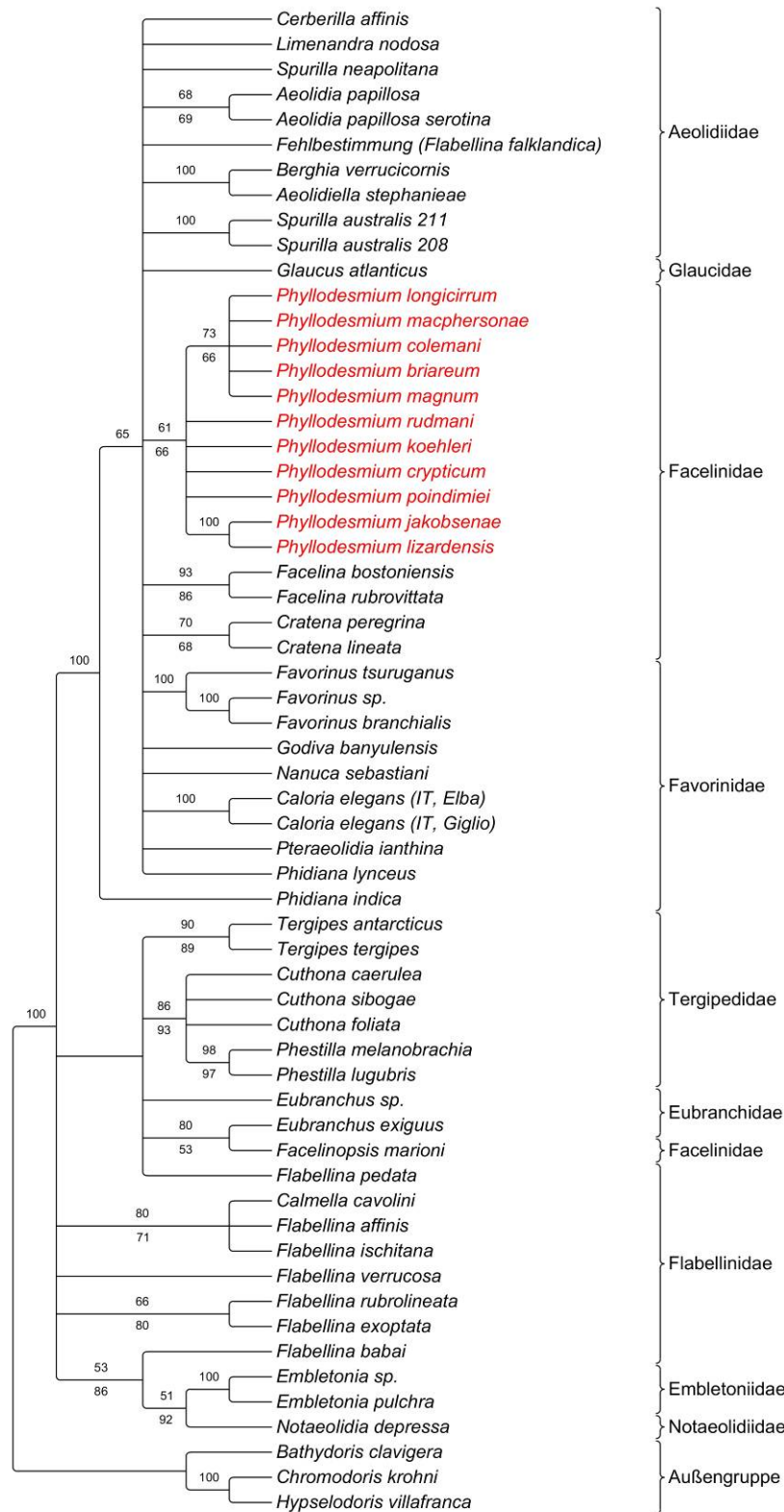


Abbildung 3.1: gewichteter Maximum-Parsimonie-Konsensusbaum (aus 1 Baum) der Aeolidia.

Erstellt anhand des Alignments der SSU rDNA, mtLSU rDNA und COI. Es wurden nur informative Merkmale mit in die Analyse einbezogen. Die Länge des kürzesten Baumes beträgt 4029 Schritte. Die Bootstrapwerte aus 1000 Replikaten sind oberhalb der Äste angegeben. Die Berechnungen wurden mit dem Programm PAUP*4.0b10 durchgeführt. Im Falle unterschiedlicher Bootstrapwerte im ungewichteten Stammbaum sind diese unterhalb der Äste angegeben. **Rot:** *Phylloidesmium* bildet ein Monophylum. Der errechnete Konsensusbaum setzt sich aus solchen Verzweigungen zusammen, die in mindestens 50 % der berechneten Topologien enthalten sind (50 % majority rule). (Wichtung SSU rDNA: 0,32; mtLSU rDNA: 1,00; COI: 0,64).

Es ist zu erkennen, dass das untersuchte Taxon Aeolidida mit einer Bootstrap-Unterstützung von 100 als ein monophyletisches Taxon dargestellt ist. Eine als *Flabellina falklandica* beschriebene Art findet sich unter den Aeolidiidae obwohl sie zur Familie der nicht weiter aufgelösten Falbellinidae gehört. Bei diesem Tier handelt es sich offensichtlich um eine Fehlbestimmung. Eine abschließende Bestimmung steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus. Ebenfalls sind die Familien Aeolidiidae, Facelinidae, Favorinidae und Glaucidae mit sehr guter Unterstützung jeweils als Monophylum dargestellt. Die weiteren Familien sind dieser Analyse nach von unklarer phylogenetischer Verwandtschaft. Es war daher nötig, komplexere Analyseverfahren anzuwenden.

Maximum-Likelihood-Analyse

Das Maximum-Likelihood-Verfahren bietet die Möglichkeit zur Rekonstruktion von Stammbäumen unter Anwendung von Evolutionsmodellen. Grundsätzlich wird im Maximum-Likelihood-Verfahren unter allen möglichen Baumtopologien diejenige gesucht, die mit größter Wahrscheinlichkeit („likelihood“) die Entstehung der terminalen Taxa erklärt. Zu Erstellung der Topologie für den vorliegenden Datensatz wurde das **General Time Reversible** Evolutionsmodell von Tavaré (1986) verwendet. Dieses Modell unterscheidet die Substitutionsrichtungen nicht und geht von einer flexiblen Basenzusammensetzung aus.

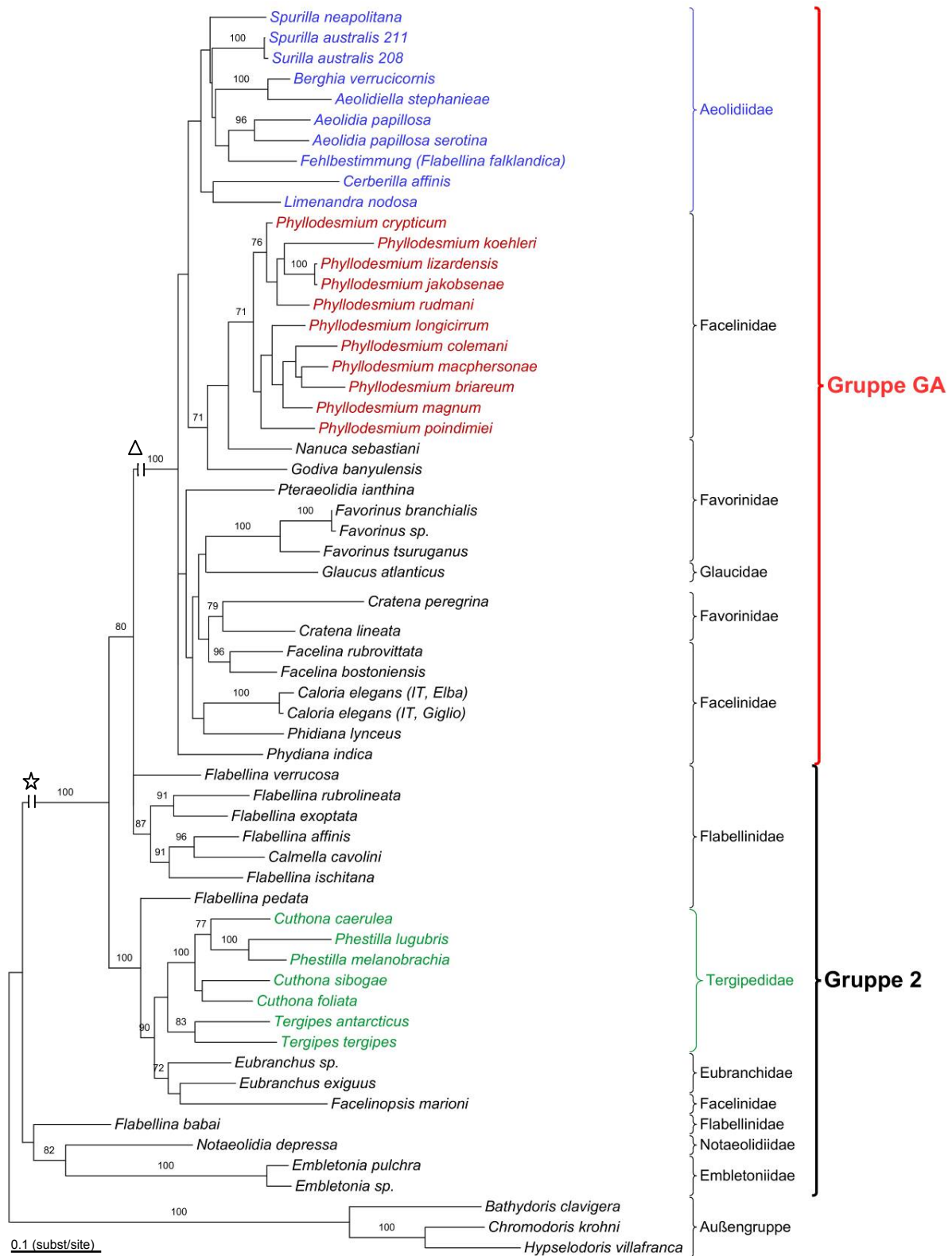


Abbildung 3.2: Maximum-Likelihood-Phylogramm, erstellt anhand des kombinierten Aeolidida Datensatzes. Der Baum wurde auf Grundlage des GTR Evolutionsmodells (Tavaré 1986) ermittelt.

Ln Likelihood = -30180.521232. Die Bootstrapanalysen wurden mit je 1000 Replikaten durchgeführt. Die Bootstrappwerte der Maximum-Likelihood-Analyse stehen oberhalb der Äste, die der Maximum-Parsimonie Analyse stehen unterhalb. Ausgewählte Monophyla sind farblich unterlegt. Werte ab 95 sind statistisch signifikant. Stern: Unterbrochener Ast entspricht 3 Substitutionen/Position; Dreieck: Unterbrochener Ast entspricht 1,6 Substitutionen/Position.

Anhand der Maximum-Likelihood-Analyse (Abb. 3.2) lässt sich durch den Einsatz von Evolutionsmodellen, die auf den in den Sequenzanalysen ermittelten Werten basieren (3.1.3), nicht nur eine klare Monophylie der Aeolidida ableiten, sondern auch eine gut unterstützte monophyletischen Gruppe zu erkennen. In dieser sind die Aeolidiidae, Favorinidae, Facelinidae und Glaucidae zu finden. Die anderen Aeolidida bilden kein Monophylum, werden aber für die weiteren Analysen unter dem Namen Gruppe 2 bearbeitet. Dazu gehören die Eubbranchidae, Embletoniidae, Flabellinidae, Tergipedidae und Notaeolidiidae. Zusätzlich werden weitere Monophyla gefunden, jedoch nicht durch hohe Bootstrapwerte unterstützt. Dies betrifft insbesondere die Aeolidiidae (blau unterlegt) und die Tergipedidae (grün unterlegt). Da auch mit dieser Methode die Evolution offensichtlich nicht ausreichend modelliert werden konnte, schließt sich eine weitere Analyse mit größerer Modellierungsfreiheit an.

Auf eine mögliche Übereinstimmung mit morphologischen Merkmalen wird später noch eingegangen (4.1).

Bayesianische-Analyse

Im Gegensatz zur Maximum-Likelihood-Analyse, welche unter einem gegebenen Modell der Sequenzevolution die Likelihood-Werte der Daten maximiert, um so den besten Stammbaum zu ermitteln, ist die Grundlage der Bayesianischen-Analyse mit MrBayes die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten eines Baumes auf Grundlage des Datensatzes. Weiterhin erlaubt die Bayesianische-Analyse die größte Einflussnahme bei der Modellierung des Evolutionsprozesses.

Der resultierende Bayesianische Baum (Abb. 3.3) unterscheidet sich zwar nur an wenigen Stellen von der vorher gezeigten Topologie, erhält aber an bedeutenden Splits mehr Unterstützung.

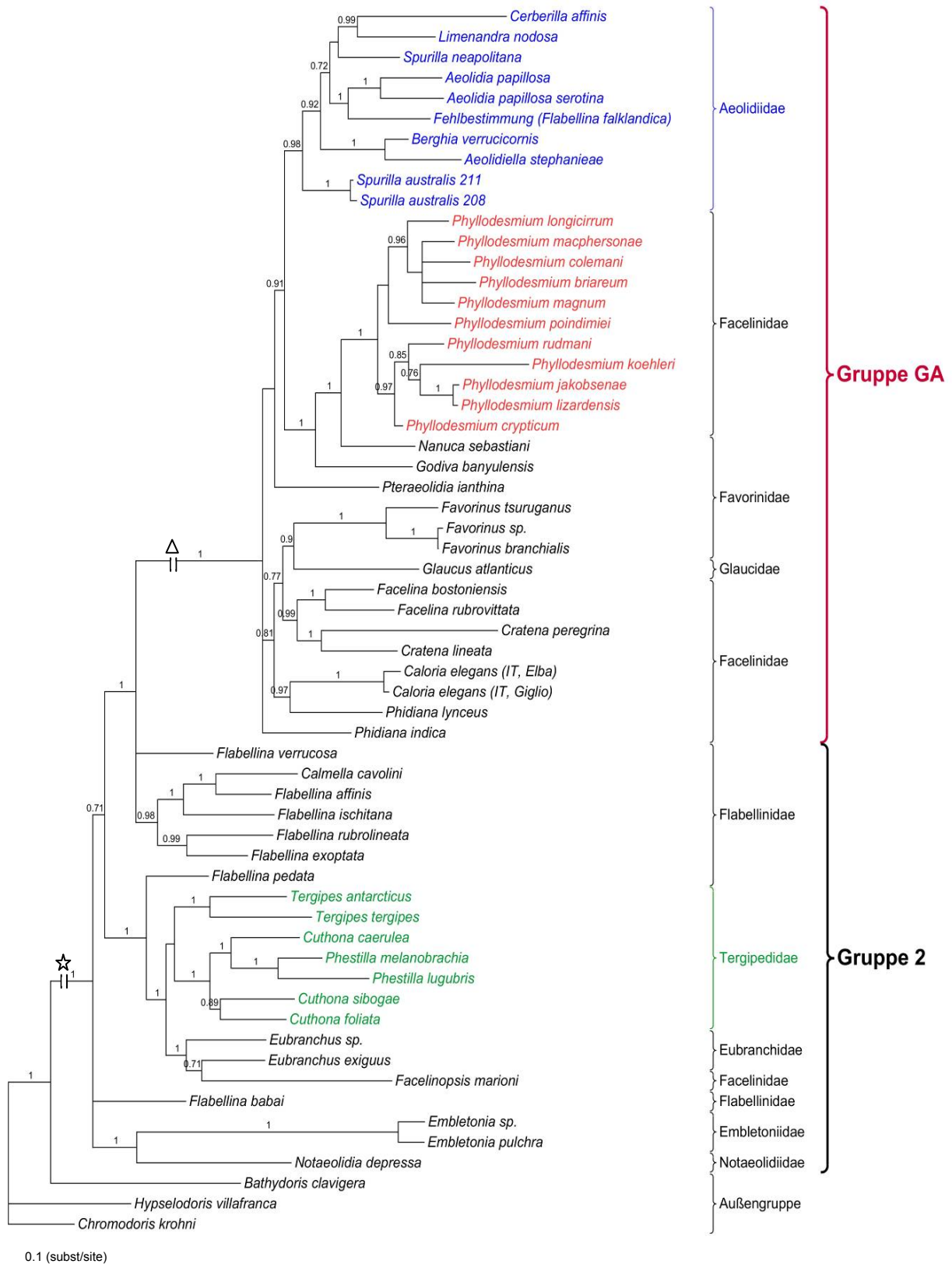


Abbildung 3.3: Bayesianisches-Phylogramm (50 % majority rule Konsensusbaum), erstellt anhand des kombinierten Datensatzes. Für die Analyse sind folgende Annahmen getroffen worden: 1.000.000 Generationen, samplefreq = 1000, nchains = 4, burnin = 200. Die Zahlen geben die a-posteriori Wahrscheinlichkeiten des entsprechenden Knotens an. Nur Werte über 0,7 sind dargestellt. Werte ab 0,95 sind statistisch signifikant. Ausgewählte Monophyla sind farbig unterlegt. Stern: Unterbrochener Ast entspricht 3 Substitutionen/Position; Dreieck: Unterbrochener Ast entspricht 1,6 Substitutionen/Position.

Innerhalb der monophyletischen Aeolidida stellt sich wie auch schon vorher ein größeres Monophylum heraus, welches im Folgenden näher beschrieben wird. Dieses Monophylum wird im Weiteren in Ermangelung einer taxonomischen Bezeichnung als Gruppe GA bezeichnet.

Die **Aeolidiidae** (blau) bilden ein gut unterstütztes Monophylum. Der erste gut gestützte Split führt in einer Linie zu *Spurilla australis*, in der anderen Linie zu allen restlichen Aeolidiidae. Im Gegensatz dazu befanden sich in der Maximum-Likelihood-Analyse *Cerberilla affinis* und *Limenandra nodosa* ohne Unterstützung an der Basis der Aeolidiidae, was vermutlich auf einen *long branch attraction*-Effekt zurückzuführen ist. Der nächste Split enthält auf der einen Seite *Berghia verrucicornis* und *Aeolidiella stephanieae* und einer im Folgenden beschriebenen Gruppierung auf der anderen Seite. Weitere Arten (*Spurilla neapolitana*, *Limenandra nodosa* und *Cerberilla affinis*) bilden keine aufgrund von morphologischen Merkmalen identifizierte Gruppe.

Die **Facelinidae** und die **Favorinidae** stellen wie nach morphologischen Analysen zu erwarten, keine Monophyla dar. Sowohl die Favoriniden als auch die Faceliniden werden als paraphyletische Gruppierungen identifiziert. Auf Gattungsebene allerdings sind gut unterstützte monophyletische Gruppierungen zu finden. Die Gattung *Phyllodesmium* (Facelinidae; rot) bildet in allen konstruierten Topologien ein Monophylum in naher Verwandtschaft zu den Favoriniden. Das Genus *Phyllodesmium* ist von besonderem Interesse und wird an späterer Stelle dezidiert unter Verwendung eines weiteren, auf dieses Taxon zugeschnittenen Datensatzes analysiert.

Die zweite paraphyletische Gruppierung der Faceliniden zeigt ebenfalls eine gute Darstellung der Gattungen. *Caloria* als ein gut unterstütztes Monophylum mit *Phidiana lynceus* an der Basis. *Phidiana indica* steht an der Basis einer nicht aufgelösten Gruppierung aus Glaucidae, Favorinidae und Facelinidae.

Bis auf *Facelinopsis marioni*, welches zu den Facelinidae gehört, enthält die Gruppe GA alle untersuchten Taxa der Aeolidiidae, Facelinidae, Favorinidae und Glaucidae. Die Sonderstellung von *Facelinopsis marioni* wird im Anschluss diskutiert.

Die Favorinidae bilden wie schon angesprochen paraphyletische Gruppierungen. Ein sehr gut (posterior probabilities 1) unterstütztes Monophylum bilden die drei Taxa der Gattung *Favorinus*, mit *Favorinus tsuruganus* an der Basis. *Glaucus atlanticus* als Vertreter der **Glaucidae** bildet die Schwestergruppe der Gattung *Favorinus*.

Zur den monophyletischen **Tergipedidae** (grün) gehören die Gattungen *Tergipes* mit guter Unterstützung, sowie die Gattung *Cuthona*, welche aber nicht monophyletisch dargestellt wird, sondern ebenfalls das Genus *Phestilla* mit einschließt.

Die **Eubbranchidae** und *Facelinopsis marioni* bilden die Schwestergruppe der Tergipedidae.

Auch die **Flabellinidae** bilden zwei paraphyletische Gruppen. Obwohl die Mehrzahl dieses Genus gut unterstützt dargestellt ist, stehen die anderen Flabellinidae verteilt im Baum. *Flabellina pedata* steht an der Basis der Tergipedidae und Eubbranchidae. *Flabellina babai* steht noch basaler in der Gruppe mit *Notaeolidia depressa* (**Notaeolidiidae**) und den beiden *Embletonia*-Arten (**Embletoniidae**). Für *Flabellina verrucosa* und *Flabellina babai* konnte in der Bayesianischen-Topologie kein Schwestertaxon identifiziert werden. *Notaeolidia depressa*, *Embletonia sp.* und *Embletonia pulchra* stehen an der Basis der Aeolidida.

Die mit der Bayesianischen-Analyse gefundene Topologie wird auch mit Verfahren zur Distanzanalyse gefunden, aus Gründen der Übersichtlichkeit hier aber nicht dargestellt.

3.1.3 Sequenzanalysen

Die Sequenzanalysen beinhalten eine Vielzahl von Analysemethoden, welche unter Punkt 2.3.4 theoretisch bereits besprochen wurden. Sie werden auf den vorhandenen Datensatz angewendet, um zum Einen *a priori*, also vor der phylogenetischen Analyse zu untersuchen ob die Daten miteinander verglichen werden dürfen, und zum Anderen um *a posteriori* weitere Informationen aus den Daten zu ziehen. Dies sind beispielsweise die Basenzusammensetzungen, die Sequenzlängen oder die Evolutionsgeschwindigkeiten. Im Folgenden werden nun zunächst die Ergebnisse der *a priori* Analysen vorgestellt, die bereits in die schon dargestellte Stammbaumrekonstruktion eingeflossen sind.

Basenzusammensetzung und Basenhomogenität

Die Ermittlung der Nukleotidzusammensetzung terminaler Taxa ist für die Rekonstruktion der Phylogese der Aeolidida eine notwendige Voraussetzung, um das passende Evolutionsmodell auszuwählen. In den eingesetzten Maximum-Likelihood-Verfahren werden Evolutionsprozesse anhand von Modellen simuliert, wobei die Basenzusammensetzung als ein Parameter in das Modell einfließt.

Der Chi-Quadrat-Test zur Bestimmung der interspezifischen Homogenität der Basenzusammensetzung gibt für die drei untersuchten Gene der Aeolidida ein Wahrscheinlichkeitsniveau von $P = 0,97 - 1,0$ an (Tab. 3.2). Es liegen demnach keine signifikanten Unterschiede in der Basenfrequenz des Datensatzes vor. Damit ist gezeigt, dass die phylogenetische Analyse nicht durch eine unausgeglichene Basenzusammensetzung beeinflusst wird. Bei gesonderter Analyse der einzelnen Codonpositionen zeigt erwartungsgemäß nur die dritte Position der Cytochromoxidase I eine signifikante

Heterogenität der Basenzusammensetzung. Zur Klärung besonderer im späteren genauer dargelegten Fragestellungen wird auch diese Position dennoch für weitere Analysen genutzt.

Tabelle 3.2: Chi-Quadrat Test auf Basenhomogenität zwischen den untersuchten Taxa.

Chi-Quadrat: Abweichungen der beobachteten Daten von den erwarteten Daten, df: Freiheitsgrade, P: Wahrscheinlichkeit.

SSU rDNA	Chi-Quadrat	df	P
Alle Sequenzen	64.789.594	177	0.76209491
Innengruppe	83.954.420	168	0.99999999
Außengruppe	4.564.921	6	0.60069524
mtLSU rDNA	Chi-Quadrat	df	P
Alle Sequenzen	68.464.001	177	1.00000000
Innengruppe	65.458.713	168	1.00000000
Außengruppe	1.286.360	6	0.97240451
COI	Chi-Quadrat	df	P
Alle Sequenzen	149.417.396	177	0.93498676
Innengruppe	134.990.906	168	0.97111326
Außengruppe	6.701.381	6	0.34934810
COI 1. & 2. Position	Chi-Quadrat	df	P
Alle Sequenzen	149.417.396	177	0.93498676
Innengruppe	60.231.782	168	1.00000000
Außengruppe	1.965.967	6	0.92280183
COI 3. Position	Chi-Quadrat	df	P
Alle Sequenzen	217.361.030	177	0.02089128
Innengruppe	202.911.321	168	0.03419527
Außengruppe	10.381.004	6	0.10949712

Tabelle 3.3: Basenzusammensetzung und GC-Gehalt der untersuchten Gene der Innengruppe in Prozent. Außengruppe nicht dargestellt. \bar{x} : Mittelwert, s: Standardabweichung.

		A	C	G	T	GC
SSU rDNA	\bar{x}	20,11	27,85	33,41	18,63	61,26
	s	1,01	0,87	1,03	0,54	0,91
mtLSU rDNA	\bar{x}	31,25	13,74	22,96	32,06	36,04
	s	1,07	1,19	1,37	1,65	5,27
COI	\bar{x}	23,30	17,22	20,48	39,00	37,70
	s	1,71	1,59	1,81	1,75	2,31

Die kernkodierte SSU rDNA weist einen höheren GC-Gehalt als die mitochondrialen Gene (mtLSU rDNA, COI). Innerhalb eines Gens ist die Basenzusammensetzung homogen. Die Gene mtLSU rDNA und COI weisen einen ähnlich niedrigen GC-Gehalt auf. Graphisch lassen sich die unterschiedlichen GC-Gehalte der drei Gene wie folgt darstellen (Abb. 3.4).

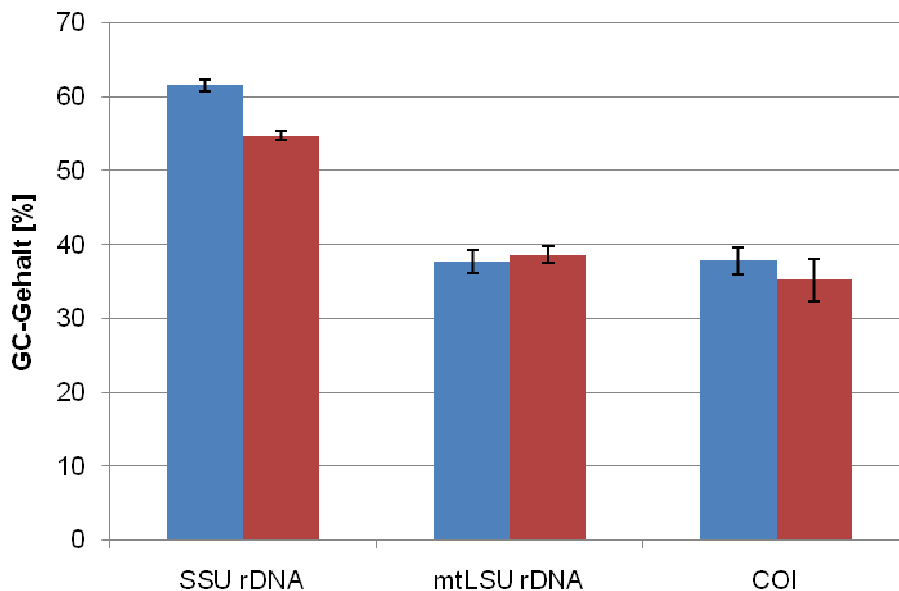


Abbildung 3.4: GC-Gehalt der untersuchten Gene. Innengruppe (**blau**) und Außengruppe (**rot**).

Der hohe GC-Gehalt der SSU rDNA sowie die Unterschiede zwischen Innen- und Außengruppe bieten Anlass, den GC-Gehalt für die einzelnen Aeolidida weiterführend zu analysieren. Dabei diene das für die phylogenetische Rekonstruktion genutzte Alignment als Ausgangsdatensatz. Im Folgenden werden die ermittelten GC-Werte auf die phylogenetische Rekonstruktion der Aeolidida projiziert (Abb. 3.5). Deutlich wird bei dieser Darstellungsform der niedrigere GC-Gehalt der Außengruppentaxa.

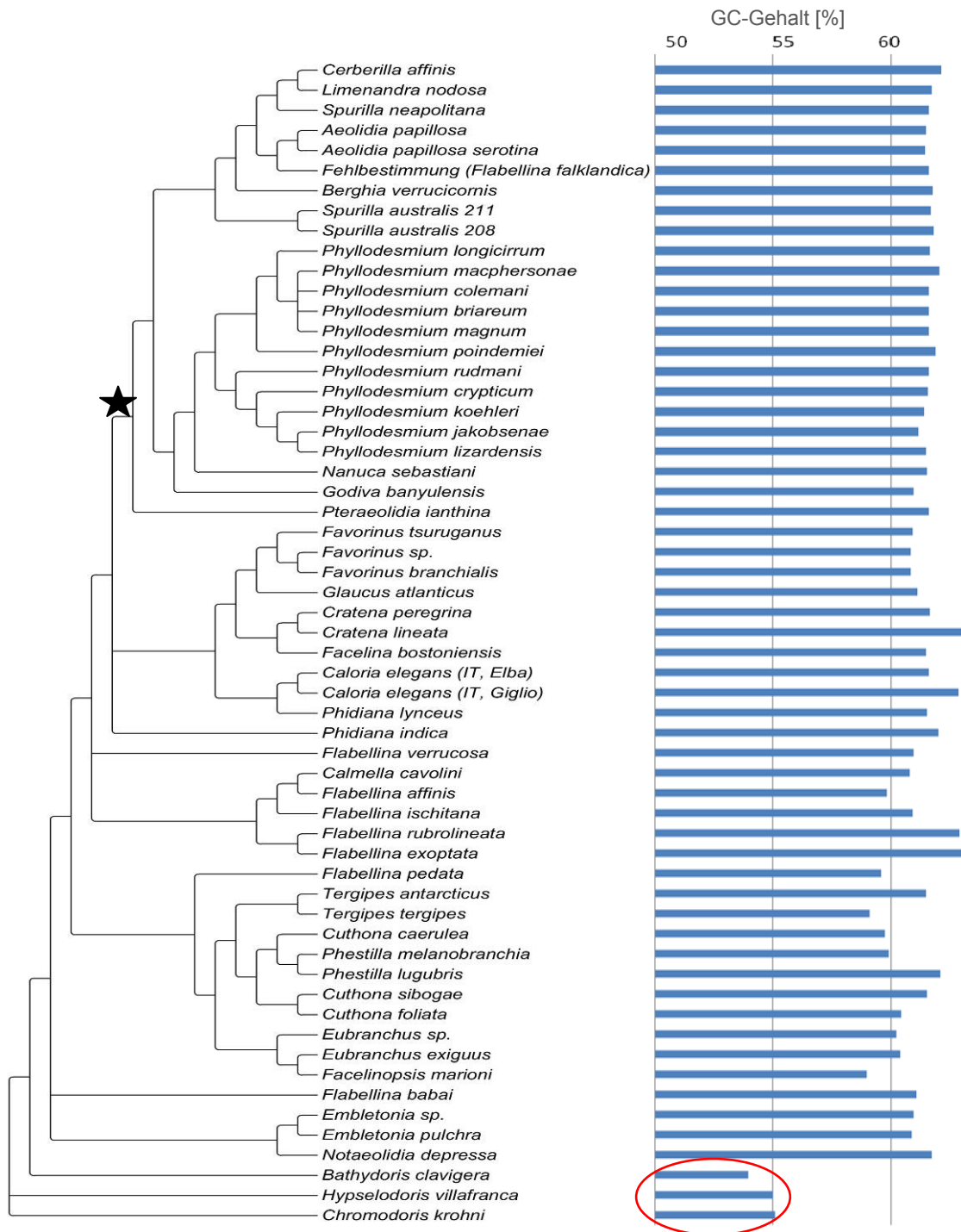


Abbildung 3.5: Prozentualer GC-Gehalt der SSU rDNA auf die Phylogenie der Aeolidida projiziert. Der GC-Gehalt der Außengruppentaxa ist rot markiert. Stern: Monophylum GA mit wenig schwankendem GC-Gehalt.

Weiterhin zeigen die Taxa aus dem Monophylum (Gruppe GA, Stern) wenig schwankende GC-Gehalte, wohingegen die Werte der restlichen Aeolidida Unterschiede von über 6 % aufweisen. Veränderungen im GC-Gehalt kommen also offensichtlich eher an der Basis der Aeolidida vor, während das Monophylum Gruppe GA ein sehr konstantes GC-Verhältnis präsentiert.

Bei gesonderten, hier nicht dargestellten Analysen in den variablen Bereichen hat sich gezeigt, dass der GC-Gehalt in den variablen Bereichen teilweise Werte von über 75 % erreichen kann (z. B. *Notaeolidia depressa*) und die core-Regionen Werte von gut 50 % aufweisen.

Analyse der Substitutionsättigung

Je länger Arten evolutiv voneinander getrennt sind, desto größer wird durch multiple Austausche die Diskrepanz zwischen den beobachteten und den tatsächlich stattgefundenen Substitutionen. Diese Mehrfachsubstitutionen können zu Homoplasien führen, die in der phylogenetischen Analyse fälschlicherweise als Synapomorphien der Sequenzen wirken. Der verwendete Datensatz wird mithilfe einer modell-abhängigen Analyse auf eine Sättigung der Substitutionen untersucht (Tab. 3.4, 3.5). Grundlage der Analyse ist der Vergleich der sichtbaren genetischen Distanzen (p-Distanzen) mit den durch ein Modell der Sequenz-evolution korrigierten Distanzen (d-Distanzen).

Tabelle 3.4: Evolutionsmodelle als Grundlage zur Berechnung der Distanzen.

Modell	Name	Basenfrequenz	Substitutionsraten
TrN	Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993)	Ungleich	a=c=d=f, b=e
TVM	Transversionsmodell	Ungleich	a, c, d, f, b=e
GTR	General time reversible (=REV) (Tavaré 1986)	Ungleich	a, c, d, f, b, e

Tabelle 3.5: Modelle zur Korrektur der Sequenzevolution für die einzelnen Datensätze, ermittelt über Modeltest (Posada et al. 1998). I: Anteil invariabler Positionen, G: Formparameter der Gamma-Verteilung.

	Modell	I	G
SSU rDNA	TrN+I+G	0,2280	0,4912
mtLSU rDNA	TVM+I+G	0,2463	0,3720
COI	GTR+I+G	0,2463	0,1996

Die verwendeten Modelle gehen alle von gleicher Substitutionswahrscheinlichkeit bezogen auf eine Zeiteinheit aus. Dabei werden eine homogene Sequenzevolution sowie unabhängige Substitutionen vorausgesetzt. Der Anteil invariabler Positionen bezieht sich auf den Ratenunterschied zwischen den homologisierten Alinmentpositionen. Er gibt an, wie hoch der Anteil sich nicht ändernder Alinmentpositionen ist. In den untersuchten Genen liegt der Anteil bei durchschnittlich 0,23. Die relativen Raten können der Form der Gamma-Verteilung entnommen werden. Der Formparameter ist ein Maß für dessen Form. Ein Wert < 1 hat eine L-förmige Verteilung zur Folge, für viele Alinmentpositionen bedeutet dies, dass sie sehr geringe Substitutionsraten haben. Nur ein geringer Anteil hat hohe Substitutions-

raten. Im Bezug auf die untersuchten Gene besitzt die COI die meisten Alinmentpositionen mit geringen Substitutionsraten, die SSU rDNA die wenigsten (Tab. 3.5).

Unterzieht man den **SSU rDNA** Datensatz einer Substitutionssättigungsanalyse unter Verwendung des TrN+I+G Modells, zeigt sich mit zunehmender Distanz eine Akkumulation von multiplen Substitutionsereignissen, sichtbar durch die zunehmende Inkongruenz von Graph und Gerade (Abb. 3.6). Der Datensatz weist bei geringen Distanzen keine Sättigung auf. Höhere Distanzwerte sind bei den Vergleichen der Außengruppe (grün) mit der Innengruppe, sowie zwischen den Embletoniidae (rot) und bestimmten Innengruppentaxa zu finden (Facelinidae, Aeolidiidae und Teile der Favorinidae). Die Distanzen zwischen den Embletoniidae und den Flabellinidae sind sehr gering. Das bedeutet, dass bei dem hier verwendeten Datensatz keine hohen Substitutionssättigungen zu beobachten sind.

Eine Substitutionssättigungsanalyse des **mtLSU rDNA** Datensatzes der Aeolidida zeigt bei den Innengruppentaxa keine Sättigung. Beim Vergleich der Außengruppe mit der Innengruppe zeigt sich eine leichte, und beim Vergleich des Genus *Embletonia* mit der Innengruppe eine starke Sättigung. Damit ist die mtLSU rDNA der Aeolidida nach dem Aufspaltungereignis offensichtlich homogener geblieben und weniger schnell evolviert als die Außengruppe bzw. das Genus *Embletonia*.

Für den Datensatz der **COI** ist keine Sättigung zu verzeichnen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass keines der untersuchten Gene eine vollständige Sättigung aufweist und das phylogenetische Signal offensichtlich auf Apomorphien zurückzuführen ist. Der Datensatz kann für eine valide Rekonstruktion der Phylogenese der Aeolidida verwendet werden.

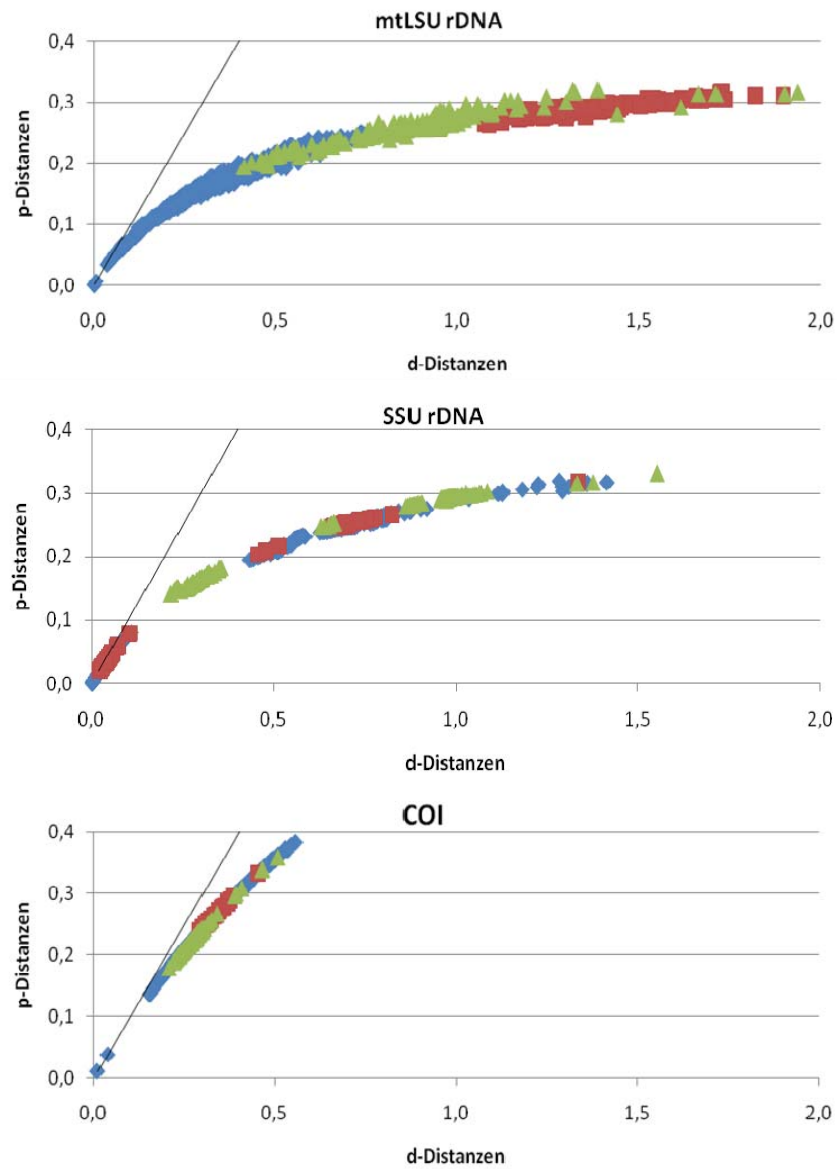


Abbildung 3.6: Substitutionsplots der SSU rDNA, mtLSU rDNA und COI Datensätze.

Die diagonale Linie zeigt den theoretischen Verlauf ohne Substitutionssättigung. **Blau**: Innengruppe ohne *Embletonia*, **rot**: *Embletonia* gegen Innengruppe, **grün**: Außengruppe gegen Innengruppe.

Sequenzdivergenzen

Die in den Abbildungen 3.1.-3.3. dargestellten Baumtopologien lassen an bestimmten Stellen wichtige Fragen offen. Einige der morphologisch sehr gut begründeten Taxa werden in diesen molekularen Analysen entweder gar nicht oder nur mit geringer Unterstützung als gültiges Taxon dargestellt. Die Analyse der Sequenzdivergenzen bietet die Möglichkeit zu überprüfen, wie genetisch divergent die einzelnen Mitglieder eines Taxons sind. Eine hohe Sequenzdivergenz kann zu verrauschten oder zum Verlust von phylogenetischen Signalen führen. Die Berechnung der Sequenzdivergenz gibt Aufschluss über die Variabilität der untersuchten Gene innerhalb der in der phylogenetischen Rekonstruktion gefundenen Gruppierungen. Zum Vergleich werden die Divergenzen der aus der Morphologie bekannten Gruppierungen ebenfalls analysiert (Abb. 3.7).

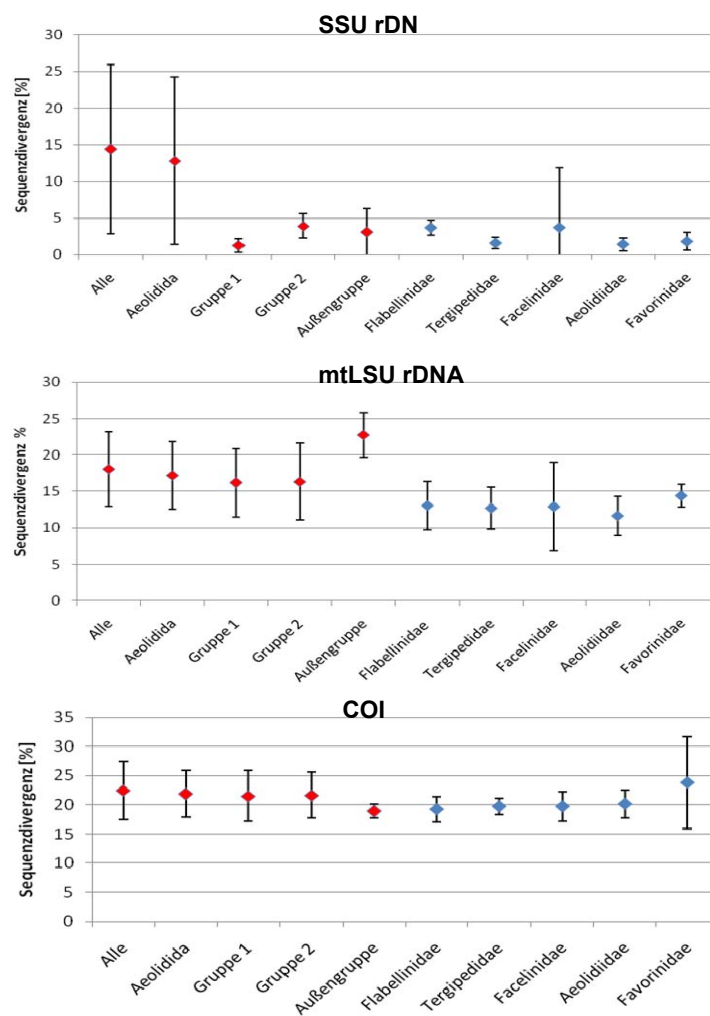


Abbildung 3.7: Sequenzdivergenzen der Aeolidida.

Vergleich der Gruppierungen aus der Multigen-Phylogenese (**rot**) und der aus der Morphologie bekannten Gruppen (**blau**). Rauten: Mittelwerte; Balken: Standardabweichung;

Alle: Aeolidida & Außengruppe. Gruppe 1 = Gruppe GA.

Die Sequenzen der Aeolidida weisen innerhalb der **SSU rDNA** sehr geringe Divergenzen auf. Beim Betrachten der aus der Morphologie bekannten Taxa zeigen die heterogenen Flabellinidae und die Facelinidae eine verhältnismäßig hohe Sequenzdivergenz, die der Tergipedidae, Aeolidiidae und Favorinidae ist mit unter 5 % sehr gering.

Die **mtLSU rDNA** Sequenzdivergenzen der in der phylogenetischen Rekonstruktion erhaltenen Gruppierungen liegen allesamt deutlich über 15 %, die der Außengruppe sogar über 20 %. Im Gegensatz zur SSU rDNA variieren die Einzelwerte jedoch gleichmäßig um den Mittelwert. Die morphologisch bekannten Gruppen zeigen niedrigere Divergenzen mit geringeren Abweichungen von den jeweiligen Mittelwerten. Eine Ausnahme bilden die Facelinidae, welche hier sehr heterogen erscheinen.

Die in der phylogenetischen Rekonstruktion erhaltenen Gruppierungen der Aeolidida zeigen bei Analyse der **Cytochromoxidase I** Sequenzdivergenzen von über 20 %, die der Außengruppe liegen in diesem Fall allerdings darunter. Die aus der Morphologie bekannten Gruppen zeigen niedrigere Divergenzen mit geringeren Abweichungen von den jeweiligen Mittelwerten. Eine Ausnahme bilden die Favorinidae, welche hier am heterogensten sind. Der Vergleich von *Cratena peregrina* mit dem anderen Favorinidae führt zu den hohen Sequenzdivergenzen.

Auch hierbei wird ersichtlich, dass die verwendeten Gene und Datensätze sich als sehr homogen darstellen, obwohl hier Analysen für alte Aufspaltungsereignisse betrachtet werden. Sowohl die für hohe Sättigungswerte als auch für hohe Sequenzdivergenzen bekannte SSU rDNA zeigt nur eine geringe Abweichung. Mit einer Divergenz von unter 15 % liegen die gefundenen Werte deutlich unter den Divergenzen der mtLSU rDNA (15-20 %) sowie der COI (< 20 %).

„relative-rate Test“ der Evolutionsgeschwindigkeit

Durch bekannte Sequenzen und die Ermittlung der dazugehörigen Phylogenie ist es möglich, die Evolutionsgeschwindigkeit über die Substitutionsraten zwischen einem gemeinsamen Vorfahren und Gruppierungen innerhalb der Phylogenie zu ermitteln.

Um die evolutionären Raten der größeren Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde ein two-cluster relative rate Test verwendet (Takezaki et al. 1995). Es werden die in allen Stammbaumrekonstruktionen (Abb. 3.1-3.3) identifizierten Gruppen GA und die paraphyletischen Arten der Gruppe 2 mit der Außengruppe verglichen, um festzustellen, ob besonders die nicht aufgelösten Taxa mit unterschiedlichen Raten evolvieren.

Tabelle 3.6: Relative-Rate der Evolutionsgeschwindigkeit. Z: Evolutionsrate.

	Gruppe GA	Gruppe 2	GA - 2	Z	
SSU rDNA	0,1900	0,0577	0,1323	11,6325	signifikant
mtLSU rDNA	0,0893	0,0972	-0,0079	1,1195	nicht signifikant
COI	0,1146	0,1105	0,0041	0,9921	nicht signifikant

Die SSU rDNA Sequenzen der Aeolidida aus Gruppe GA evolvieren signifikant schneller als die aus Gruppe 2. Für die Sequenzen der mtLSU rDNA und der COI sind nur geringfügige Unterschiede in den Evolutionsraten messbar, diese sind nicht signifikant unterschiedlich. Es wäre also möglich, dass in Gruppe GA eine schnelle Radiation erfolgte, die anschließend eine homogene Gruppe hervorgebracht hat.

Expansionssegmente in der SSU rDNA

Betrachtet man ein Alignment, das alle Sequenzen der SSU rDNA in voller Länge enthält, so fällt auf, dass die Sequenzlänge zum Teil stark differiert. In der folgenden Untersuchung wurden daher die gesamten SSU rDNA-Sequenzen verwendet und nicht die des für die phylogenetische Analyse reduzierten Alignment. Der Sequenzanfang und das -ende² wurden aus der Analyse heraus genommen, da diese Bereiche nicht von allen Tieren vorhanden waren. Alle anderen Positionen sind in der Längenanalyse enthalten, auch die nicht homologisierbaren Bereiche, welche aus der phylogenetischen Analyse ausgeschlossen wurden. Die betroffenen Positionen können der Sekundärstruktur entnommen werden. Die gelöschten Anteile sind nicht längenvariabel, es gehen keine Längeninformationen verloren. Bei einem Vergleich der Sequenzen mit der SSU rDNA-Sekundärstruktur von *Cuthona sibogae* konnten Expansionssegmente identifiziert werden, die in den jeweils identifizierten Gruppen vergleichbare Längen aufweisen (Tab. 3.5). Neben der Gesamtlänge wurden besonders die variablen Regionen V4 und V7 untersucht.

² (ausgeschlossene Positionen 1-45; 3236-3273)

Tabelle 3.7: Längenexpansion der SSU rDNA. Angegeben ist neben der Gesamtlänge die Länge der variablen Regionen V4 und V7. Die jeweils kürzeste Sequenz ist **rot**, die jeweils längste Sequenz ist **blau** markiert.

* unvollständige Sequenz; ¹ nicht in der Multigenanalyse enthalten; ² von den weiteren SSU rDNA Analysen ausgeschlossen, in der Multigenanalyse enthalten.

Taxon	Länge	Länge V4	Länge V7
Aeolidiidae			
<i>Aeolidia papillosa serotina</i>	1983	362	141
<i>Aeolidia papillosa</i>	1317*		141
<i>Aeolidiella stephanieae</i> ²	394*		
<i>Baeolidia nodosa</i>	2021	393	135
<i>Berghia verrucicornis</i>	1983	364	141
<i>Cerberilla affinis</i>	2017	386	146
<i>Spurilla australis</i> 208	1986	366	140
<i>Spurilla australis</i> 211	1986	366	140
<i>Spurilla neapolitana</i>	2051	416	151
Embletoniidae, Notaeolidiidae, Glaucidae			
<i>Embletonia</i> sp.	1884	257	116
<i>Embletonia pulchra</i>	1890	257	122
<i>Glaucus atlanticus</i>	2042	409	129
<i>Notaeolidia depressa</i>	1896	257	134
Eubranchidae			
<i>Eubranchus exiguus</i>	1872	256	113
<i>Eubranchus</i> sp.	1875	258	113
Facelinidae			
<i>Caloria elegans</i> (IT, Giglio) ²	1068*		205
<i>Caloria elegans</i> (IT, Elba)	2087	455	141
<i>Facelina bostoniensis</i>	1977	364	141
<i>Facelina drummondii</i> ¹	1977	363	141
<i>Facelina rubrovittata</i> ²	628*		
<i>Facelinopsis marioni</i>	1913	280	140
<i>Phidiana indica</i>	2087	454	145
<i>Phidiana lynceus</i>	2007	381	146
<i>Phyllodesmium briareum</i>	1984	363	143
<i>Phyllodesmium colemani</i>	1984	363	143
<i>Phyllodesmium crypticum</i>	1986	363	144
<i>Phyllodesmium jakobsenae</i>	1951*	363	143
<i>Phyllodesmium koehleri</i>	1366*		143
<i>Phyllodesmium lizardensis</i> (AU, LIRS) ²	760*		143
<i>Phyllodesmium lizardensis</i>	1986	363	143
<i>Phyllodesmium longicirrum</i>	1984	363	143
<i>Phyllodesmium macphersonae</i>	1361*		142
<i>Phyllodesmium magnum</i>	1982	363	143
<i>Phyllodesmium poindimiei</i>	1984	363	143
<i>Phyllodesmium rudmani</i>	1367*		143
Favorinidae			

Taxon	Länge	Länge V4	Länge V7
<i>Cratena lineata</i> ²	754*		141
<i>Cratena peregrina</i>	1998	368	149
<i>Favorinus branchialis</i>	2051	418	149
<i>Favorinus sp.</i>	2082	449	149
<i>Favorinus tsuruganus</i>	2069	435	148
<i>Godiva banyulensis</i>	2042	416	146
<i>Nanuca sebastiani</i>	1978	369	147
<i>Pteraeolidia ianthina</i> (AU, Botany Bay)	1977	363	142
<i>Pteraeolidia ianthina</i> (INO, Sulawesi) ¹	759*		142
Flabellinidae			
<i>Calmella cavolini</i> 63	2030	359	135
<i>Calmella cavolini</i> 85 ¹	2031	355	140
<i>Flabellina affinis</i>	2014	348	140
<i>Flabellina babai</i>	1865	358	103
<i>Flabellina bicolor</i> ¹	1861	256	103
<i>Flabellina exoptata</i>	1390*		134
<i>Flabellina falklandica</i>	1966	364	141
<i>Flabellina ischitana</i>	1163*		135
<i>Flabellina pedata</i>	1865	258	112
<i>Flabellina rubrolineata</i> ²	758*		129
<i>Flabellina sp.</i>	1934	303	121
<i>Flabellina verrucosa</i>	1903	282	119
Tergipedidae			
<i>Cuthona caerulea</i>	1884	259	119
<i>Cuthona foliata</i>	1362*		114
<i>Cuthona nana</i>	1876	258	112
<i>Cuthona sibogae</i> 28	1875	257	112
<i>Phestilla lugubris</i> ²	722*		112
<i>Phestilla melanobranchia</i>	1533*	258	112
<i>Tergipes antarcticus</i>	1212*		112
<i>Tergipes tergipes</i>	1883	262	112
Außengruppe			
<i>Bathydoris clavigera</i>	2002	242	247
<i>Chromodoris krohni</i>	1821	235	98
<i>Hypselodoris villafranca</i>	1827	240	97

Es fällt auf, dass die Aeolidida nahezu konsequent eine längere Gesamt-SSU rDNA als die untersuchten Außengruppentaxa besitzen. *Bathydoris clavigera* stellt bei den untersuchten Außengruppentaxa einen Sonderfall mit einer außergewöhnlich langen V7 Region dar. Auch innerhalb der Aeolidida sind Unterschiede zwischen den Sequenzlängen zu erkennen. Auf niedriger taxonomischer Ebene zeichnen sich die **Eubranchiidae**, **Embletoniidae** **Tergipedidae** und **Notaeolidiidae** durch kurze, wenig divergente Sequenzen aus. Die kürzesten Sequenzen sind bei den **Flabellinidae** und den **Tergipedidae** zu finden. Diese

haben neben einer kurzen V4 Region auch eine sehr kurze V7 Region. In dieser Gruppe bilden das Genus *Calmella* sowie *Flabellina affinis* mit verhältnismäßig langen Sequenzen einen Sonderfall.

Die **Aeolidiidae** besitzen lange Sequenzen. Bei den **Facelinidae** zeichnet sich die Gattung *Phyllodesmium* durch sehr homogene Sequenzlängen aus (Gesamtlänge: 1982 – 1986; V4: 363, V7: 143-144). Die Länge der V7 ist bei den untersuchten *Phyllodesmium* Taxa konstant. Das Taxon *Facelinopsis marioni* wird zu den Facelinidae gezählt, hat aber eine sehr kurze V4 Region (280 bp) im Vergleich zu den anderen Facelinidae. In der phylogenetischen Rekonstruktion gruppiert *Facelinopsis* mit den beiden *Eubranchus* Taxa. Diese haben ähnlich lange V4 Regionen. *Glaucus atlanticus* als Vertreter der **Glaucidae** besitzt lange Sequenzen.

Die drei untersuchten Genabschnitte (Gesamtlänge, V4, V7) sind bei den Taxa der monophyletischen Gruppierung (Gruppe GA) signifikant länger als bei den restlichen Aeolidida (Gruppe 2) sowie bei der Außengruppe (Abb. 3.8). Weitergehend zeigte die Außengruppe (grün) kürzere Sequenzen. *Bathydoris clavigera* ist nicht in der Längenanalyse enthalten. Ihre V7 Region ist 247 bp lang, was auf ein Intron hindeuten könnte. Durch zusätzliche Analysen weiterer Außengruppentaxa konnte gezeigt werden, dass die Länge von *Bathydoris clavigera* ungewöhnlich hoch ist und zu verzerrten Ergebnissen der Sequenzlängen führen würde. Daher fließen nur *Hypselodoris villafranca* (97 bp) und *Chromodoris krohni* (98 bp) als Außengruppe in die folgende Analyse ein.

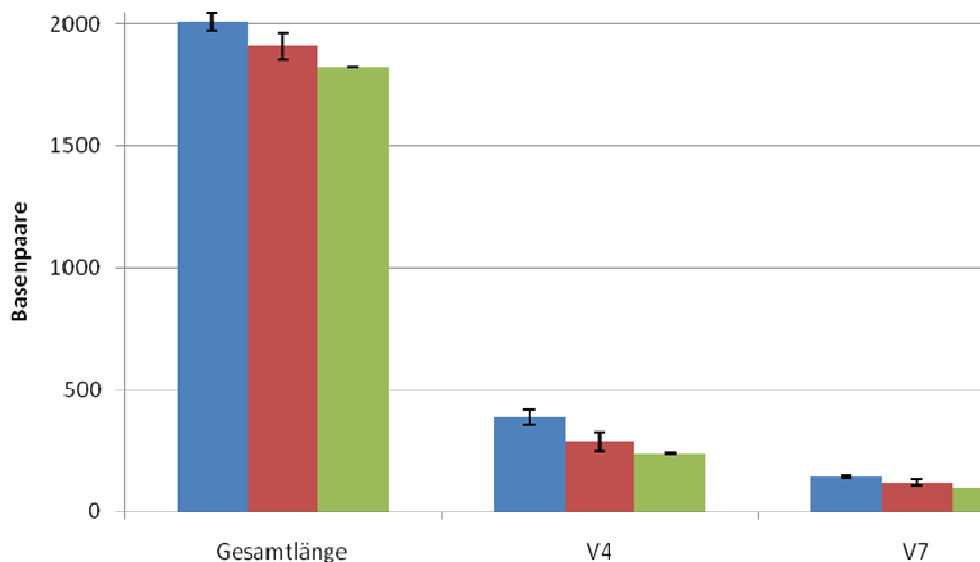


Abbildung 3.8: Vergleich SSU rDNA Sequenzlängen der phylogenetischen Gruppierungen.

Blau: Gruppe GA (Aeolidiidae, Facelinidae, Favorinidae, Glaucidae); **Rot:** Gruppe 2 (Flabellinidae, Tergipedidae, Eubranchidae, Embletoniidae, Notaeolidiidae) **Grün:** Außengruppe. Säule: mittlere Sequenzlängen; Balken: Standardabweichung.

Die Informationen aus den Regionen V4 und V7 sind nur partiell in die phylogenetische Analyse eingeflossen. Durch eine gesonderte Analyse, in der ausschließlich die Sequenzlängen miteinander verglichen wurden, hat sich gezeigt, dass die Sequenzlänge zur Begründung gewisser Taxa oder deren Nichtauflösung nutzbar ist. Abbildung 3.9 zeigt die Sequenzlängen im Bezug auf die rekonstruierte Phylogenese. Innerhalb der Aeolidida ist eine Tendenz zur Verlängerung der SSU rDNA Sequenzen zu beobachten. Während die Außengruppe im Verhältnis zur Innengruppe relativ kurze Sequenzen hat, allerdings sind diese für die meisten Eukaryoten normal lang (Busse & Preisfeld 2002), sind die der Embletoniidae, Eubbranchidae Tergipedidae und Notaeolidiidae länger. Zusammen mit den Flabellinidae, welche längere bis viel längere Sequenzen haben, besetzen sie "basale" Positionen innerhalb der Aeolididae. Die auf einem entfernten Ast stehende und als abgeleitet geltende GA-Gruppe zeichnet sich durch deutlich längere Sequenzen aus. Es kann also eine evolutiv bedingte Verlängerung der SSU rDNA Sequenzen beobachtet werden.

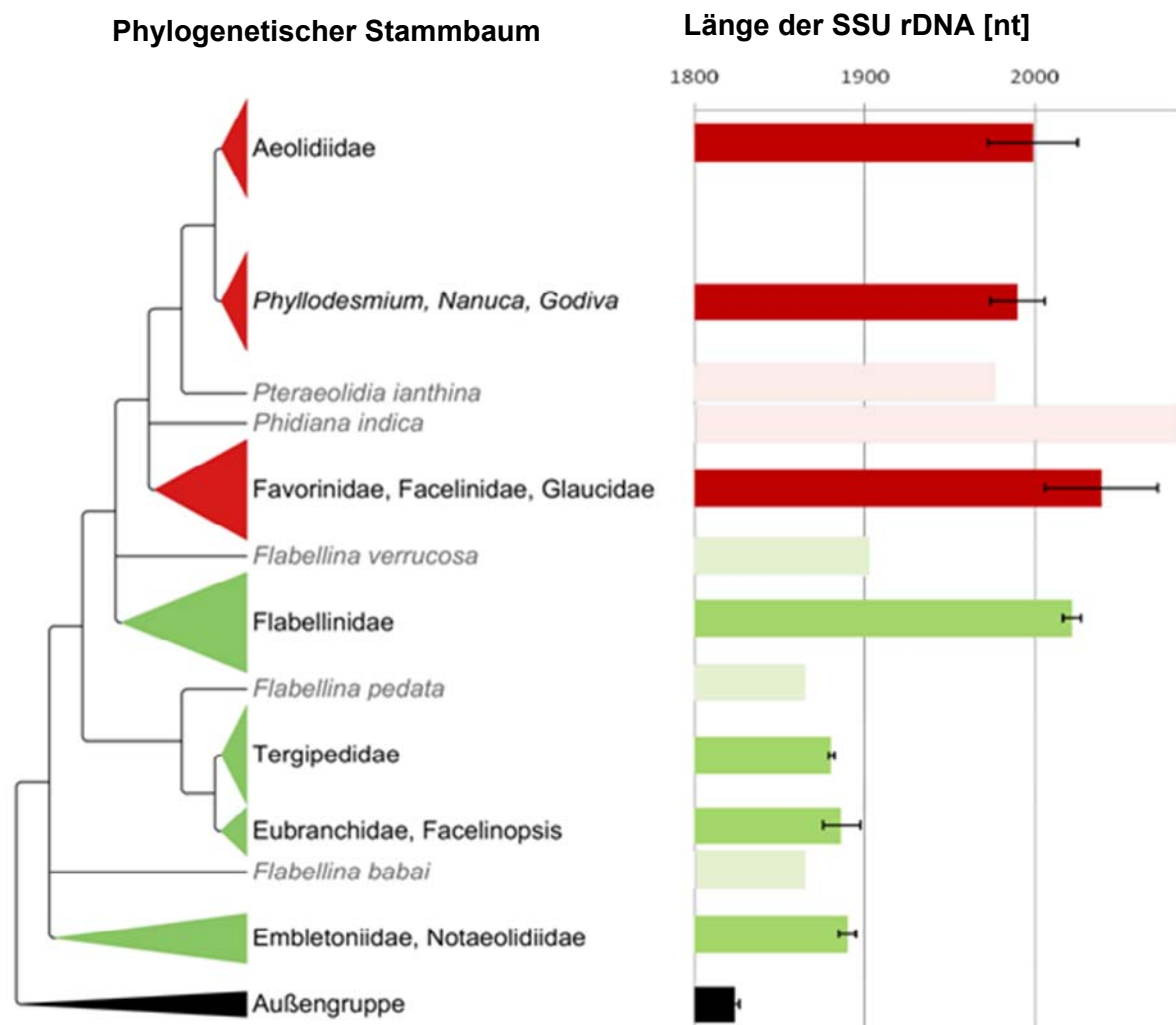


Abbildung 3.9: Längenexpansion der SSU rDNA auf der Grundlage der rekonstruierten Taxa auf der Basis der SSU rDNA. Stammbaum schematisiert nach MrBayes-Analyse.

Balken: Standardabweichung.

Struktur der variablen Region 7

Um die Ergebnisse der Sequenzlängenanalyse auf der Ebene der Sekundärstruktur zu analysieren, wurde die Sekundärstruktur der variablen Region 7 mittels dem Programm mfold rekonstruiert. Dabei wurden die Strukturen für den Aeolidida-Datensatz sowie für die Außengruppentaxa erstellt, miteinander verglichen und auf gemeinsame oder verschiedene evolutive Zusammenhänge überprüft. Das dazu verwendete Kladogramm (Abb. 3.10) der Aeolidida basiert auf den Bayesianischen-Analysen. Neben den Abzweigungen des Stammbaumes sind die identifizierten Sekundärstrukturen mit ihren strukturelevanten evolutiven Veränderungen dargestellt.

Die Strukturen der Außengruppentaxa besitzen im Anfangsbereich der Region zwei in direkter Nachbarschaft liegende kleine Loops, d. h. nicht Doppelhelix-bildende Bereiche. Bei allen nahe an der Außengruppe stehenden Aeolidida, die in mehrere Paraphyla aufgetrennt sind, hat sich die zweite Helix durch Insertion mehrerer Basen vergrößert. Da dieses Merkmal in allen der in Gruppe 2 vorhandenen paraphyletischen Gruppierungen nachweisbar ist, muss es bereits in der Stammlinie der Aeolidida entstanden sein.

Alle Aeolidida der Gruppe GA haben an genau dieser Stelle einen größeren Loop sowie einen neuen Stem mit anschließendem Loop entwickelt, den kleinen Loop davor jedoch reduziert. Dieses Merkmal ist ebenfalls bei allen Vertretern dieses gut gestützten Monophylums zu beobachten und weist wiederum auf eine Entwicklung in der Stammlinie der Gruppe GA hin.

Man kann also innerhalb der Aeolidida Sekundärstrukturmerkmale auf zwei Ebenen finden: Zum einen in den zur Rekonstruktion der Phylogenese führenden homologisierbaren Sequenzen, zum anderen ist ebenfalls der gleiche evolutionäre Trend außerhalb der homologisierbaren Sequenzen in den hochvariablen Bereichen des Gens zu finden.

partielle V7 Region SSU rRNA

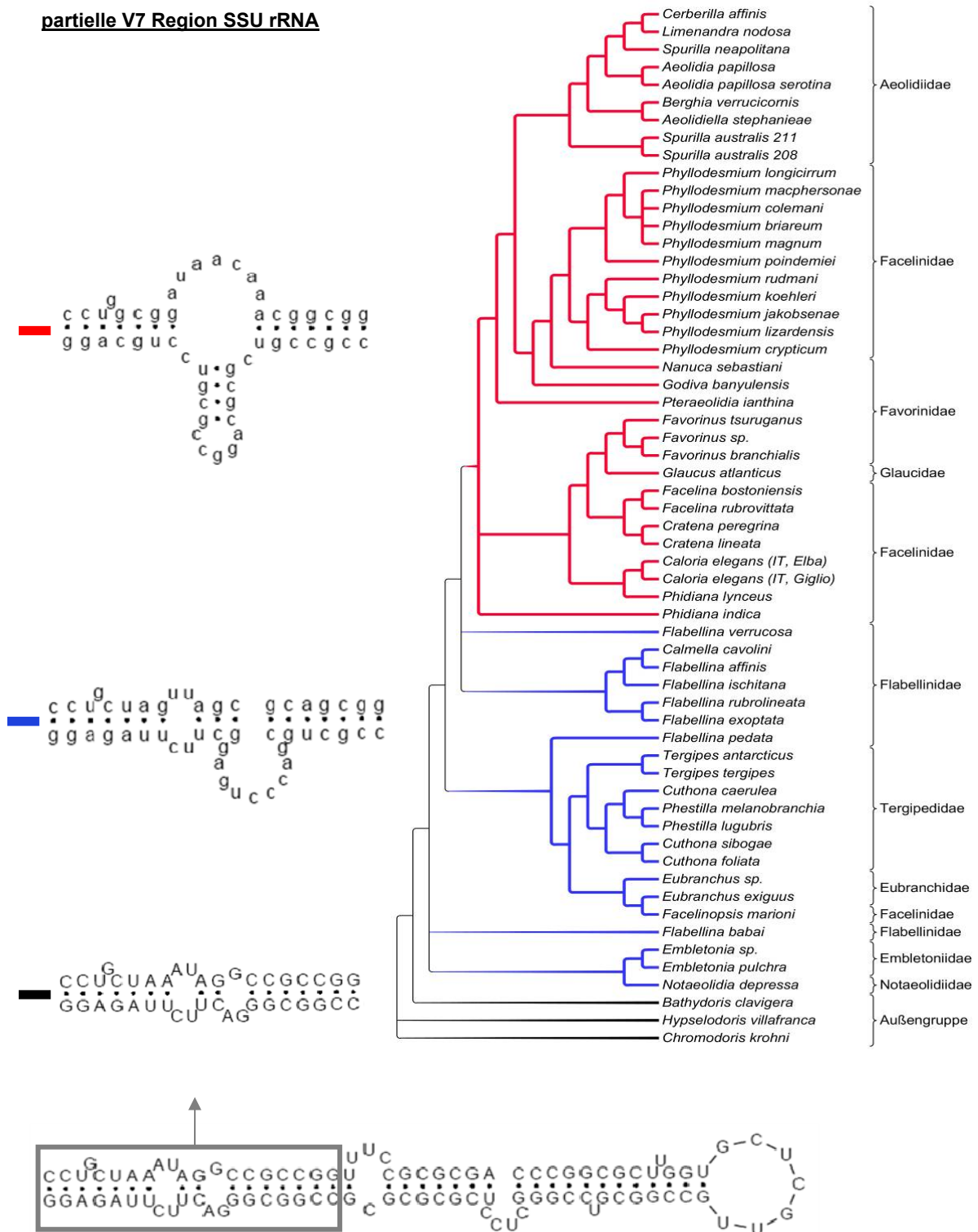


Abbildung 3.10: Evolution des partiellen V7 Bereichs der SSU rRNA innerhalb der Aeolidida.

Links: Sekundärstruktur, rechts: Kladogramm der Aeolidida nach MrBayes-Analyse. Sekundärstruktur ganz unten: *Hypselodoris villafranca*.

3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rekonstruktion der Phylogenie der Aeolidida

- Mit allen Rekonstruktionsverfahren wird eine klare Trennung der Aeolidida von der Außengruppe erreicht, womit die Aeolidida als gut unterstütztes Monophylum betrachtet werden.
- Innerhalb der Aeolidida führen alle Rekonstruktionsmethoden zu einem großen, gut gestützten Monophylum (Gruppe GA), welches die auch morphologisch gut definierten Aeolidiidae, Facelinidae, Favorinidae und Glaucidae einschließt.
- Die anderen Aeolidida erscheinen in der paraphyletischen Gruppe 2.
- Innerhalb der Aeolidida können folgende Familien monophyletisch dargestellt werden:
 - Aeolidiidae
 - Tergipedidae
- Innerhalb der ansonsten paraphyletischen Facelinidae ist die Gattung *Phyllodesmium* mit hoher Unterstützung monophyletisch.
- Weitere Facelinidae sowie die Favorinidae und Flabellinidae sind paraphyletisch dargestellt.
- Die Sequenzdivergenzen der COI und mtLSU rDNA konnten als sehr hoch identifiziert werden, wohingegen die Sequenzen der SSU rDNA nur gering divergieren. Bei Betrachtung auf Familienebene, besonders der monophyletischen, konnte für alle drei Gene eine starke Abnahme der Sequenzdivergenzen beobachtet werden.
- Die SSU rDNA-Sequenzen der Gruppe GA zeigen eine deutlich höhere Evolutionsgeschwindigkeit als die restlichen Aeolidida.
- Der GC Gehalt in der SSU rDNA der Aeolidida ist deutlich höher als in der Außengruppe.
- Ein Trend zur evolutionären Verlängerung der SSU rDNA Sequenzen innerhalb der Aeolidida ist nachweisbar.
- Innerhalb der Aeolidida können Veränderungen in der Sekundärstruktur der variablen Region 7 festgestellt werden: Während man in der Außengruppe eine typische Struktur der variablen Region 7 (V7) identifizieren kann, hat sich im Paraphylum Gruppe 2 bei allen Taxa ein etwas größerer Loop entwickelt. Im Monophylum Gruppe GA hat sich an dieser Position in der V7-Region ein neuer Stem mit Loop ausgebildet, der bei allen Taxa nachweisbar ist.

3.2 Rekonstruktion der Phylogenese des Genus *Phyllodesmium*

Da im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Gattung *Phyllodesmium* noch unter besonderer Beobachtung stehen wird, ist es von Interesse, die Evolution dieses Taxons näher zu betrachten.

3.2.1 Alinierung der Sequenzen

Die Analyse der Sequenzen des kombinierten Datensatzes ergibt für manche Spezies der Gattung *Phyllodesmium* keine unterstützte Auflösung. Die Vermutung ist, dass die bei der Homologisierung der Sequenzen ausgeschlossenen molekularen Merkmale zu einer Verringerung des phylogenetischen Signales führen, so dass keine eindeutigen Splits erkannt werden. Aus diesem Grund wird ein neues Alignment aus den drei Genen SSU rDNA, mtLSU rDNA, und COI erstellt, in dem nur die Gattung *Phyllodesmium* und zwei Außengruppenvertreter enthalten sind. Der Vorteil bei diesem neuen Datensatz liegt darin, dass nun die kompletten Sequenzen der Taxa homologisierbar sind und somit alle phylogenetischen Informationen einfließen können. Basierend auf den Ergebnissen zur Phylogenese der Aeolidida werden *Nanuca sebastiani* und *Godiva banyulensis* als Außengruppe gewählt. Es fließen nur solche Taxa mit kompletten Sequenzen in die Analyse ein. Aufgrund der kompletten Gene stehen nun deutlich mehr parsimonie-informative Merkmale zur Verfügung (Tab. 3.8).

Tabelle 3.8: Parsimonie-Merkmale des Datensatzes zur Rekonstruktion der Phylogenese von *Phyllodesmium*.

Gen	Positionen	Taxa	Merkmale [bp]		
			konstant	uninformativ	informativ
SSU rDNA	1-2017	12	1891	105	21
mtLSU rDNA	018-2417	12	301	49	50
COI	2418-3036	9	389	60	170

3.2.2 Stammbaumrekonstruktion des Genus *Phyllodesmium*

Durch die zusätzlich eingeflossenen Informationen aus den hochvariablen Bereichen können die evolutionären Schritte im Genus *Phyllodesmium* besser dargestellt werden. Die Monophylie der Gattung ist nach allen Analyseverfahren mit den höchsten Werten unterstützt (Abb. 3.11).

Phyllodesmium poindimiei steht an der Basis der Gattung, die anderen Taxa spalten sich in zwei Gruppen mit geringer Unterstützung für diesen Split auf. Die beiden folgenden Schwestertaxa sind allerdings molekular gut gestützt. Die eine Gruppe enthält ein gut

gestütztes Monophylum mit *Phyllodesmium jakobsenae* und *Phyllodesmium lizardensis*. Die Positionen der anderen Taxa dieser Gruppe (*Phyllodesmium rudmani*, *Phyllodesmium koehleri* und *Phyllodesmium crypticum*) sind aufgelöst, aber nicht durch hohe Bootstrapwerte gestützt. Die zweite Gruppe beinhaltet *Phyllodesmium briareum* als basales Taxon und *Phyllodesmium colemani* mit *Phyllodesmium magnum* sowie *Phyllodesmium longicirrum* und *Phyllodesmium macphersonae* als abgeleitete Taxa.

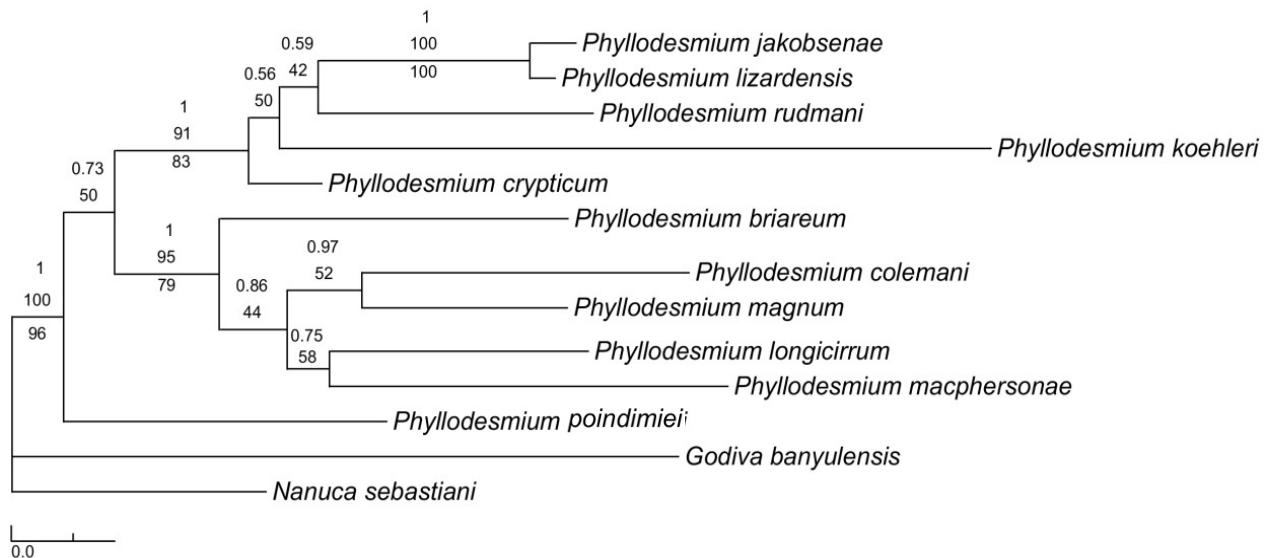


Abbildung 3.11: Maximum-Likelihood-Phylogramm erstellt anhand des kombinierten *Phyllodesmium* Datensatzes. Der Baum wurde auf Grundlage des GTR Evolutionsmodells (Tavaré 1986) ermittelt.

Ln Likelihood = -9202.070325 1000 Bootstraps-Replikate.

Die posterior probabilities der Bayesianische-Analyse (50 % majority rule Konsensusbaum) und die Maximum-Likelihood-Bootstrapwerte befinden sich oberhalb, die der Maximum-Parsimonie-Analyse unterhalb der Äste.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Alinierung der kompletten Sequenzen der SSU rDNA und die nachfolgenden Rekonstruktionsanalysen zu einer besseren Auflösung des Genus *Phyllodesmium* führt, wenn auch nicht alle Aufspaltungereignisse mit hoher Unterstützung belegt sind.

3.2.3 Nahrungsanalysen von *Phyllodesmium*

Nachdem die Phylogenie der Aeolidida rekonstruiert werden konnte und dabei wichtige Taxa identifiziert wurden, wird nun das Nahrungsverhalten näher analysiert. Ziel ist zu überprüfen, ob Korrelationen zwischen der aufgenommenen Nahrung (Koralle) und der phylogenetischen Position der Meeresnacktschnecke zu ermitteln sind.

Die Meeresnacktschnecken der Gattung *Phyllodesmium* sind Nahrungsspezialisten. Häufig ernähren sie sich von einem einzigen Futterorganismus, d.h. einer Korallenart. Viele *Phyllodesmium*-Arten sind in der Lage, die mit der Nahrung aufgenommenen photosynthetisch aktiven Symbionten (Dinoflagellaten der Gattung *Symbiodinium*) der Futterorganismen dauerhaft zu kultivieren. Sie übernehmen sozusagen den Symbiosepartner ihres Futterorganismus. *Symbiodinium* aus der Koralle befindet sich dann in der Schnecke.

Um den Zusammenhang zwischen Futterorganismus – Symbiont – Schnecke ermitteln zu können, werden Informationen zu den Futterorganismen der Schneckenarten, den Symbionten in den Schnecken und den Symbionten in den Futterorganismen gemeinsam untersucht. Zu Beginn werden die Ergebnisse der experimentellen Nahrungsanalysen von *Phyllodesmium*, deren System *in vivo* im Labor etabliert werden konnte und später unter 3.3.1 detailliert beschrieben wird, vorgestellt. Im Anschluss wird es noch einen Exkurs zu weiteren beobachteten Taxa anderer Nudibranchia geben.

Phyllodesmium briareum ernährt sich hauptsächlich von Korallen der Gattung *Briareum* (Anthozoa, Octocorallia, Alcyonacea). Den Versuchstieren, die im Laboraquarium gehalten werden, wurden verschiedene Spezies der Gattung *Briareum* angeboten, um Nahrungspräferenzen ermitteln zu können. Es konnte beobachtet werden, dass bei gleichzeitiger Präsentation von *Briareum asbestinum* (Abb. 3.12 A) und *Briareum violacea* (Abb. 3.12.B) die Spezies *Briareum asbestinum* in allen untersuchten Fällen bevorzugt wird. Ein weiterer Versuch mit *Erythropodium* sp. als Futterkoralle (Abb. 3.12 C) zeigte hingegen, dass diese nur nach einer längeren Hungerphase (> 5 Tage) angenommen.



Abbildung 3.12: Futterorganismen von *Phyllodesmium briareum*. A: *Briareum violacea*; B: *Briareum asbestinum*; C: *Erythropodium* sp..

Von ***Phyllodesmium kabiranum*** konnten keine Daten aus Lebendbeobachtungen gewonnen werden. Hier war es jedoch möglich, ein Fragment der SSU rDNA der Nahrung aus der Mitteldarmdrüse der Schnecke zu gewinnen. Dieses Fragment konnte mittels Sequenzvergleich der Gattung *Xenia* zugeordnet werden.

Mehrere Tiere von ***Phyllodesmium hyalinum*** konnten in ihrem natürlichen Biotop (Dahab, EG) auf *Heteroxenia* beobachtet werden. Die Schnecken scheinen sich direkt in das Innere der *Heteroxenia* Kolonien hinein zu fressen, d. h. sie fressen offensichtlich nicht nur die Polypen, sondern auch basale Teile der Koralle.

Weitere Daten wurden der Literatur entnommen, um sie auf den schematischen Stammbaum übertragen zu können (Abb. 3.13).

Von *Phyllodesmium kabiranum* und *Phyllodesmium hyalinum* sind nicht genügend Sequenzinformationen für die kombinierte Sequenzanalyse vorhanden. Daher sind sie in der folgenden Darstellung der Ergebnisse nicht aufgeführt. Für die Erstellung eines Gesamtbildes der Gattung *Phyllodesmium* werden sie im Anschluss mit den gesammelten Informationen besprochen.

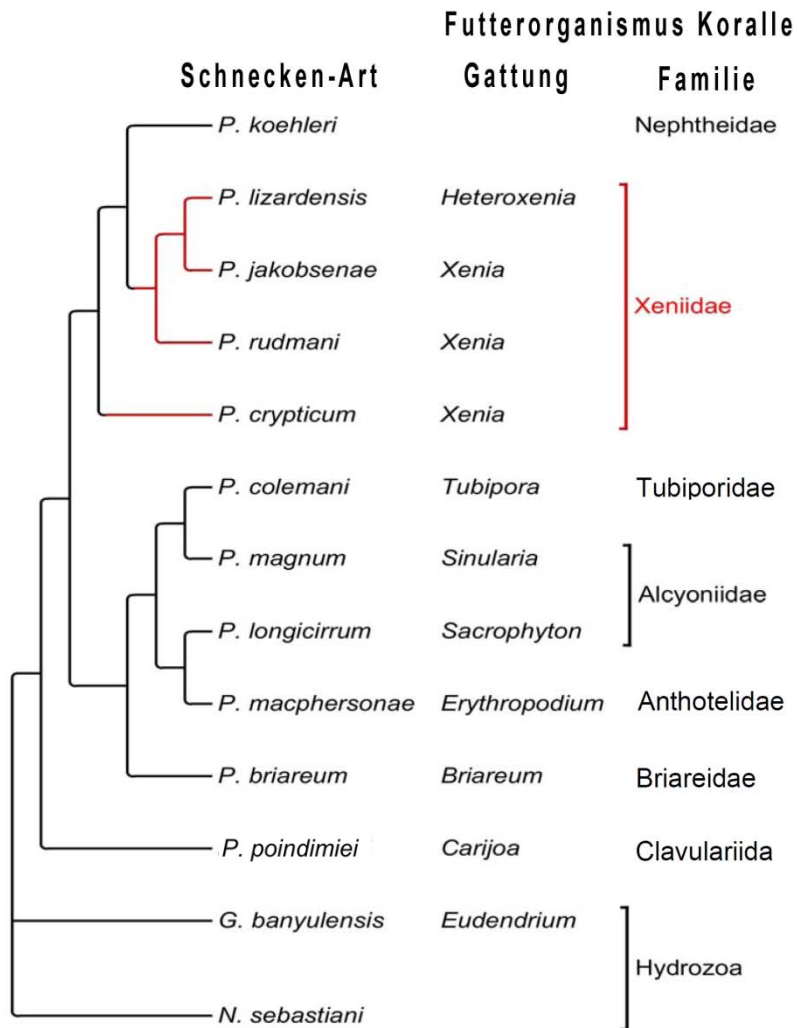


Abbildung 3.13: Nahrungsanalysen des Genus *Phyllodesmium*. Neben dem schematisierten Stammbaum sind die jeweiligen Futterorganismen (Gattung und Familie) zu finden.

Die Futterorganismen der Gattung *Phyllodesmium* unterscheiden sich grundlegend von denen der Außengruppe. Die beiden Außengruppentaxa ernähren sich von nicht zooxanthellaten Hydrozoa (Rudman 2001; McDonald & Nybakken 2009). Tiere des Genus *Phyllodesmium* ernähren sich meistens von verschiedenen zooxanthellaten Weichkorallen (Alcyonacea, Octocorallia, Anthozoa). *Phyllodesmium hyalinum* (Rudman 1981; Gosliner 1987) *Phyllodesmium lizardensis* (Burghardt et al. 2005), *Phyllodesmium jakobsenae* (Burghardt & Wägele 2004), *Phyllodesmium rudmani* (Burghardt & Gosliner 2006) und *Phyllodesmium crypticum* (Rudman 1981) ernähren sich ausschließlich von Korallen der Familie der Xeniidae. Zusammen mit *Phyllodesmium koehleri* (frisst keine Xeniidae, sondern Nephtheidae, z. B. Burghardt et al. 2005) bilden sie ein Monophylum.

Literaturangaben verifizieren die auf der vorherigen Seite schon dargestellten Ergebnisse, wonach sich auch *Phyllodesmium kabiranum* und *Phyllodesmium hyalinum* von Xeniidae ernähren (z. B. Rudman 1991; Gosliner et al. 1996).

Die restlichen *Phyllodesmium* Taxa ernähren sich von verschiedenen Alcyonacea (Wägele et al. 2010). *Phyllodesmium briareum* ernährt sich von *Briareum* (Rudman 1991), *Phyllodesmium colemani* von *Tubipora* (Rudman 1991), *Phyllodesmium longicirrum* von *Sarcophyton* (Rudman 1991), *Phyllodesmium macphersonae* von *Erythropodium* (Rudman 2001a), *Phyllodesmium magnum* von *Sinularia* (Wells & Bryce 1993) und *Phyllodesmium poindimiei* von *Carijoa* (Rudman 1981; 2001b).

Zusammenfassend zeigt sich eine monophyletische Gruppe verschiedener *Phyllodesmium* Arten, die sich größtenteils auf die Xenidiidae als Futterorganismus spezialisiert haben.

3.2.4 Zusammenhang zwischen Nahrungsaufnahme und Form der Cerata

Moore & Gosliner (2009) nutzen die Form der Cerata sowie die Fähigkeit zur Einlagerung von Symbionten als morphologische Merkmale für die Rekonstruktion der Phylogenese von *Phyllodesmium*. Die Merkmale wurden für die in dieser Arbeit molekular untersuchten Taxa des Genus *Phyllodesmium* ermittelt und auf die Phylogenie übertragen (Abb. 3.14).

Sowohl die Außengruppe als auch *Phyllodesmium poindimiei* sind nicht in der Lage, Symbionten einzulagern. Die restlichen *Phyllodesmium* Arten nehmen Symbionten auf und lagern sie ein. Im Hinblick auf die Form der Cerata lassen sich innerhalb der untersuchten Taxa zwei Gruppen unterscheiden: Die Außengruppe, *Phyllodesmium poindimiei*, sowie ein weiteres Monophylum aus fünf *Phyllodesmium* –Arten besitzen glatte Cerata.

Die Vertreter der Monophylums der Xenidiidae-fressenden Arten und *Phyllodesmium koehleri* besitzen „raue“ Cerata.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Form der Cerata, dem bevorzugten Futterorganismus und der Position im Stammbaum wird in der Diskussion ausführlich behandelt.

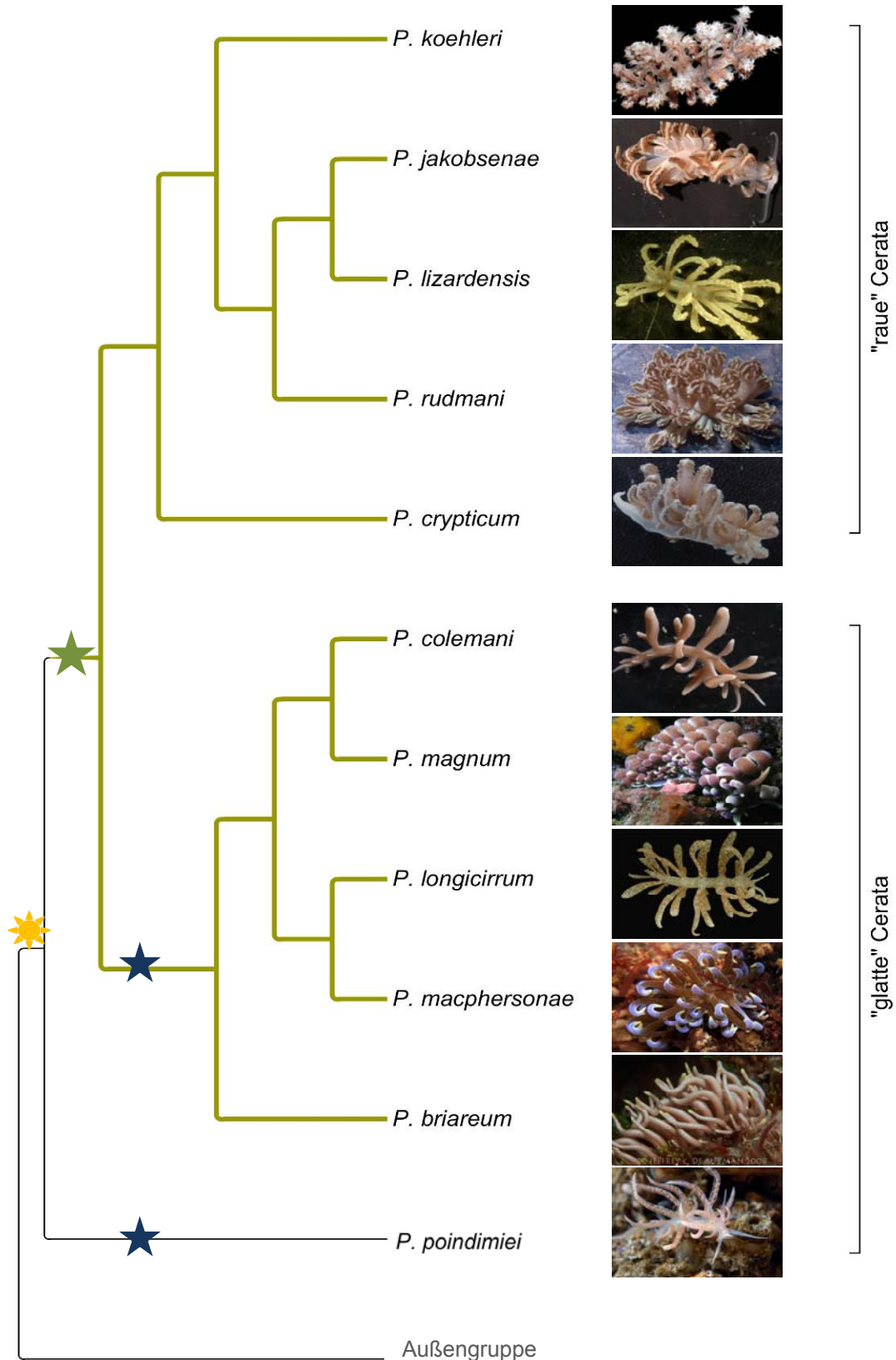


Abbildung 3.14: Kladogramm der Gattung *Phyllodesmium* erstellt anhand des kombinierten Datensatzes aus SSU rDNA, mtLSU rDNA und COI nach Bayesianischen Analysemethoden. Außengruppe: *Nanuca sebastiani* und *Godiva banyulensis*. Sonne: Aufspaltung in Taxa mit Symbionten und Taxa ohne Symbionten. Grüne Äste führen Zoonanthellen hälternden Taxa. blauer Stern: Cerataform glatt. Grüner Stern: Cerataform rau.

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Rekonstruktion der Phylogenie des Genus *Phyllodesmium*

- Die Gattung *Phyllodesmium* bildet ein gut gestütztes Monophylum.
- *Phyllodesmium poindimiei* ist ein basales Taxon und ebenso wie die Außengruppe nicht im Besitz von Symbionten.
- Die restlichen monophyletischen Taxa sind mit Symbionten vergesellschaftet und lassen sich in zwei Gruppen einteilen.
- *Phyllodesmium colemani*, *P. magnum*, *P. longicirrum*, *P. macphersonae* und *P. briareum* bilden ein Monophylum und besitzen „glatte“ Cerata. Sie ernähren sich von verschiedenen Weichkorallen, aber nicht von Xeniidae.
- *Phyllodesmium lizardensis*, *P. jakobsenae*, *P. rudmani*, *P. crypticum* und *P. koehleri* bilden ein Monophylum, besitzen alle „raue“ Cerata und ernähren sich mit Ausnahme von *P. koehleri* ausschließlich von Xeniidae. *Phyllodesmium kabiranum* und *P. hyalinum* sind nicht in der phylogenetischen Analyse enthalten. Sie besitzen aber mit "rauen" Cerata und Xeniidae als Nahrungsquelle Merkmale dieser Gruppe.

3.3 Symbiosesysteme

3.3.1 *Phyllodesmium briareum*

Bisher ist es nicht gelungen, die hier näher zu beschreibende Art *Phyllodesmium briareum* unter künstlichen Bedingungen im Aquarium zu halten. Daher werden hier als weiteres Ergebnis die Bedingungen für eine erfolgreiche Anzucht und Fortpflanzung dargestellt. Dabei wird auch auf die bisher nicht beschriebene ontogenetische Entwicklung der Tiere vom Ei über die Larve zum adulten Tier eingegangen.

3.3.1.1 Etablierung des Systems

Zu Beginn der Hälterung sollten Informationen über den Lebenszyklus von *Phyllodesmium briareum* unter Zuchtbedingungen erfasst und die Photosyntheseaktivität der eingelagerten Symbionten untersucht werden. Letzteres sollte vor dem Hintergrund geschehen, dass *Phyllodesmium briareum* durch die Symbiose mit *Symbiodinium* längerfristig ohne Nahrung überleben kann. Um Daten über den „Normalzustand“ der Symbionten sowie über *Phyllodesmium briareum* zu bekommen, wurde die photosynthetische Aktivität der Symbionten über eine das gesamte Adultstadium der Wirtstiere (*Phyllodesmium briareum*) umfassende Zeitspanne gemessen.

Die adulten Tiere legen ihre Eier immer in langen, spiralig aufgerollten Schläuchen (Gelege) an die Unterseite oder an die polypenlosen Stellen der Oberseite der Futterkorallen. Die Gelege haben einen Durchmesser zwischen 6 und 12 mm. Der Schlupf aus den Gelegen (Abb. 3.15 A-C) erfolgt in der Regel nach 10 - 15 Tagen. Die geschlüpften Tiere sind noch von einem dünnen Gehäuse geschützt. Dieses ist durch ein Operculum verschließbar. In den Gelegen und den frische geschlüpften Schnecken konnten keine Symbionten nachgewiesen werden.

Innerhalb der nächsten 1-3 Tage schlüpfen die juvenilen Schnecken aus dem Gehäuse (Abb. 3.15 D). Zu diesem Zeitpunkt sind sie ca. 1 mm groß, farblos und transparent. Sie besitzen noch keine Cerata, und es konnten noch keine eingelagerten Symbionten nachgewiesen werden. Die juvenilen Schnecken benötigen in diesem Stadium dauerhaft ihre Futterkoralle, ohne gehen sie nach kurzer Zeit (<12 h) ein.

Die Hälterung der Tiere erfolgte während des Juvenilstadiums zunächst in weiten Bechergläsern mit einem Durchmesser von 95 mm und einer Höhe von 50 mm (Wasserwechsel 3/ Woche), anschließend in Schwimmkästen direkt im Aquarium. Als Futterkoralle dienten verschiedene *Briareum*-Kolonien (*Briareum violacea*, *Briareum asbestinum*, Abb. 3.12 A - B).

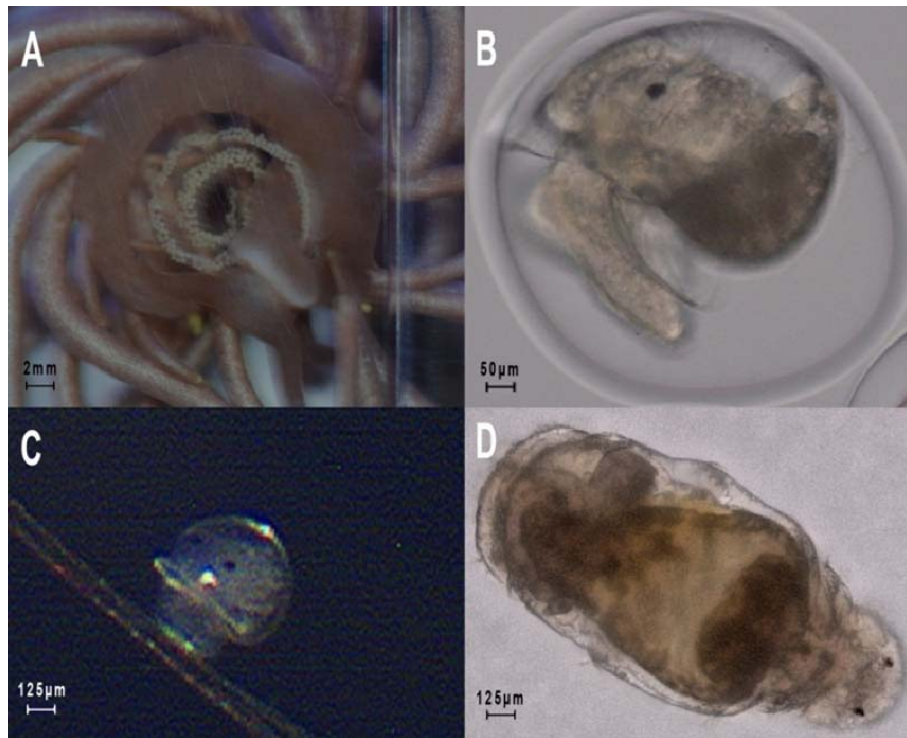


Abbildung 3.15: Entwicklungsstadien von *Phyllodesmium briareum*.

A: Adulttier (33 mm) bei der Eiablage; B: Entwicklung im Gelege; C: unmittelbar nach dem Schlupf aus dem Gelege; D: unmittelbar nach dem Schlupf aus dem Gehäuse.

Mit der Bildung der Cerata ab Tag 4-5 konnten die ersten Symbionten in den Schnecken nachgewiesen werden. In diesem Stadium sind die Tiere noch transparent, so können die Plastiden der Symbionten in den Schnecken mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden (Abb. 3.16). Nach Nahrungsaufnahme wird der Nahrungsbrei einschließlich Symbionten in die Cerata gepumpt und dann wieder zurück Richtung Mund. Diese Vor- und Rück-bewegung des Nahrungsbreies ist während des gesamten Juvenilstadiums bei der Nahrungs-aufnahme zu beobachten. Mit steigender Größe der Tiere wird eine zunehmende Verzweigung der Mitteldarmdrüse beobachtet, die in die Cerata hineinragt. Je verzweigter die Mitteldarmdrüse, desto mehr Symbionten können an den Endpunkten der Mitteldarmdrüse beobachtet werden (siehe Abb. 1.17). Durch die Primärfluoreszenz des Chlorophylls in den Symbionten kann eindeutig zwischen Nahrungsbrei und *Symbiodinium* unterschieden werden.

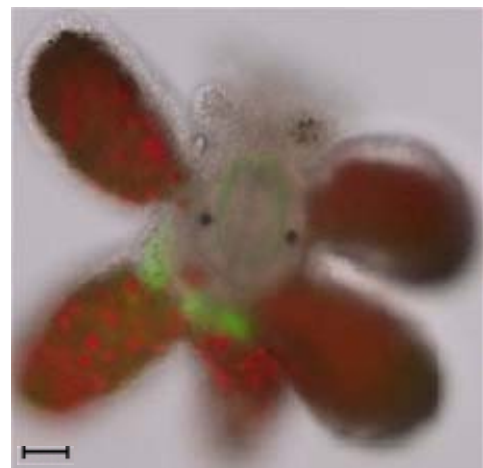


Abbildung 3.16: *Phyllodesmium briareum* juvenil. Darstellung der Primärfluoreszenz (rot) des Chlorophylls in den Plastiden von *Symbiodinium* nach Anregung mit einer Wellenlänge von 470 nm. Radula Apparat dunkelgrün. Pfeil: Ceras. Balken = 500 µm.

3.3.1.2 Photosynthetische Aktivität der Symbionten in *Phyllodesmium briareum*

Um die photosynthetische Aktivität (PS-Aktivität) von *Symbiodinium* in den heranwachsenden Schnecken überprüfen zu können, wurde diese nachfolgend während der gesamten Lebenszeit gemessen. Im Anschluss daran wurde die Quantenausbeute unter dem Einfluss verschiedener Lichtstärken mit und ohne Futter ermittelt.

a. Hälterung unter normalen Bedingungen über den gesamten Lebenszyklus der Schnecken

Die beiden untersuchten Tiere waren zu Beginn der PAM-Fluorometrie (Pulse-Amplitude-Modulated Fluorometrie) sechs Wochen alt (Abb. 3.17). Versuche, früher im Juvenilstadium mit der Messung zu beginnen, scheiterten an der mangelnden Größe der Tiere, so dass der Lichtimpuls nicht gezielt gesetzt werden konnte. Als Futterkoralle dienten verschiedene *Briareum*-Kolonien. Die Futterkoralle wurde in ungleichmäßigen Abständen zur Regeneration ausgetauscht. Parallele Messungen der photosynthetischen Aktivität von *Symbiodinium* in den Korallen ergaben vergleichbare und gleichbleibende Werte (Relative Quantenausbeute: ~0,7).

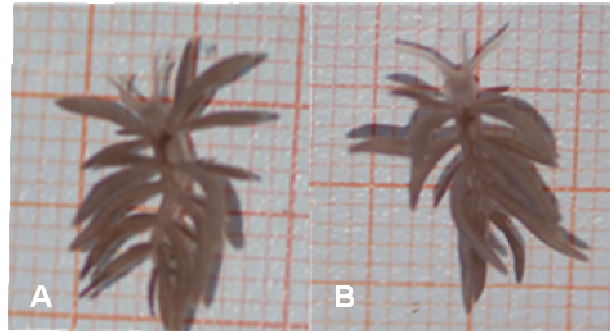


Abbildung 3.17: *Phyllodesmium briareum*, sechs Wochen nach Schlupf. Tier A ist 10 mm, Tier B 11 mm groß. In beiden wurde in diesem Stadium mit der Messung der photosynthetischen Aktivität begonnen

Die photosynthetische Aktivität von *Symbiodinium* in *P. briareum* wurde drei Mal pro Woche an den zuvor dunkel-akklimatisierten Tieren gemessen. Zur Betrachtung der Photosyntheserate wurde die photosynthetische Aktivität (als relative Quantenausbeute angegeben) gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3.19). Bei beiden Tieren schwankt die relative Quantenausbeute in den ersten 70 Tagen zwischen 0,7 und 0,8. In der darauf folgenden Phase (Tag 71-140) nimmt sie leicht ab und pendelt um einen Wert von 0,7. Nach knapp 140 Tagen sind beide Tiere verstorben. Die photosynthetische Aktivität der Symbionten hat bis zuletzt nicht abgenommen, was auf eine dauerhaft effektive Symbiose



Abbildung 3.18: *Phyllodesmium briareum* aus der Langzeitmessung. Aufnahme an Tag 90 der Messreihe. Tier A und Tier B sind vollständig ausgewachsen über 30 mm groß.

schließen lässt. Eine abfallende relative Quantenausbeute hätte von der Ausschleusung, der Verdauung oder dem Absterben der Symbionten gezeugt. Dies konnte auch am Ende der Messreihe nicht beobachtet werden. Die Tiere haben kurz vor ihrem Tod die Futterkoralle verlassen.

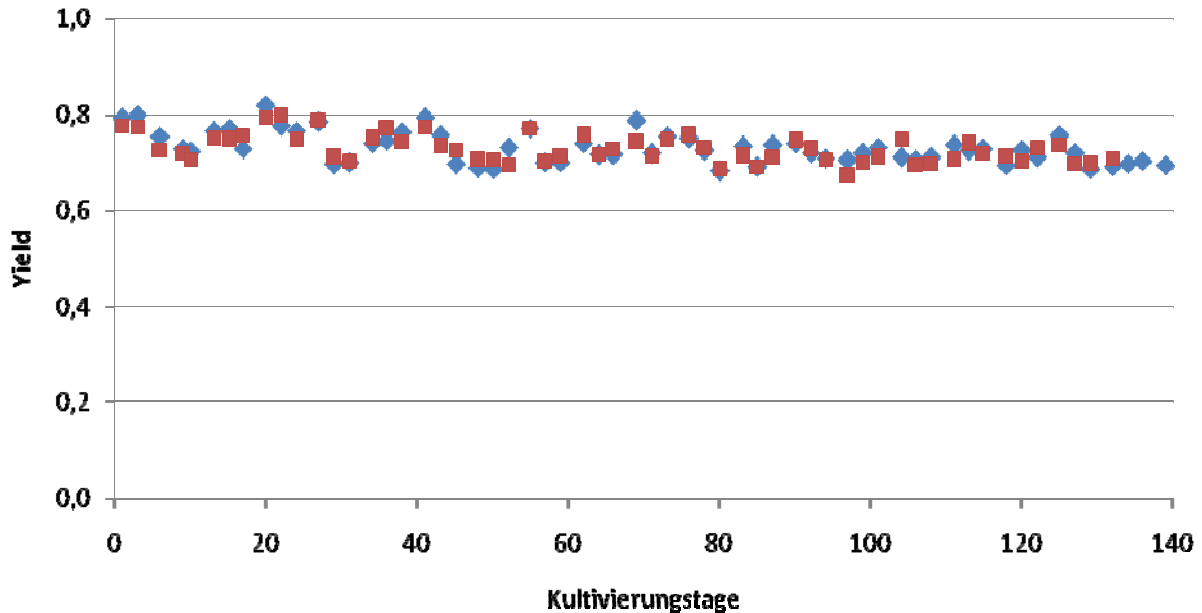


Abbildung 3.19: Photosyntheseaktivität der eingelagerten Symbionten in *Phyllodesmium briareum*. Gemessen wurde die Aktivität an zwei Tieren über das gesamte Adultstadium. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte, die an den einzelnen Messtagen erhoben wurden ($n=5/\text{Tag}$). Yield: Relative Quantenausbeute. Tier A: rot; Tier B: blau.

b. Einfluss der Beleuchtung auf die photosynthetische Aktivität der Symbionten in *Phyllodesmium briareum*

Um der Frage nachzugehen, wie die Lichtstärke die Symbiose beeinflusst, wurden drei Versuchsgruppen gebildet. Alle Versuchstiere stammen aus der eigenen Zucht, waren zwischen 10 und 25 mm groß und wurden ab Versuchsbeginn ohne Futter gehältert. Die erste Gruppe enthielt 16 Tiere. Diese wurden unter sehr hellem Licht gehältert (Philips TL D 36 W 1/33-640; $\text{PAR} = 47 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die zweite Versuchsgruppe enthielt 24 Tiere, diese wurden in Bechergläsern mit mittlerer Lichtstärke gehältert ($\text{PAR} = 8 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die dritte Gruppe wurde in Bechergläsern ohne Licht gehalten. In Gruppe drei befanden sich 13 Tiere. Wasserwechsel und Reinigung der Bechergläser erfolgten bei jeder PAM-Messung (drei Mal pro Woche). Jede Messreihe umfasste fünf Messungen pro Tier. Zwischen jeder Messung wurden die Tiere erneut dunkel-akklimatisiert.

Die relative Quantenausbeute der drei Versuchsgruppen starten mit unterschiedlich hohen Werten (Abb. 3.20). Bei der zweiten und dritten Versuchstiergruppe liegt der Anfangswert um ca. 0,05 höher. Dies ist auf den zeitlich versetzten Versuchsbeginn zurückzuführen und wird nicht als unterschiedliche photosynthetische Kapazität gewertet. Bei Betrachtung der

Trendlinie aller drei Gruppen wird deutlich, dass alle Linien im Laufe der 40 Tage um mindestens 0,15 fallen. Die der Gruppe 2 fällt um 0,25. Bei den unter mittleren Lichtbedingungen gehälterten Tieren lässt die photosynthetische Aktivität also schneller nach als bei den im Dunkeln bzw. im sehr hellen Licht gehälterten Tieren. Dieser Effekt ist jedoch minimal.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Lichtstärke keinen deutlichen Einfluss auf die Effektivität der Symbiose in Form messbarer veränderter photosynthetischer Aktivität aufweist. Die längste Kultivierungsdauer betrug 45 Tage.

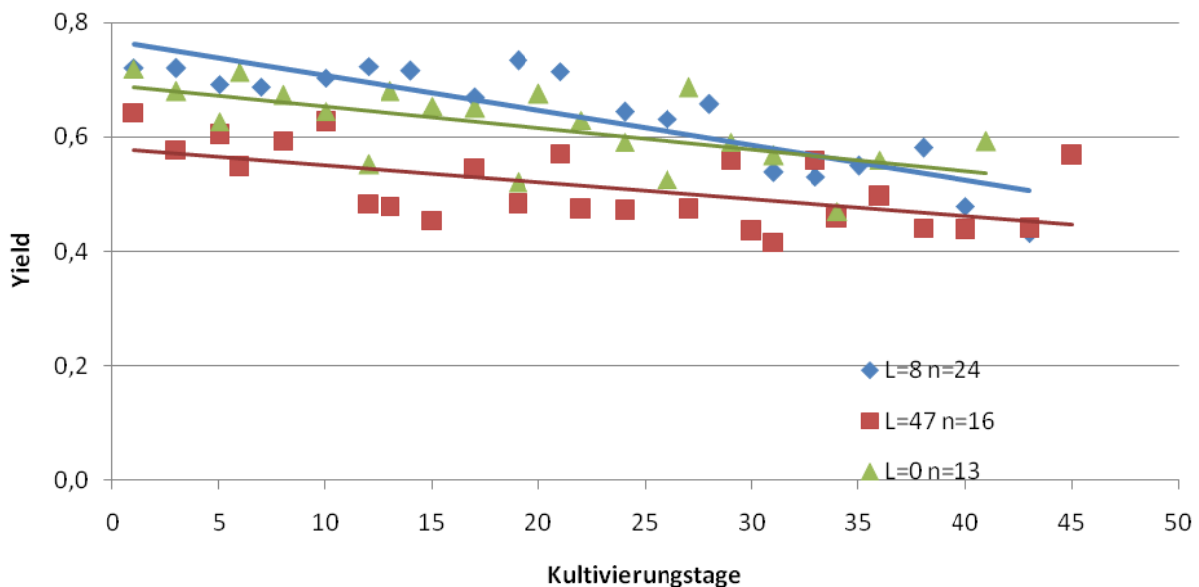


Abbildung 3.20: Photosynthese-Aktivität der Symbionten von *Phyllodesmium briareum* in Abhängigkeit der Lichtstärke. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der PS-Aktivität der Versuchstiere. Yield: Relative Quantenausbeute. L: PAR [$\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$] n: Anzahl Versuchstiere.

Zu Beginn der folgenden qualitativen Untersuchungen wurden Kriterien zur Bestimmung der Vitalität festgelegt: Verlust der Cerata, eingeschränkte Aktivität und starke Reduktion der Körpermasse.

c: Aufnahme von Mikroorganismen über das Meerwasser bei Abwesenheit von Licht und Nahrungsquellen

Reifes Meerwasser besitzt eine reichhaltige Mikrofauna. Um die Frage zu klären, ob diese bereits ausreicht, *Phyllodesmium briareum* in völliger Dunkelheit und ohne Futter zu ernähren, wurde eine Versuchsreihe mit zwei Tieren in sterilem Meerwasser im Vergleich zu zwei Tieren in etabliertem Meerwasser durchgeführt. Die PS-Aktivität wurde drei Mal pro Woche in fünf Einzelmessungen pro Tier gemessen. Da keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden konnten, wird auf die Darstellung der Ergebnisse

verzichtet. Es konnte also keine Aufnahme von Mikroorganismen nachgewiesen werden, die ein längeres Überleben ohne Futter ermöglicht hätten.

3.3.2 *Aeolidiella stephanieae*

Um Informationen über vergleichbare Symbiosesysteme zu bekommen, wurde die Zucht von *Aeolidiella stephanieae* etabliert. *Aeolidiella stephanieae* gehört zu den Aeolidiidae, die mit den Facelinidae, zu denen *Phyllodesmium* gehört, nahe verwandt sind. Im Gegensatz zu *Phyllodesmium* ernährt sich *Aeolidiella stephanieae* von *Aiptasia* sp. (Anthozoa, Hexacorallia). *Aiptasia* ist wie *Briareum* zooxanthellat. Beim Verzehr von *Aiptasia* nimmt *Aeolidiella* photosynthetisch aktive *Symbiodinium* auf.

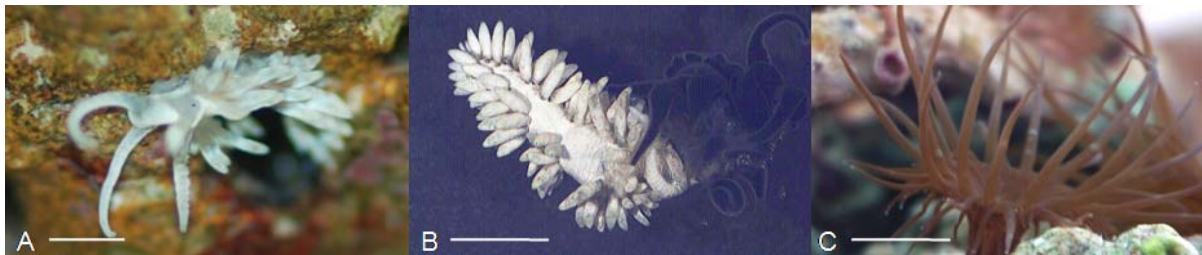


Abbildung 3.21: Symbiosesystem *Aeolidiella stephanieae* und *Aiptasia* sp..

A: *Aeolidiella stephanieae*; B: *Aeolidiella stephanieae* frisst *Aiptasia* sp.; C: *Aiptasia* sp.

Balken = 1 cm.

3.3.2.1 Etablierung des Systems

Zu Beginn der Hälterung sollten Informationen über den Lebenszyklus von *Aeolidiella stephanieae* unter Zuchtbedingungen generiert werden. *Aeolidiella stephanieae* lässt sich nicht wie *Phyllodesmium briareum* in Schwimmkästen hälterten. Da bei der Aufzucht der Gelege auf die Verwendung von zwar etabliertem, aber *Aeolidiella*-freiem Meerwasser geachtet werden muss, fand die gesamte Zucht in Gefäßen außerhalb der Aquarien statt. Dadurch konnte zusätzlich auch vermieden werden, dass die frisch geschlüpften, deutlich mobileren Schnecken durch die Maschen der Schwimmkästen ins Becken übertreten konnten und für die Analyse verloren gingen.

In den Gelegen und den frische geschlüpften Schnecken konnten keine Symbionten nachgewiesen werden.

3.3.2.2 Photosynthetische Aktivität der Symbionten in *Aeolidiella stephanieae*

Die Photosyntheseaktivität der eingelagerten Symbionten während des normalen Lebenszyklus von *Aeolidiella stephanieae* (Versuchstiere 1-4) ist starken Schwankungen unterworfen (Abbildung 3.22) Die Tiere, welche normal gefüttert wurden, sind durch die blauen Markierungen dargestellt (n=4). Die Photosyntheseaktivität der Symbionten von

Aeolidiella stephanieae liegt zu Beginn der Messung bei ca. 0,6 und fällt ab Tag 130 ab. In den letzten 70 Tagen sind relative Quantenausbeuten von unter 0,2 zu beobachten. Die PS-Aktivität der Symbionten in den Hungertieren (Tier 5-8, rote Markierungen) nimmt rasch stark ab. Die Symbionten in *Aeolidia stephanieae* sind nicht so lange photosynthetisch aktiv wie in *Phyllodesmium briareum*. Kotproben, welche bis zu Tag 10 von den Tieren 5-8 genommen werden konnten, enthielten optisch intakte Symbionten. Um die Photosyntheseaktivität der Symbionten in den Versuchstieren zu verdeutlichen, sind die relativen Quantenausbeuten der Versuchstiere zusammengefasst, gemittelt und grafisch gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen worden (Abb. 3.23). Es ist auffällig, dass die Werte am Anfang hohe Standardabweichungen aufweisen, diese dann aber im Laufe der Zeit abnehmen. Dies liegt an der Tatsache, dass es sich bei den Markierungen um die mittlere relative Quantenausbeute der zu dem Zeitpunkt gemessenen Tiere handelt. Mit jedem Tier, welches verstirbt, nimmt die Höhe der Schwankung ab. Von Tag 94 - 224 ist nur noch ein Tier in der Messung enthalten.

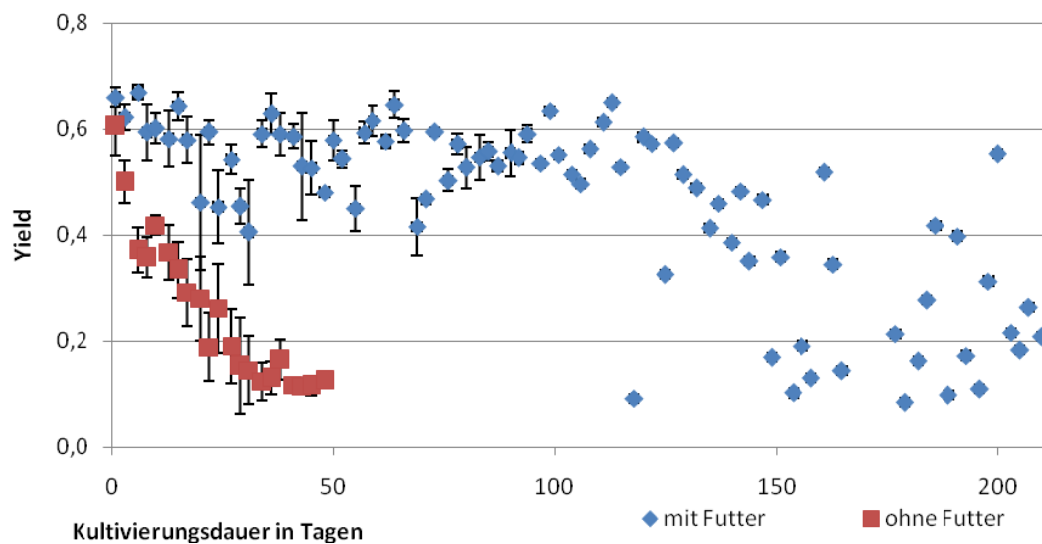


Abbildung 3.22: Photosyntheseaktivität der Symbionten von *Aeolidiella stephanieae*. Yield: Relative Quantenausbeute. **Blau**: Versuchstiere mit Nahrung gehältert (N=4); **Rot**: Versuchstiere hungerten im Licht (N=4). PAR=8 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine stabilere Symbiose zwischen *Phyllodesmium briareum* und *Symbiodinium* hin als zwischen *Aeolidiella stephanieae* und *Symbiodinium*. Bei *Phyllodesmium* ist die photosynthetische Aktivität der Symbionten über den gesamten Lebenszyklus annähernd auf gleich hohem Niveau geblieben. Bei *Aeolidiella stephanieae* nimmt die photosynthetische Aktivität der Symbionten auch unter normalen Hälterungsbedingungen zum Ende des Schneckenlebens deutlich ab.

Tabelle 3.9 gibt einen Überblick über die Lebensdauer der oben verwendeten Versuchstiere. Tag 0 ist der Versuchsbeginn, zu diesem Zeitpunkt waren alle Tiere vermutlich adult. Die Tiere wurden in zwei Gruppen geteilt. Tiere 1-4 wurden unter normalen Bedingungen

gehältert und regelmäßig (drei Mal pro Woche) mit *Aiptasia* gefüttert. Die Messungen der Photosyntheseaktivität erfolgten immer vor der Fütterung. Tiere 5-8 wurden auch normal gehältert, bekamen aber von Tag 0 des Versuchs keine Nahrung mehr. Tiere 1 und 2 aus der Gruppe der gefütterten Tiere sind nicht auffällig alt geworden. Tiere 3 und 4 hingegen haben mit maximal 224 Tagen deutlich länger gelebt als die Versuchstiere 5-8, welche nicht gefüttert wurden. Ein nicht in den Versuchen eingesetztes Tier lebt seit knapp 400 Tagen.

Im Vergleich mit der Lebenserwartung von *Phyllodesmium briareum*, welches hier im Versuch maximal 182 Tage lebte (im PAM-Versuch 140 Tage + 42 Tage vor Beginn der Messung), fällt auf, dass *Aeolidiella stephanieae* deutlich älter zu werden scheint.

Tabelle 3.9: Lebensdauer der Versuchstiere nach Beginn der Hälterung. Die Tiere 1-4 bekamen Futter, Tiere 5-8 bekamen kein Futter. Alle Versuchstiere wurden unter normalen Lichtbedingungen gehältert; PAR = $8 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tier	Lebensdauer [Tage]	Futter
1	15	ja
2	43	ja
3	94	ja
4	224	ja
5	36	nein
6	48	nein
7	31	nein
8	45	nein

Das Schicksal der Symbionten nach Absterben der Wirtsschnecke

Zur Überprüfung, ob die Symbionten nach dem Absterben der Schnecke oder nach dem Ausscheiden durch die Schnecke mit dem Kot weiter leben oder ebenfalls absterben, wurden die Symbionten im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Abb. 3.23 zeigt in Auflösung befindliche *Symbiodinien* (A), die schon einen Großteil ihres Chlorophylls verloren haben (B). *Symbiodinium* konnte nicht freilebend im ankonzentrierten Aquariumwasser von beiden Systemen nachgewiesen werden.

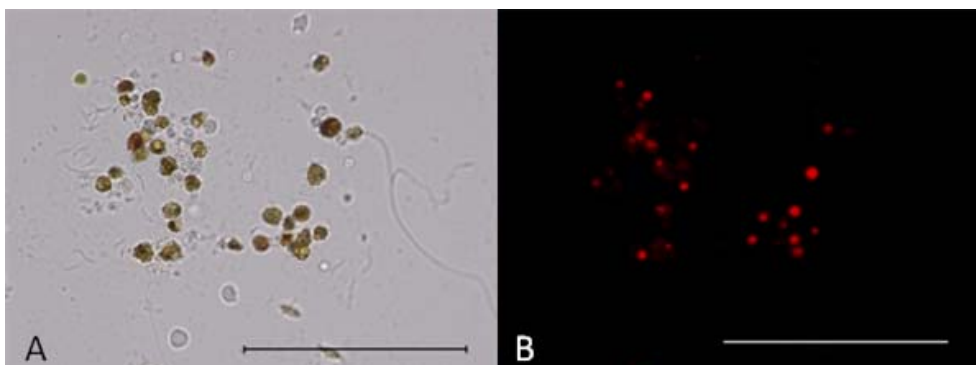


Abbildung 3.23: *Symbiodinium* sp. ausgeschieden durch *Phyllodesmium briareum*. A: normale mikroskopische Ansicht, B: Autofluoreszenz des Chlorophylls von *Symbiodinium* nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm. Balken: 200 μm .

3.3.3 Vergleichende Beobachtungen zur Nahrungsaufnahme zwischen Aeolidida und nicht-Aeolidida: Gleiche Nahrung – anderes Verhalten bei der Nahrungsaufnahme - keine Symbiose

Dermatobranchus albus und *Mariona* sp. gehören nicht zu den Aeolidida, ernähren sich aber vom gleichen Organismus wie *Phyllodesmium briareum*, von Arten des Genus *Briareum*.

Bei der Beobachtung der Tiere ist aufgefallen, dass die Aufnahme der Futterkoralle bei allen drei Tieren auf unterschiedliche Weise erfolgt. Alle drei Arten konnten auf *Briareum asbestinum* und *Briareum violacea* beobachtet werden (Abb. 3.24 A-C). Bei *Phyllodesmium briareum* ist die Nahrungsaufnahme nicht offensichtlich. Die Tiere bewegen sich kaum und halten ihren Körper dicht an das Korallenepithel gedrückt. Es konnten keine Fressbewegungen im Kopfbereich beobachtet werden. Beobachtet werden konnte jedoch bei hungrigen Tieren, welche nach Hungerphasen zurück auf die Futterkoralle gesetzt wurden, dass sie niemals die Polypen von *Briareum* fraßen, sondern sich nur auf das Gewebe zwischen den Polypen konzentrierten. *Phyllodesmium briareum* frisst vermutlich von der Fußscheibe der Korallen.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die kurzfristige Anwesenheit (4-5 Tage) von *Phyllodesmium briareum* keinen Einfluss auf die beiden untersuchten *Briareum*-Spezies hatte. Die Polypen haben sich erst nach einem Zeitraum von fünf Tagen nicht wieder geöffnet. Der längere Befraß durch *Phyllodesmium briareum* schadet der Koralle massiv.

Marionia sp. ist ein deutlich aktiveres Tier. Die Schnecken konnten schwimmend im Aquarium beobachtet werden. Dabei haben sie sich in „klappmesserartigen“ Bewegungen durch das Becken bewegt (Abb. 3.24 F-G). Die Bewegung machte jedoch nie den Eindruck einer gerichteten Schwimmbewegung. Ähnlich aktiv wurden sie auf ihren Futterkorallen beobachtet. *Marionia* sp. hat sich zur Nahrungsaufnahme auf dem hinteren Fußende aufgerichtet und dann mit einer schnellen Bewegung und weit geöffnetem Mund die Polypen von *Briareum asbestinum* und *Briareum violacea* gefressen. Die Polypen wurden mit einer kräftigen nach oben gerichteten Bewegung „abgerissen“. Die schnelle Aktion von *Marionia* sp. kann daran liegen, dass sich die Polypen der Korallen bei Anwesenheit der Schnecke in kürzester Zeit einziehen. Von dem Korallengewebe zwischen den Polypen scheint *Marionia* sp. sich nicht zu ernähren.

Bei *Dermatobranchus albus* konnte zwar keine auffällige Fressbewegung beobachtet werden, aber sie wurden häufiger in der Nähe der eingezogenen Polypen beobachtet (Abbildung 3.23 E), und scheinen sich von den Polypen zu ernähren.

Bei *Marionia* sp. konnte mittels PAM keine messbare Photosyntheseaktivität nachgewiesen werden. Hier werden die aufgenommenen Symbionten verdaut. Ähnliches wird auch bei

Dermatobranchus albus erwartet. Die Tiere sind jedoch zu klein zum Messen der PS-Aktivität gewesen.

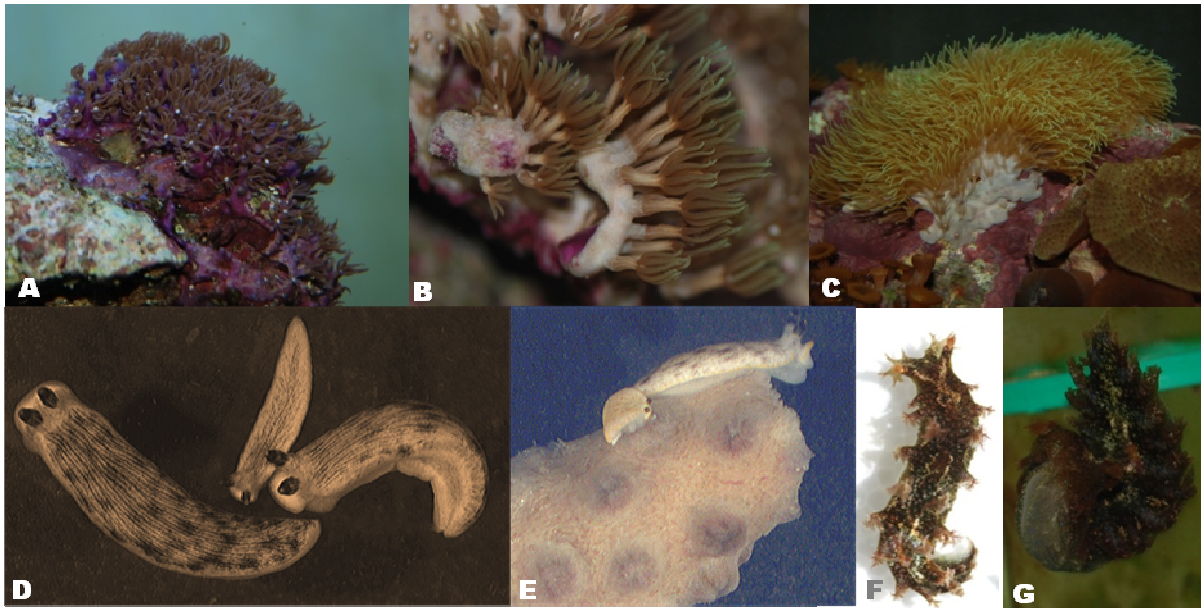


Abbildung 3.24: Futterkorallen und Versuchstiere. A: *Briareum violacea*; B-C: *Briareum asbestinum*; D: *Dermatobranchus albus*, E: *Dermatobranchus albus* auf eingezogenem Polyp von *Briareum asbestinum*, F: *Marionia* sp.; G: *Marionia* sp. schwimmend.

3.3.4 Zusammenfassung der untersuchten Symbiose-Systeme

- Die Kultivierung der zwei Symbiose-Systeme *Phyllodesmium briareum* auf *Briareum* als auch *Aeolidiella stephanieae* mit *Aiptasia* konnte erfolgreich im Labor etabliert werden.
- Während *Phyllodesmium* nur eine ungefähre Lebensdauer von 180 Tagen aufweist, kann *Aeolidiella* fast 400 Tage leben.
- Die Symbionten von *Phyllodesmium briareum* erhalten über die gesamte Lebenszeit des Wirtes eine gleichbleibende PS-Aktivität aufrecht. Im Hungerversuch nimmt die PS-Aktivität in geringem Umfang ab. Dieses spricht für eine stabilere Symbiose.
- Die Symbionten von *Aeolidiella stephanieae* verlieren am Ende der Lebenszeit ihrer Wirtsschnecke an PS-Aktivität. Im Hungerversuch verlieren sie ihre Symbionten sehr schnell, was an nachlassender PS-Aktivität zu messen ist. Schnell abnehmende PS-Aktivität über die Zeit wird als Hinweis auf instabile Systeme betrachtet.
- Nach dem Freisetzen aus *Phyllodesmium* nimmt die Autofluoreszenz des Chlorophylls in *Symbiodinium* ab. Gleiche Ergebnisse können für das Symbiose-System *Aeolidiella stephanieae* mit *Aiptasia* formuliert werden.
- *Phyllodesmium* kann im Hungerversuch länger mit Licht als im Dunkeln überleben, da ihre Symbionten, die sie mit Photosynthese-Produkten versorgen, nur dann effektive Photosynthese betreiben können.

3.4 Identifizierung der Symbionten

Da *Symbiodinium* bisher nur aus *Pteraeolidia ianthina* als Symbiont isoliert und molekular identifiziert werden konnte (Loh et al. 2006) und alle anderen bekannten Sequenzen von *Symbiodinium* aus anderen Evertebraten-Symbiosen stammen (Baker 2003), sollten nun erstmals Symbionten weiterer Aeolidida identifiziert werden. Dazu wurden die Sequenzen der plastidären LSU von *Symbiodinium* aus verschiedenen *Phyllodesmium*-, *Phidiana*-, *Pteraeolidia*- und *Flabellina*-Spezies gewonnen (nach Zhang et al. 2000, siehe Tab. 2.3). Die Identifizierung erfolgte zunächst über eine BLAST-Suche, vertiefend dann durch die anschließende Rekonstruktion der Phylogenese bereits bekannter und neuer *Symbiodinium*-Sequenzen. Alle neu identifizierten Sequenzen konnten dem Taxon *Symbiodinium* Clade A oder C zugeordnet werden.

Innerhalb der Sequenzen aus Clade C konnte an drei Stellen eine Substitution von C zu G nachgewiesen werden, welche Clade C noch einmal in zwei Gruppen aufteilt (Clades CI und CII im Weiteren genannt). Die Taxa aus Clade CI haben an den betreffenden Stellen ein C, die aus Clade CII ein G. Die anderen Clades (außer Clade I) haben größtenteils an den Stellen ebenfalls ein C. Die Transversion von C zu G ist demnach eine Autapomorphie für Clade CII. Interessanterweise enthielten die Taxa des Genus *Phyllodesmium* ausschließlich Symbionten des Clade C, während *Phidiana indica* und *Pteraeolidia ianthina* Symbionten aus Clade A und Clade C enthielten.

Für die Symbiosesysteme von *Phyllodesmium lizardensis*, *Phyllodesmium hyalinum*, *Phyllodesmium briareum*, *Phidiana indica* und *Pteraeolidia ianthina* konnten ebenfalls Symbionten aus den jeweiligen Futterorganismen (Tab. 3.10) identifiziert werden. Die Symbionten der Futterorganismen lassen sich identisch in den untersuchten *Phyllodesmium* Taxa wiederfinden. Auch hier ist die Unterscheidung zwischen Clade CI und Clade CII möglich (Abb. 3.26). Leider waren nicht von allen Schnecken die Futterkorallen vorhanden. Nur bei den Schnecken, die ein Kreis oder Minus im Stammbaum enthalten, hat Futtermaterial zur Auswertung zur Verfügung gestanden.

Im vermeintlichen Substrat von *Pteraeolidia ianthina* konnten keine Symbionten nachgewiesen werden. Vermutlich handelte es sich hierbei nicht um die Futterquelle, sondern nur um ein zufälliges Auftreten der Schnecke auf dem Substrat. Bisher ist die Futterquelle von *Pteraeolidia* nicht bekannt. *Phidiana indica* ernährt sich von *Millepora* sp., darin konnte ausschließlich Clade A nachgewiesen werden. Die in *Flabellina bicolor* gefundenen Symbionten des Clade CI haben einen unbekanntem Ursprung, da keine zooxanthellate Nahrungsquelle der Schnecke bekannt ist.

Symbiodinium des Clade C konnte mit großem Abstand am häufigsten identifiziert werden.

Tabelle 3.10: Erstellte *Symbiodinium*-Sequenzen aus Aeolidida und aus Futterorganismen der Aeolidida.

Clade	A	C1	C2
Sequenzen	4	36	10
aus Futterorganismen	1	28	6
aus Aeolidida	3	8	4

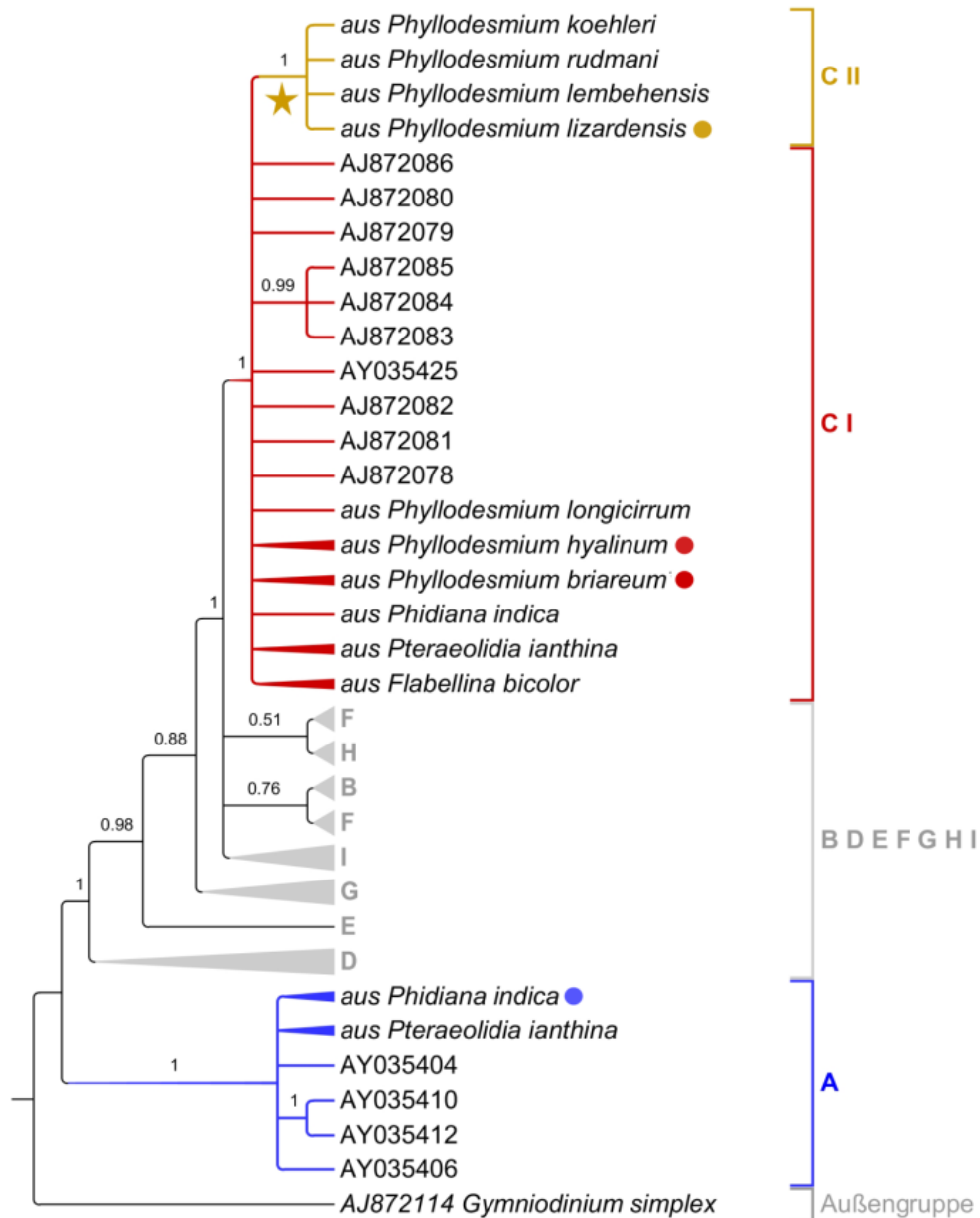


Abbildung 3.26: Phylogenie von *Symbiodinium* aus verschiedenen hier untersuchten Aeolidida sowie bereits bekannte *Symbiodinium*-Sequenzen, erkennbar an Genbank-Accession numbers. Kladogramm erstellt nach bayesianischen Analysemethoden (50 % majority rule Konsensusbaum), anhand des kombinierten Datensatzes. Für die Analyse sind folgende Annahmen getroffen worden: 1.000.000 Generationen, samplefreq = 1000, nchains = 4, burnin = 400. Die Zahlen geben die a-posteriori Wahrscheinlichkeiten des entsprechenden Knotens an. Stern: C → G an drei Positionen; Kreise: in den Futterorganismen wurden die gleichen Symbionten gefunden. Minus: nicht in Futterorganismen nachweisbar. Als Dreiecke dargestellte terminale Taxa: mehr als 1 Taxon untersucht.

3.5 Relative Quantifizierung der Symbionten

Im vorherigen Abschnitt wurden Symbionten der Clades A und C in verschiedenen Symbiosesystemen identifiziert und eine Unterteilung in die Clades CI und CII aufgrund eines Basenaustausches vorgenommen.

Die reine Identifizierung lässt bisher keine Aussagen über die Anteile der gefundenen Symbionten in den Schnecken, bzw. Korallen zu. Bisher sind dazu auch noch keine Daten publiziert worden. Mit der Methode der quantitativen PCR (qPCR) wäre eine Quantifizierung möglich, wenn geeignete Marker etabliert werden können. Ein weiterer Vorteil, eine qPCR einzusetzen wäre, dass evtl. Informationen darüber generiert werden könnten, ob die herkömmlichen Methoden unbeabsichtigt *Symbiodinium* Clade C-spezifisch sind und deswegen selten andere Clades identifiziert werden.

Zunächst sollten die Korallen auf die Verteilung ihrer Symbionten hin mit quantitativer PCR untersucht werden. Anschließend sollte überprüft werden, ob das Verteilungsmuster in den Schnecken wieder gefunden werden kann.

Eine Hypothese zur Verteilung der *Symbiodinium*-Clades in Korallen besagt, dass diese nur bestimmte Clades halten, von denen sie offensichtlich am meisten Photosynthese-Produkte erhalten können. Für die hier erstmals in dieser Weise untersuchten Schnecken galt es zu ermitteln, ob diese Hypothese auch bei den Schnecken zu belegen ist.

Die Herausforderung, in vorliegenden Untersuchungen geeignete spezifische Primer und Referenzwerte zu generieren, liegt in dem hier zu untersuchenden Probenmaterial. Dieses besteht in jedem Fall aus den Genomen mehrerer Organismen, die selbst noch zwei oder drei verschiedene Genome aufweisen. Die Proben der Futterkorallen enthalten die Genome der Korallen (Kern und Mitochondrien) und die Genome des Symbionten *Symbiodinium* (Kern, Mitochondrien und Plastide). In den Proben der Aeolidida kommt zu den beiden schon beschriebenen Genomen (z. T. im Verdauungstrakt) noch ihr eigenes Genom hinzu (Kern und Mitochondrien). Daher sind die erzielten Ergebnisse trotz sorgfältiger Planung und Durchführung unter der Annahme einer größeren Schwankungsbreite zu betrachten. Der Einsatz bekannter Referenzgene erscheint wegen der genomischen Vielfalt nicht sinnvoll.

Um die relativen Mengen der Symbionten zu erfassen, wurden spezifische plastidäre LSU Primer für die Clades A und C von *Symbiodinium* entwickelt, womit die Kern- und Mitochondriengenome der Tiere ausgeschlossen werden konnten. Als Bezugsgröße wurde ebenfalls ein plastidäres Primerpaar etabliert (Primer All), welches die gesamten Symbionten (Clades A-I) der Wirtsorganismen erfasst. Weiterhin wurde ein Primerpaar für Clade D entwickelt. Clade D wurde von Loh et al. (2006) in *Pteraeolidia ianthina* entdeckt.

Die Effizienzen der Primer wurden mit Hilfe von Standardkurven ermittelt. Beispielhaft sind im Folgenden die Standardkurven für das Primer-Paar All (alle Clades) sowie für das Primerpaar A (Clade A) dargestellt. Zu Beginn wurden die Produkte der qPCR stichprobenartig kloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenzen der qPCR Produkte konnten in allen Fällen bekannten *Symbiodinium*-Sequenzen zugeordnet werden.

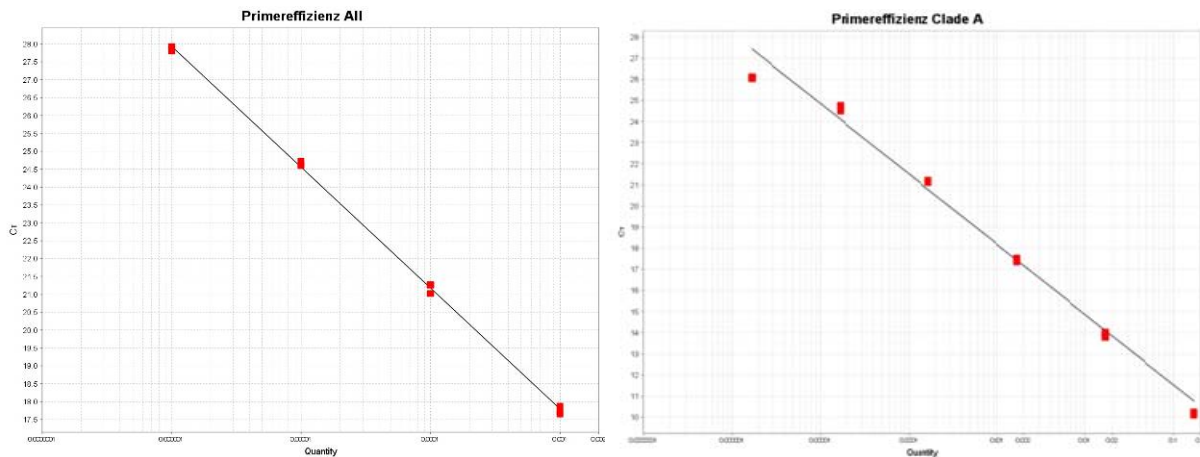


Abbildung 3.27: Standardkurve zur Ermittlung der Primereffizienzen. Dargestellt sind die Standardkurven der Primerpaare für *Symbiodinium* Clade All und für A.

Die Steigung der Geraden dient zur Ermittlung der Primereffektivität aus klonierten Clade-Sequenzen.

Tabelle 3.11: Effizienzen der qPCR Primer.

Primer	Steigung	Effizienzen
All	-3,385	1,97
A	-3,335	1,99
C	-3,466	1,94
D	-3,269	2,02

Die Primer besitzen vergleichbare Effizienzen und können in einer Analyse miteinander verwendet werden.

An dieser Stelle sei nochmal daraufhin gewiesen, dass das Primerpaar für Clade D aufgrund der Ergebnisse von Loh et al. (2006) entwickelt wurde, welche in *Pteraeolidia ianthina* *Symbiodinium* Clade D nachweisen konnten. In dieser Arbeit wurden mit den herkömmlichen PCR Methoden nur *Symbiodinium* Clade A und C bisher nachgewiesen.

Nachdem die Effizienz und Vergleichbarkeit der neuen Primer nachgewiesen wurde, konnten die Symbionten verschiedener Aeolidida untersucht werden. Die Ergebnisse der einzelnen Symbiosesysteme sollen nun vorgestellt werden.

3.5.1 Zusammensetzung der Symbionten-Clades in *Phyllodesmium briareum* und verschiedener Futterkorallen

Mittels der hier etablierten qPCR Primer wurden die Symbiosesysteme *Symbiodinium* – *P. briareum* und *Symbiodinium* – Futterkorallen von *P. briareum* (*Briareum asbestinum*, *Briareum violacea* und *Erythropodium sp.*) untersucht. Die Anteile der Symbionten der Clades A, C und D wurden ermittelt und miteinander auch unter Betrachtung der „Bevorzugung“ bestimmter Clades verglichen.

Vier adulten *P. briareum* wurden zu Beginn Cerata entnommen. Anschließend wurden die Schnecken für fünf Tage ohne Nahrung gehalten, woraufhin eine erneute Probe genommen wurde. Um zu überprüfen, ob die unter Abbildung 3.13 dargestellten Nahrungspräferenzen auch genetisch nachweisbar sind, wurden die Schnecken für zwei Stunden auf verschiedene Futterkorallen (Abb. 3.28) gesetzt und ein drittes Mal beprobt. Von den Futterkorallen wurden jeweils Proben der Polypen (Abb. 3.28 weißer Pfeil) und der „Fußscheibe“ (Abb. 3.28 gelber Pfeil) eingesetzt.

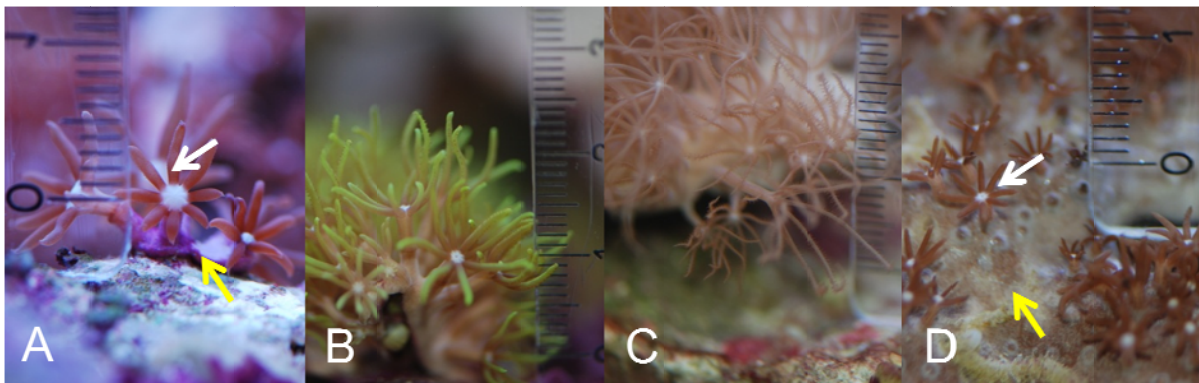


Abbildung 3.28: Futterkorallen von *Phyllodesmium briareum*.

A: *Briareum violacea*, B: *Briareum asbestinum* (grün), C: *Erythropodium sp.*, D: *Briareum asbestinum*. Die Pfeile markieren die Stellen der Probenentnahme. Weißer Pfeil: Polyp, gelber Pfeil: "Fußscheibe". Fotos: C. Otten.

Die neu etablierten Primer erfassen einen sehr spezifischen, ausgewählten Anteil der in den Schnecken vorhandenen Symbionten. Der Großteil, welcher durch das „All“ Primer-Paar erfasst wird, setzt sich aus Symbionten mit bisher unklarer Zuordnung zusammen. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass das Primerpaar „All“ *Symbiodinium* aller Clades erfasst.

In den Polypen der untersuchten Korallen machen die untersuchten Symbionten einen sehr geringen Teil der insgesamt mit dem Primer-Paar „All“ erfassten Symbionten aus (Abb. 3.29). Dieser Anteil ist in Abbildung 3.29 als grauer Balken dargestellt.

Clade A ist in allen Proben der Polypen mit der Ausnahme von *Erythropodium* und in allen Fußscheiben zu identifizieren. Das mit spezifischen Primern entdeckte Clade C ist ausschließlich in den Polypen der untersuchten *Briareum asbestinum* und im Polypen von

Briareum violacea nachzuweisen, obwohl es in der Grafik aufgrund der geringen Menge nicht zu erkennen ist. Generell sind in den Fußscheiben der *Briareum*-Proben deutlich mehr spezifizierte Symbionten als in den Polypen nachzuweisen. Offensichtlich „lagern“ die Korallen dort mehr nachweisbare Symbionten der Clades A, C und D ein, um auch bei Fraßgefahr mit eingezogenen Polypen effektiv Photosynthese betreiben zu können.

Clade D ist das quantitativ am meisten nachgewiesene Clade, wobei es in den Polypen einen deutlich geringeren Anteil einnimmt als in den Fußscheiben. Auch Symbionten des Clade A treten vermehrt in den Fußscheiben auf. Interessanterweise ist Clade C in den Fußscheiben nicht nachweisbar.

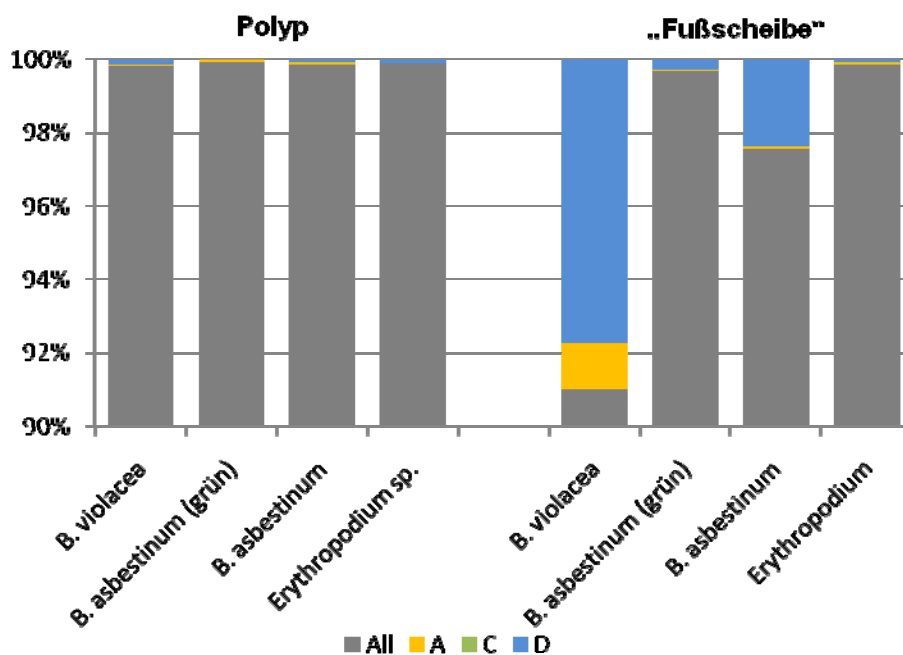


Abbildung 3.29: Verhältnis identifizierbarer Clades von *Symbiodinium* aus den Futterkorallen von *Phyllodesmium briareum*.

Clade C in den Polypen von *Briareum violacea* und *Briareum asbestinum* (grün) nachweisbar. Zur besseren Darstellung beginnt die Y Achse des Graphen bei 90 %. All: alle *Symbiodinium* Clades minus Clade A, C und D. Clade C nachweisbar aber aufgrund der geringen Menge in der Grafik nicht zu erkennen.

Um zu sehen, ob sich die Symbiontenzusammensetzung in den Schnecken in Abhängigkeit vom Futterorganismus unterscheidet, wurden zusätzlich zu den untersuchten Korallen die Symbionten von *Phyllodesmium briareum* untersucht, die von den Korallen über das Fressen aufgenommen und etabliert wurden. Die vier untersuchten Schnecken wurden im Aquarium auf *Briareum* gehalten. Ihnen wurde jeweils ein Ceras entnommen (in den folgenden Abbildungen mit 1 gekennzeichnet), bevor sie für fünf Tage ohne Nahrung separiert wurden. Hier erfolgte auch die zweite Probennahme (2), welche Auskunft über die Symbiontenzusammensetzung in hungernden Schnecken geben sollte. Die Schnecken

wurden dann für zwei Stunden auf verschiedene Futterkorallen (Abb. 3.25) gesetzt und anschließend ein letztes Mal beprobt (3), um zu ermitteln, wie sich die aufgenommenen Symbionten im Verhältnis der gesamten Symbionten in den Schnecken auswirken (Abb. 3.30-3.33).

Briareum violacea* als Nahrungsquelle für *Phyllodesmium briareum

Innerhalb der Symbiosesysteme von *Phyllodesmium briareum*, ist ein deutlich höherer Symbiontenanteil identifizierbarer Symbionten erfassbar. Dargestellt wird der Anteil der spezifisch erfassten Symbionten von allen identifizierten Symbionten (Primer „All“) in den Schnecken sowie in den Korallen (Abb. 3.30).

Clade C ist im Polyp von *Briareum violacea* zu Versuchsbeginn nachweisbar, obwohl es in der Grafik aufgrund der geringen Menge nicht zu erkennen ist. Der Anteil erfassbarer Symbionten ist zu Beginn und nach der Hungerphase gleichmäßig gering. Dieses kann ein Hinweis darauf sein, dass die Schnecke ihre Symbionten während der Hungerphase gleichmäßig abgegeben bzw. verdaut hat. Nach Nahrungsaufnahme erhöht sich der Anteil erfassbarer Symbionten des Clade A und D deutlich. Die Symbionten-Verhältnisse ähneln denen der „Fußscheiben“-Probe der Futterkoralle *Briareum violacea*. Aus schon beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass *Phyllodesmium briareum* immer von den „Fußscheiben“ frisst und nicht vom Polypen, was sich hiermit verifizieren lässt.

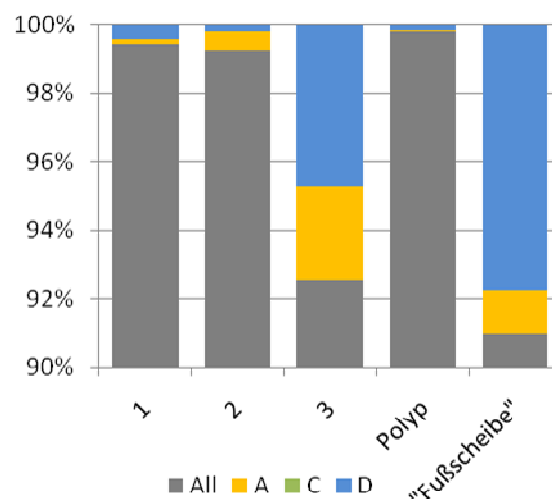


Abbildung 3.30: Verhältnis identifizierbarer Clades von *Symbiodinium* aus *Phyllodesmium briareum*.

1: normale Hälterung. 2: nach 2-stündiger Hungerphase, 3: nach Fütterung mit *Briareum violacea*. Ermittelt wurden die Anteile von Clade A, C und D per qPCR. Zur besseren Darstellung beginnt die Y-Achse des Graphen bei 90 %. All: alle *Symbiodinium* Clades minus Clade A, C und D.

Clade C in den Polypen von *Briareum violacea* und *Briareum asbestinum* (grün) nachweisbar aber aufgrund der geringen Menge in der Grafik nicht zu erkennen.

Briareum asbestinum* als Nahrungsquelle für *Phyllodesmium briareum

Briareum asbestinum kommt in zwei verschiedenen Morphotypen vor. Während die zuerst untersuchte Morphospezies eine bräunliche Färbung aufweist, zeigt die im Anschluss behandelte Art grüne Spitzen an den Polypen.

Der Anteil erfasster, identifizierter Symbionten ist bei dieser Schnecke nach der Hungerphase deutlich höher als zu Beginn der Messung, was darauf hindeuten kann, dass die bekannten Symbionten nicht in dem Maße ausgeschieden werden wie die unbekanntes Symbionten. Nach der Nahrungsaufnahme steigt der Anteil der unbekanntes Symbionten, aber auch der von Clade A. Dies lässt sich durch die Verteilung der Symbionten-Clades in der Futterkoralle erklären. Durch die Aufnahme der Symbionten aus der Fußscheibe kommen unbekanntes, aber auch bekannte Symbionten des Clade D in die Schnecke und verändern die Verhältnisse der dort schon vorhandenen Symbionten (Abb. 3.31).

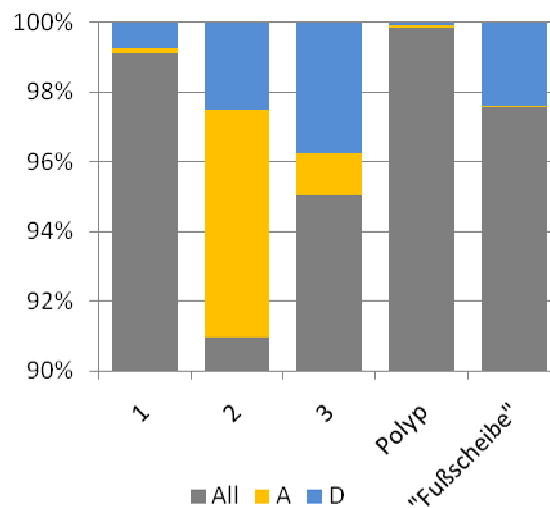


Abbildung 3.31: Verhältnis identifizierbarer Clades von *Symbiodinium* aus *Phyllodesmium briareum*.

Die Schnecken wurden normal gehältert (1), dann hungern gelassen (2) und anschließend auf *Erythropodium* sp. gesetzt (3).

Ermittelt wurden die Anteile von Clade A und D per qPCR. Zur besseren Darstellung beginnt die Y-Achse des Graphen bei 90 %. All: alle *Symbiodinium* Clades minus Clade A und D.

Briareum asbestinum* (grün) als Nahrungsquelle für *Phyllodesmium briareum

Bei dieser grün gefärbten Morphospezies erhöht sich der Anteil erfassbarer Symbionten sowohl nach dem Hungern als auch nach dem Fressen. Dieses kann erneut ein Indiz dafür sein, dass die spezifizierbaren Symbionten in stärkerem Maß in der Schnecke behalten werden, als die bisher unbekanntes Symbionten. Es erhöht sich hier erstaunlicherweise der Anteil unbekannter Symbionten nicht. Bei den vorrausgegangenen Ergebnissen erhöhte sich der Anteil nach der Nahrungsaufnahme (Abb. 3.32).

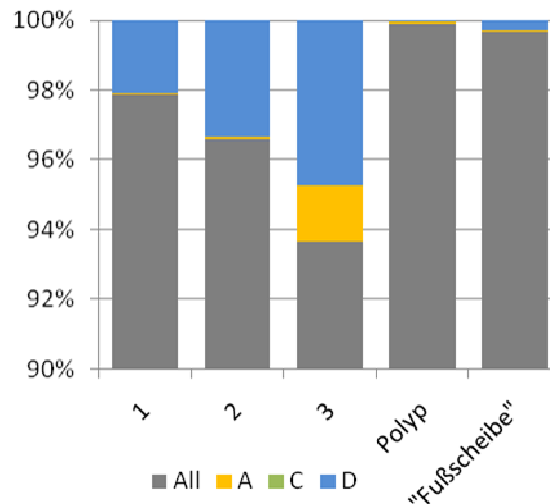


Abbildung 3.32: Verhältnis identifizierbarer *Symbiodinium* aus *Phyllodesmium briareum*.

Die Schnecken wurden normal gehältert (1), dann hungern gelassen (2) und anschließend auf *Briareum asbestinum* (grün) gesetzt (3). Ermittelt wurden die Anteile von Clade A, C und D per qPCR. Clade C im Polypen nachweisbar aber aufgrund der geringen Menge in der Grafik nicht zu erkennen. All: alle *Symbiodinium* Clades minus Clade A, C und D.

Erythropodium* sp. als Nahrungsquelle für *Phyllodesmium briareum

Clade C ist in der Schnecke zu Versuchsbeginn in geringem Anteil nachweisbar, allerdings in der Grafik aufgrund der geringen Menge nicht zu erkennen. Im Vergleich zu den vorhergegangenen Systemen erhöht sich auch bei dieser Schnecke der Anteil erfassbarer Symbionten während der Hungerphase. Durch die Nahrungsaufnahme erhöht sich der Anteil unbekannter Symbionten wieder. Dies kann als zusätzlicher Beleg für *Erythropodium* sp. als mögliche Futterquelle angesehen werden (Abb. 3.33).

Für die Betrachtung der Mengen der Symbionten in den unterschiedlichen Systemen, wurden die Ct-Werte der qPCR Läufe herangezogen. Die Ct-Werte (Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) stellen eine theoretische Größe dar, welche den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve beschreibt. In der qPCR Kurve ist das der Bereich der Kurve, in dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Für

die Methode der PCR gilt dann: Je mehr DNA in der eingesetzten Probe vorlag, desto mehr Kopien entstehen pro Zyklus, desto schneller kommt es zu Fluoreszenz-Signalen und desto eher übersteigt die Fluoreszenz den Schwellenwert. Letztendlich bietet der Vergleich der Ct-Werte zweier Proben die Möglichkeit zu zeigen, welche Probe vor der Amplifizierung mehr spezifische DNA enthielt.

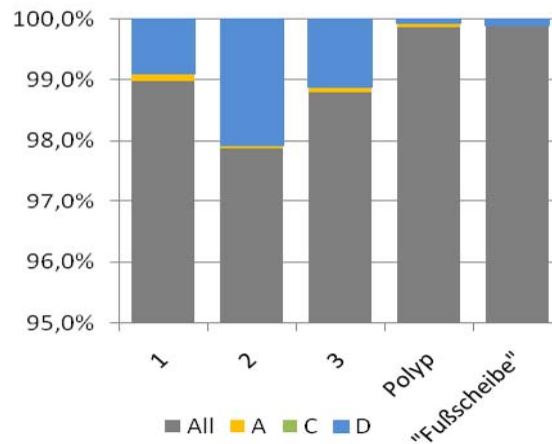


Abbildung 3.33: Verhältnis identifizierbarer *Symbiodinium* aus *Phyllodesmium briareum*.

Die Schnecken wurden normal gehältert (1), dann hungern gelassen (2) und anschließend auf *Erythropodium* sp. als Futterkorallen gesetzt (3). Ermittelt wurden die Anteile von Clade A, C und D per qPCR. Clade C in *P. briareum* zu Versuchsbeginn (1) nachweisbar.

Bei Analyse der Ct-Werte stellte sich heraus, dass die Hungertiere im Versuch deutlich höhere Ct-Werte aufweisen als die Proben der Tiere zu Versuchsbeginn. Da immer die gleiche Menge DNA (10 ng) eingesetzt wurde, spricht dies dafür, dass der Gehalt an Symbionten während der Hungerphase abgenommen hat. Nach Nahrungsaufnahme sinken die Ct-Werte aufgrund der zunehmenden Symbionten wieder ab, erreichen aber nicht das Niveau vor Versuchsbeginn. Vermutlich waren dazu die zwei Stunden der Nahrungsaufnahme nicht ausreichend.

Verhältnis *Symbiodinium* Clade A in *Phidiana indica* und deren Futterkoralle *Millepora* sp.

Da in den phylogenetischen Analysen bei der bisher als Symbionten-frei angesehenen Schnecke *Phidiana indica* das *Symbiodinium*-Clade A identifiziert wurde, sollte ermittelt werden, wie groß das Verhältnis der *Symbiodinium* Clade A-Symbionten in der Schnecke und in ihrem Futterorganismus *Millepora* ist.

Das Verhältnis des Symbionten *Symbiodinium* Clade A in *Phidiana indica* im Vergleich zur Futterkoralle *Millepora* sp. ist deutlich geringer, d.h. mehr Symbionten des Clade A sind nachweisbar in *Millepora* als in *Phidiana indica* (Abb. 3.34). Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass *Phidiana* nicht in der Lage ist, die Symbionten längerfristig zu speichern und einen Nutzen aus der Photosynthesefähigkeit der Symbionten zu ziehen.

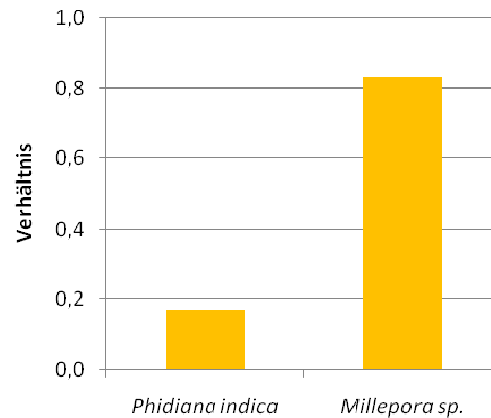


Abbildung 3.34: Verhältnis *Symbiodinium* Clade A in *Phidiana indica* und ihrer Futterkoralle *Millepora* sp..

Symbiodinium* Clade A und C aus *Pteraeolidia ianthina

In *Pteraeolidia ianthina* konnten Symbionten des Clades A und des Clades C nachgewiesen werden (Abb. 3.35). Die Symbionten des Clade A machen mit > 10 % einen großen Anteil der Symbionten in *Pteraeolidia ianthina* aus. Die Symbionten des Clade C sind mit unter 1 % kaum vorhanden, obwohl sie in den vorangegangenen Untersuchungen (Kapitel 3.4: Identifizierung der Symbionten mittels normaler PCR Methoden) hohe Abundanzen aufwiesen.

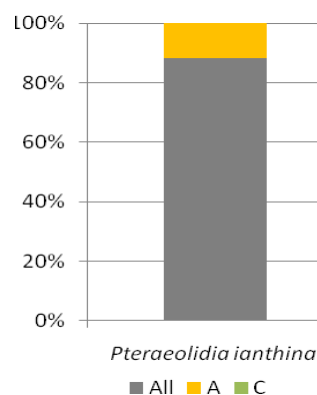


Abbildung 3.35: Verhältnis *Symbiodinium* Clade A und C in *Pteraeolidia ianthina*. All: alle *Symbiodinium* Clades minus Clade A und C. Clade C nachweisbar aber aufgrund der geringen Menge in der Grafik nicht zu erkennen

3.5.2 Zusammenfassung der Quantifizierung der Symbionten

- Spezifische Primer der plastidären LSU zur Erfassung von Symbiodinium aus Clade A, C und D konnten etabliert werden.
- Ein universelles, plastidäres LSU Primerpaar („All“) erfasst alle im Wirtsorganismus vorhandenen Symbionten. Dadurch können die Verhältnisse der einzelnen spezifisch erfassbaren Clades zueinander ermittelt werden.
- *Phyllodesmium briareum* behält in Hungerphasen mehr bekannte, identifizierbare Symbionten, während der Anteil der unbekanntes Symbionten sinkt.
- Die Nahrungsaufnahme beeinflusst die Zusammensetzung der Symbionten-Clades: Die Aufnahme hoher Anteile an nicht identifizierten Clades führt zur relativen Verringerung der identifizierten Clades.
- Von den erfassbaren Symbionten ist Clade D häufiger vertreten als Clade A.
- Clade C ist in den Schnecken und Korallen nur in geringem Maße nachweisbar.

4. Diskussion

Können Schnecken Photosynthese betreiben? Dies war die etwas herausfordernd formulierte Frage zu Beginn der Einleitung zu vorliegender Arbeit. Ja, wenn sie mit bestimmten Zooxanthellen/Organismen in Symbiose leben, können sie sich über ihre Symbionten von den Produkten der Photosynthese über gewisse Zeiträume ernähren. Wie die Fähigkeit, Photosynthese zu betreiben bei den Aeolidida (Nudibranchia, Nacktkiemer) in der Gattung *Phyllodesmium* verteilt ist, sollten die phylogenetischen Analysen zeigen. Ebenso sollte die Frage geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Lebensweise der Schnecken und der Etablierung der Zooxanthellen gibt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es also, die verwandtschaftlichen Verhältnisse innerhalb der Aeolidida anhand eines molekularen Datensatzes, bestehend aus drei verschiedenen Genen, aufzuschlüsseln. Durch Verwendung eines konkatenierten Datensatzes aus Sequenzen von zwei Genomen in den Schnecken, nämlich der kernkodierten kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU rDNA), der großen mitochondrialen ribosomalen Untereinheit (mtLSU rDNA) und dem proteinkodierenden Gen für die mitochondriale Cytochromoxidase I (COI), konnte eine in die Familien der Aeolidida aufgelöste Phylogenese rekonstruiert werden. Im Folgenden soll nun zunächst die ermittelte Phylogenese mit publizierten Daten aus molekularen und morphologischen Analysen verglichen werden, in einem späteren Abschnitt werden dann sowohl die Symbionten selbst, als auch die zwei untersuchten Symbiose-Systeme diskutiert.

4.1 Vergleich der Rekonstruktion der Phylogenese der Aeolidida (Gastropoda, Opisthobranchia, Nudibranchia, Cladobranchia) auf der Grundlage molekularer und morphologischer Daten

Die phylogenetische Rekonstruktion der Aeolidida anhand der Sequenzen des kombinierten Datensatzes führt auch mit verschiedenen Algorithmen und Evolutionsmodellen zu ähnlichen Topologien (Abb. 3.1.-3.3). Je nach angewandter Methode unterscheiden sich die Rekonstruktionen zwar im Grad ihrer Unterstützung, die Topologien sind jedoch nahezu identisch, mit Ausnahme der kaum aufgelösten Parsimonie-Analysen. Die Maximum-Likelihood- und die Bayesianische-Analysen liefern aufgrund der Modellierbarkeit der evolutionären Vorgänge auf Gattungs- und auch auf Spezies-Ebene aufgelöste terminale Taxa. Eine auffällige Polytomie ist nach Bayesianischer Analyse des kompletten Datensatzes in dem Genus *Phyllodesmium* zu verzeichnen, worauf in einem späteren Abschnitt noch einmal eingegangen werden soll.

Die Aeolidida sind eine morphologisch sehr heterogene Gruppe, was ihre systematische Einordnung aufgrund der Merkmalsvielfalt erschwert. Obwohl in vorliegender Arbeit aufgrund der vorher ermittelten Sequenzeigenschaften der Innengruppe nur drei Außengruppenvertreter gewählt wurden, können die Aeolidida über die Analyse dreier konkatenierter Gene als gut unterstütztes Monophylum identifiziert werden. Ein weiterer Grund für die Beschränkung auf drei Taxa lag darin, dass jeweils drei Gene für die Analyse zur Verfügung stehen mussten.

Bisher sind nur sehr wenige Analysen publiziert worden, die sich mit der Phylogenese der Aeolidida sowie mit der Aufklärung der Verwandtschaft zwischen den Gattungen und Arten befassen. In früheren Arbeiten wurden ausschließlich die Verwandtschaftsbeziehungen auf höherer Taxonebene oder auf Familienebene (je eine analysierte Familie) untersucht (Gosliner & Kuziriam 1990; Gosliner & Willan 1991; Tholessen 1999; Wollscheid & Wägele 1999; Wollscheid-Lengeling et al. 2001; Grande et al. 2002; 2004 a; b; Wägele et al. 2003; Faucci et al. 2007; Gosliner et al. 2007; Ortiz & Gosliner 2008; Moore & Gosliner 2009; Pola & Gosliner 2010).

Wollscheid & Wägele (1999) untersuchten die Nudibranchia, zu denen auch die Aeolidida gehören, in einer single-gene-Analyse. Anhand der SSU rDNA wurde ein Datensatz von 53 Taxa analysiert, wovon drei Spezies zu den Aeolidida gehören (*Eubranchus* sp., *Eubranchus exiguus*, *Flabellina pedata*). Die Analysen stützen zwar die Monophylie der Nudibranchia, Dorodoidea, Cladobranchia und das Monophylum Aeolidida, lieferten aber aufgrund des geringen Taxonsamplings weder Aufschluss über die Verwandtschaften innerhalb der Aeolidida, noch innerhalb der Familien.

In einer Phylogenie der den Nudibranchia untergeordneten Cladobranchia (Pola & Gosliner 2010) anhand von konkatenierten Histon-3-, COI- und 16 S-Sequenzen sind unter den 95 Taxa sechs Aeolidida enthalten (*Piseinotecus* sp., *Favorinus elenexarum*, *Sakuraeolis enosimensis*, *Babakina indopacifica*, *Godiva quadricolor*, *Phyllodesmium horridum*). Alle sechs Arten gehören unterschiedlichen Gattungen an, jedoch nur drei unterschiedlichen Familien. *Babakina indopacifica*, *Phyllodesmium horridum*, und *Sakuraeolis enosimensis* sind Facelinidae, *Favorinus elenexarum* und *Godiva quadricolor* gehören zu den Favorinidae, *Piseinotecus* sp. gehört zur gleichnamigen Familie Piseinotecidae Edmunds, 1970. Zu den nicht untersuchten Familien zählen die Aeolidiidae, Eubranchidae, Embletoniidae, Fionidae, Flabellinidae, Notaeolidiidae, Glaucidae und Tergipedidae, so dass die Daten auf der Ebene der Familien hier nicht umfassend verglichen werden können. Bisher liegen also keine umfassenden molekularen Analysen zu den Aeolidida vor.

In einer phylogenetischen Analyse der Nudibranchia konnten Wägele & Willan (2000) unter Betrachtung von über 100 Charakteristika und Verwendung von 47 morphologischen, anatomischen und histologischen Merkmalen in manchen Stammbaumrekonstruktionen ebenfalls eine Monophylie für die Aeolidida (dort Aeolidoidea) darstellen. Wenn keine Wichtung der einzelnen Merkmale erfolgte, entspringen die Aeolidida zwar einer Entwicklungslinie, schließen aber *Doto* als Vertreter der Dendronotoidea mit ein. *Doto* erscheint auch in anderen Analysen nicht bei den Dendronotoidea (Thollesson 1999), eine Zugehörigkeit zu den Aeolidida erscheint jedoch als Artefakt.

Morphologisch begründet ist die Monophylie der Aeolidida auf den Synapomorphien „Cnidosack vorhanden“ (welcher in der Gattung *Phyllodesmium* funktionell reduziert wurde, hier ist er noch vorhanden, enthält aber keine Cniden mehr) und „Umbau des oralen Velums in orale Tentakel“ (Wägele & Willan 2000). Wägele & Willan (2000) vermuteten, dass die Auflösung der Aeolidida durch Hinzunahme mehrerer Vertreter aus verschiedenen Familien der Aeolidida verbessert werden könnte.

In vorliegender Arbeit wurden daher mehr als 170 neue Sequenzen und 60 Sequenzen der Aeolidida aus Datenbanken in die Analyse eingeschlossen. Dadurch konnte sowohl eine gute Unterstützung der Aeolidida, als auch eine Auflösung in die Familien innerhalb der Aeolidida erzeugt werden.

Bis auf die Parsimonie-Analyse, bei der wegen der fehlenden Möglichkeit, die evolutionären Schritte zu modellieren, was gerade bei Sättigungsraten angezeigt wäre, oftmals Polytomien entstehen, konnten alle anderen Methoden die Familien der Aeolidida identifizieren. In der Maximum-Likelihood- und der Bayesianischen-Analyse werden die Aeolidiidae sowie die Tergipedidae mit guter bis sehr guter Unterstützung als Monophyla dargestellt. Alle anderen Familien innerhalb der Aeolidida sind paraphyletisch. Die Rekonstruktion der Phylogenie lasst eine große monophyletische Gruppe GA erkennen, die die Familien Aeolidiidae, Facelinidae, Favorinidae und Glaucidae beinhaltet. Die in den Stammbäumen der Einfachheit halber als Gruppe 2 zusammengefassten Taxa stehen basal und beinhalten die Embletoniidae, Flabellinidae, Eubbranchidae, Tergipedidae und Notaeolidiidae. Im Folgenden sollen die hier identifizierten Clades mit den Ergebnissen anderer Analysen verglichen werden.

Notaeolidia depressa, welche zu den ursprünglichen Aeolidida, den Notaeolidiidae zählt, bildet auch in dieser Analyse gemeinsam mit den Embletoniidae die Basis der Aeolidida-Gruppe 2. Die Ergebnisse der morphologischen Analysen (Wägele & Willan 2000, Wägele 2004), in denen *Notaeolidia* aufgrund der Autapomorphie „Vorhandensein eines Cnidosackes“ zu den Aeolidida gestellt wird, decken sich mit vorliegender molekularer

Analyse. Wägele und Willan (2000) positionieren Notaeolidida aufgrund verschiedener basaler Merkmale, wie besonderer zentraler Zähne an der Radula („rachidian“), an der Basis der Aeolidida.

Die **Embletoniidae** teilen sich viele Sequenzeigenschaften der SSU rDNA, mtLSU rDNA und COI mit der ebenfalls basal stehenden *Notaeolidia depressa*. Obwohl es Forderungen aufgrund von morphologischen Analysen gibt die Embletoniidae zu den Tergipedidae zu stellen (Baba 1959; Schmekel & Portmann 1982; Rudman 2002), scheinen sie in dieser Analyse eindeutig an der Basis der Aeolidida zu stehen, wenn auch mit sehr langen Ästen. Diese Position wird ebenfalls durch die mit hoher Unterstützung identifizierten Splits in den Maximum-Likelihood- und Bayesianischen-Analysen bestätigt. Dieses Ergebnis ist mit der Analyse von Miller & Willan (1992) zwar deckungsgleich, Miller & Willan vermuteten jedoch, dass die Embletoniidae aufgrund ihres Velums und des Fehlens für Aeolidida typischer Cnidosäcke eher zu den Dendronotacea gehören, als zu den Tergipedidae. In einer morphologischen Analyse der Cnidosäcke stellten Martin et al. (2010) fest, dass die Cnidosack-ähnlichen Strukturen von *Embletonia* sp. evolutiv früheren Entwicklungsstadien entsprechen. Nach ihren Ergebnissen müssten die Embletoniidae aus morphologischer Sicht den basalen Dendronotacea zugeordnet werden. Eine basale Position innerhalb der Aeolidida kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Martin et al. 2010). Leider ist in einer kürzlich publizierten Analyse der Cladobranchia (Pola & Gosliner 2010) das Taxon Embletoniidae nicht vorhanden, so dass eine erneute Analyse der Cladobranchia zwingend notwendig wäre, um die Position der Embletoniidae zu klären.

Der nächste Verwandte, der nahe der Basis erscheint, ist *Flabellina babai*. Wie bei Betrachtung der Stammbäume deutlich wird, sind die **Flabellinidae** paraphyletisch dargestellt, was sich mit morphologischen Analysen (Wägele & Willan 2000) und einer molekularen Analysen mit der SSU rDNA deckt (Wollscheid-Lengeling et al. 2001). Allerdings lag auch hier der Fokus der Analysen in der Aufklärung der Phylogenie der Nudibranchia, so dass nur wenige Aeolidida in die Analysen eingeschlossen waren. Gosliner (1990) und Gosliner & Willan (1991) konnten über eine Analyse von morphologischen Daten monophyletische Gruppierungen innerhalb der Flabellinidae identifizieren. Jedoch enthielt keine der Analysen andere Taxa der Aeolidida, so dass die Monophylie nicht auf genügend Daten begründet ist. Wenn nur eine Familie mit wenigen Vertretern im Datensatz vorhanden ist, wird eine Monophylie wahrscheinlicher als die Daten es tatsächlich mit umfangreicherem Taxonsampling hervorbrächten (Philippe 2000; Philippe et al. 2004; Nylander 2001; Hillis et al. 2003).

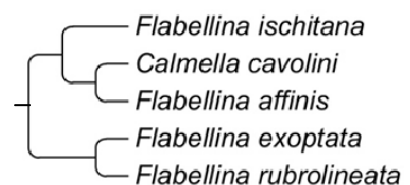


Abbildung 4.1: Flabellinidae aus der Bayesianischen-Analyse.

Monophyletische Gruppierungen der Flabellinidae sind auch in vorliegender Analyse mit umfangreichem Taxonsampling identifiziert worden. So bildet eine Untergruppe der Flabellinidae (Abb.4.1) hier ein gut gestütztes Monophylum in nächster Nähe zu der nicht aufgelösten *Flabellina verrucosa* innerhalb der Gruppe 2.

Viele Flabellinidae weisen überwiegend plesiomorph morphologische und molekulare Merkmale in Bezug auf die übrigen Aeolidida auf (Wollscheid-Lengeling et al. 2001). Andere haben wiederum hoch abgeleitete Merkmale (Gosliner & Kuzirian 1990; Gosliner & Willan 1991). Es wird vermutet, dass die Flabellinidae Ursprung vieler Gruppierungen der Aeolidida sind (Wägele & Willan 2000), d. h. sich Spezifikationsereignisse von hier aus in verschiedene Linien (Familien) ereigneten. Die aufgrund von morphologischen (Gosliner & Kuzirian 1990) und molekularen (Wollscheid-Lengeling et al. 2001) Daten vermutete basale Stellung von *Flabellina verrucosa* kann hier nicht bestätigt werden, wengleich sie sich auch hier nicht in einem Schwestergruppenverhältnis zu einem anderen Taxon befindet. In einer ebenfalls auf morphologischen Daten basierenden Analyse (Gosliner et al. 2007) wurde die Stellung der im Mittelmeer endemischen Spezies *Calmella cavolini* analysiert. Sie bildet dort eine Gruppe mit *Flabellina affinis*, *Flabellina ischitana* und *Piseinotecus gaditanus*. Als ausschlaggebende Merkmale dieser Gruppe identifizierten Gosliner et al. (2007) die vom Pedunculus entspringenden, hervorgehobenen Cerata und eine verengte Penialpapille. Auch nach vorliegender Arbeit gruppiert *C. cavolini* sehr gut unterstützt mit den *Flabellina*-Arten zusammen.

Die Monophylie der **Tergipedidae** wurde in einer morphologischen Analyse von Brown (1980) begründet (*Cuthona* Alder und Hancock, 1855; *Tergipes* Cuvier, 1805; *Tenellia* Costa, 1866; *Phestilla* Bergh, 1874). Sie werden unter anderem am Bau ihrer Radula, Rhinophoren und Labialtentakel differenziert. In den vorliegenden Analysen bilden sie neben den Aeoliidiidae ein weiteres Monophylum auf Familienebene. Die Gattungen *Phestilla* und *Tergipes* bilden innerhalb der Tergipedidae jeweils Monophyla, die drei Spezies von *Cuthona* sind paraphyletisch. Faucci et al. (2007) untersuchten die Gattung *Phestilla* und wählten als Außengruppe verschiedene Aeolidida nach den Ergebnissen von Wollscheid-Lengeling et al. (2001). In der nicht vollständig dichotom aufgelösten Phylogenie ist *Eubbranchus exiguus* nah verwandt mit *Phestilla*. Leider enthielt deren Analyse kein Taxon von *Cuthona* und auch keines von *Tergipes*. Die Schwestergruppe der Tergipedidae ist die Gruppe mit den Eubbranchidae und *Facelinopsis marioni*.

Die Systematik und Nomenklatur der Tergipedidae ist Bestandteil kontroverser Diskussionen (Miller 1977; 2004; Williams & Gosliner 1979; Gosliner 1981). Mit *Tergipes antarcticus* ist auch in dieser Gruppe ein höchst spezialisiertes Tier zu finden. Es ist ausschließlich aus dem antarktischen Eis bekannt und lebt dort in kleinsten Eislücken. Erwähnenswert ist es

u. a., da es zum jetzigen Zeitpunkt keine bekannten Futterquellen von dort gibt. Cnidaria, welche die Hauptnahrungsquelle der Aeolidida bilden, sind bisher nicht aus dem antarktischen Eis bekannt (Kiko et al. 2008). Die Abwesenheit von Cnidariosäcken lässt vermuten, dass sich *Tergipes antarcticus* nicht von Cnidaria ernährt. Es wäre möglich, dass als Futterquelle pelagische Algen dienen (Kiko et al. 2008). Die beiden *Tergipes*-Arten sind in allen Rekonstruktionen als Schwestertaxa mit sehr guter Unterstützung zu finden.

Auch mit sehr guter Unterstützung ist eine weitere große Abstammungsgemeinschaft innerhalb der Aeolidida zu identifizieren. Wie bereits erwähnt, wird diese Gruppe aus Gründen der Übersichtlichkeit Gruppe GA genannt. Ihr langer Ast (in den Stammbäumen verkürzt dargestellt) weist auf einen großen evolutionären Abstand zur basalen, paraphyletischen Gruppe 2 hin und somit entweder auf ein lang zurückliegendes Spezifikationsereignis mit dann anschließender Radiation, oder auf generell hohe Evolutionsraten mit vielen Substitutionen. Im Folgenden sollen nun zunächst die Familien der Taxa aus Gruppe GA diskutiert werden. Im Anschluss werden dann die Sequenzeigenschaften, die auch die evolutionären Raten enthalten, diskutiert.

Die Familie **Aeolidiidae** bildet in den Bayesianischen- und Maximum-Likelihood-Analysen ein gestütztes Monophylum, welches sich morphologisch durch die kammförmige Rachis auszeichnet. Schmekel & Portmann (1982) führten die Unterfamilien Aeolidiinae mit *Aeolidiella* als Gattung und die Unterfamilie Spurillinae mit den Gattungen *Spurilla*, *Berghia* und *Limenandra* ein. Bei den Aeolidiinae handelt es sich um meist breite Arten mit häufig glatten Rhinophoren, sowie Cerata, die äußerlich in vielen parallelen Reihen inserieren. Die Spurillinae zeichnen sich oft durch einen schmalen Körper und lamellierte, häufig Tuberkeltragende Rhinophoren aus (Schmekel & Portmann 1982). Eine Aufspaltung in diese zwei Unterfamilien konnte in vorliegender Analyse nicht beobachtet werden.

Je nach Analyseverfahren unterscheiden sich die Stellungen der Taxa innerhalb der Aeolidiidae so stark, dass eine Einordnung in Unterfamilien nicht möglich ist. Dieses hat vermutlich seinen Grund in der großen Diversität des Taxons, so dass eine gesonderte Analyse mit größerem Taxonsampling auf der Ebene der Familie durchgeführt werden müsste. Dadurch könnten aus der SSU rDNA durch eine Zunahme der homologisierbaren Nukleotidpositionen wahrscheinlich weitere Informationen gewonnen werden, die zur Rekonstruktion der Phylogenie dieser Familie beitragen können.

Betrachtet man die morphologischen Merkmale der Aeolidiidae sowie der Favorinidae so kann man erkennen, dass beide eine uniseriate Radula sowie einen cleioprocten Anus besitzen (Vietti & Boero 1989; Gosliner et al. 2007). Untersucht man die weiteren noch zu diskutierenden Taxa der Gruppe GA, so stellt man fest, dass alle eine ausschließlich

uniseriate Radula aufweisen. In Gruppe 2 hingegen kommen sowohl uniseriate, triseriate als auch multiseriate (nur bei *Notaeolidia depressa*) Radulae vor. Bei den Flabellinidae sind nur tri- oder uniseriate Radulae beschrieben worden (Vietti & Boero 1989; Schmekel & Portmann 1982). Offensichtlich sind triseriate und multiseriate Formen in Gruppe GA reduziert worden. Die beiden Merkmale cleioprocter Anus und uniseriate Radula unterscheiden also die molekular identifizierte Gruppe GA auch auf morphologischer Ebene von der bereits beschriebenen Gruppe 2, allerdings treten diese Merkmale auch bei Vertretern der paraphyletischen Gruppe 2 auf.

Die **Facelinidae** gelten bereits bei Willan (1987) als abgeleitetes Taxon und machen in dieser Analyse einen Großteil der Tiere in Gruppe GA aus. Auch im natürlichen System stellen die Facelinidae mit über 40 beschriebenen Gattungen das größte Taxon der Aeolidida dar.

In den Baumrekonstruktionen sind die Facelinidae als polyphyletisch zu bewerten, da *Phyllodesmium* nicht mit den übrigen Vertretern dieser Familie gruppiert. Weil die Phylogenie von *Phyllodesmium* im Hinblick auf die Evolution der Symbiose mit *Symbiodinium* von besonderem Interesse für diese Arbeit ist, wurden weitergehende Analysen des Taxons auf Gattungsebene durchgeführt. Diese werden an späterer Stelle besprochen (4.3). Die Facelinidae (ex. *Phyllodesmium*) gruppieren in der Maximum-Likelihood-Analyse mit den Favorinidae und Glaucidae. In der Bayesianischen-Analyse stehen sie ebenfalls mit unklarer Verwandtschaft nahe den Glaucidae und Favorinidae. Hier würde ein ausgewogeneres Sampling der Taxa aus dem Monophylum GA und der Ausschluss der Gruppe 2 sowie stark abweichender Sequenzen eventuell dazu führen, dass aufgrund besserer Homologisierbarkeit mehr Informationen in die Analyse einfließen, und somit die Auflösung verbessert werden könnte (Busse & Preisfeld 2002).

Die pelagisch lebenden Aeolidida sind in zwei Gruppen wieder zu finden. Eine davon sind die **Glaucidae**, welche mit *Glaucus atlanticus* (einem der beiden beschriebenen Taxa) in der Analyse enthalten ist. *Glaucus* ist freischwimmend und ernährt sich von den als Staatsqualen (Hydrozoa) bezeichneten Siphonophora (Miller 1974; Edmunds 1975; Gosliner 1987). Valdes & Campillo (2004) postulierten aufgrund besonderer Merkmale an den Penialdrüsen (Penis-Anhangsdrüsen) und an einer als Basaldorn oder auch Penisstilet bezeichneten penialen Struktur eine nahe Verwandtschaft zu den Tergipedidae. Gleichzeitig sind die Autoren jedoch der Ansicht, dass es auf Grundlage der morphologischen Daten nicht zweifelsfrei möglich ist, die Gattung *Glaucus* systematisch zuzuordnen. Die Ergebnisse der hier erstellten phylogenetischen Analysen können dieses nicht bestätigen, vielmehr stimmen sie mit den Vermutungen anderer Autoren überein, die eine nähere Verwandtschaft

der Gattung *Glaucus* mit den Facelinidae befürworten (MacNae 1954a; Miller 1974). Das analysierte Taxon *Glaucus atlanticus* steht in jeder Analyse in der gut gestützten Gruppe GA gemeinsam mit den Facelinidae und Favorinidae.

Miller (1974) schloss *Glaucus* und *Glaucilla* trotz bestehender morphologischer Unterschiede in die Unterfamilie Glaucinae ein. Diese wiederum fasste er mit den Unterfamilien Babakininae Roller, 1973, Facelininae Bergh, 1889, Favorininae Bergh, 1889, Pteraeolidiinae Risbec, 1953, Crateninae Bergh, 1889, und Herviellinae Burn, 1967, zu der Familie Glaucidae Gray, 1827 zusammen. Die Einteilung wird seitdem mangels anderer Möglichkeiten zwar vielfach übernommen, es wird aber auch eine Revision dieses Taxons gefordert (Schmekel & Portmann 1982). Auf Grundlage der phylogenetischen Rekonstruktionen dieser Arbeit muss der Zusammenschluss ebenfalls bezweifelt werden. Die Glaucidae nach Miller (1974) bilden hier ein Paraphylum aus dem die monophyletischen Aeolidiidae entspringen. Es erscheint also naheliegender, die Glaucidae als eigenständige Familie zu erhalten.

Die aufgrund des molekularen Datensatzes rekonstruierten Phylogenien führen also zu einem gut unterstützten Monophylum Gruppe GA, deren Topologien sich zumeist sehr gut mit morphologischen Autapomorphien begründen lassen. Im Folgenden werden die Sequenzeigenschaften der Datensätze, vornehmlich der SSU rDNA, betrachtet in denen sich ebenfalls Autapomorphien feststellen ließen.

4.2 Sequenzeigenschaften der Aeolidida

Evidenzen für eine Aufspaltung der Aeolidida in (mindestens) zwei Großgruppen

Neben den Hypothesen der phylogenetischen Analysen lassen sich auf Sequenzebene weitere Merkmale für eine Aufspaltung der Aeolidida in zwei Gruppen (ein Monophylum, ein Paraphylum) finden. Evolutionär betrachtet aussagekräftige Merkmale sind divergierende Evolutionsgeschwindigkeiten und Basenzusammensetzungen. Ein weiteres Merkmal stellen die Expansionssegmente der SSU rDNA dar.

Evolutionsraten und Basenzusammensetzung

Die Analysen des Datensatzes ergaben im Relative-rate Test, dass die SSU rDNA der monophyletischen Gruppe GA (Aeolidiidae, Favorinidae, Facelinidae und Glaucidae) eine signifikant höhere Substitutionsrate als die Taxa der paraphyletischen Gruppe 2 (Flabellinidae, Tergipedidae, Eubbranchidae, Embletoniidae und der Notaeolidiidae) aufweist ($Z=11.6$). Molekulare Analysen der Nudipleura (ein übergeordnetes Taxon der Nudibranchia) in denen einige Aeolidida vertreten waren, deuten ebenfalls schon auf heterogene Evolutionsraten und Basenzusammensetzungen für die SSU rDNA und 28S rDNA hin

(Klussmann-Kolb et al. 2008). Der Trend zu höheren Evolutionsraten, höherer Substitutionssättigung sowie einer ungleichen Veränderung des GC-Gehaltes kann somit bereits auf der Ebene der Nudipleura (Nudibranchia und Pleurobrancoidea) gefunden werden. Dieser Trend setzt sich dann in den hier untersuchten Aeolidida noch verstärkt fort und führt zu sehr hohen GC-Gehalten und Substitutionsraten. Generell gelten die Nudipleura aufgrund zahlreicher morphologischer Sondermerkmale als hoch abgeleitetes Taxon (Wägele & Willan 2000; Wägele et al. 2003; Vonnemann et al. 2005). Dieses scheint sich molekular bei den Aeolidida zu verstärken.

Im Detail zeigen die Analysen der Basenzusammensetzungen für die SSU rDNA einen erhöhten GC-Gehalt von durchschnittlich über 60 % Wollscheid-Lengeling et al. (2001) schreiben von leicht erhöhten GC-Werte der Nudibranchia, während Vonnemann et al. (2005) ein Ansteigen des GC-Gehalts von den Acteonoidea (53,2 %), den Pleurobrancoidea (56,3 %) zu den Nudibranchia beschreiben. Innerhalb der Nudibranchia konnten sie bei den Anthobranchia einen GC-Gehalt von 57,6 % und bei den Cladobranchia eine GC-Gehalt von 61,6 % ermitteln. Dieses Ergebnis ist deckungsgleich mit den GC-Gehalten der in dieser Arbeit verwendeten Außengruppen-Taxa, welche zu den Chromodorididae (Anthobranchia) und den Bathydoridoidea (Anthobranchia) gehören (Abb. 3.5). Das lässt vermuten, dass in der Entwicklung zu den Nudibranchia der eindeutige Trend zum Anstieg des GC-Gehaltes besteht.

Dass sich in dieser ersten umfassenden Analyse der Aeolidida nicht alle Taxa gut rekonstruieren lassen, wird u. a. auch an den stark variierenden GC-Gehalten der größeren Clades im Datensatz liegen. Da die Gruppe GA höhere und die Gruppe 2 zumeist niedrigere Werte aufweist, kann die Rekonstruktion der Phylogenese davon beeinträchtigt worden sein (Tarrío et al. 2000). Dieses trifft besonders auf die strittigeren Fälle zu, die auch morphologisch schwer zu begründen sind, wie *Flabellina babai* (61,11 %) und *Flabellina verrucosa* (60,97 %).

Der evolutionär auf die SSU rDNA wirkende Druck in den Aeolidida scheint entweder stärker zu werden und zu einer zunehmenden Veränderung sowohl in der Basenzusammensetzung als auch in den Substitutionsraten zu führen, oder aber einer geringeren Kontrolle durch Reparaturmechanismen zu unterliegen. Die steigenden GC-Gehalte der SSU rDNA bei den Aeolidida können ein Hinweis auf einen sich verändernden evolutionären Trend im Kerngenom sein (Albu et al. 2009). Man könnte spekulieren, dass bei den Taxa, bei denen sich die Umweltbedingungen ändern und bei denen evtl. auf neue Nahrungsquellen umgestellt werden musste, ein Trend zur Vermehrung des GC-Gehaltes bestehen könnte. Das würde darauf hindeuten, dass diese Taxa entweder einen Vorteil mit höherem GC-Gehalt besitzen, oder aber dass die regulatorische Kontrolle kleiner geworden ist und

Vorgänge wie „replication slippage“ oder Basenaustausche nicht korrigiert werden. Dieses kann der Fall sein, wenn es sich um für die Reaktion des Genproduktes (in diesem Fall die Ribozym-Funktion) nicht benötigter Genabschnitte handelt (Tautz et al. 1988; Viguera et al. 2001; Albu et al. 2009). Ein möglicher Vorteil bei vermehrtem GC-Gehalt wird von Bernadi und Bernadi (1986) sowie Bastin et al. (2000) diskutiert: Der höhere GC-Gehalt wird dort als Anpassung an veränderte Umweltbedingungen interpretiert, aufgrund dessen die Organismen höhere Temperaturen tolerieren können. Dieses konnten Talke und Preisfeld (2002) an den Genen für die innerhalb der Geißeln liegenden Paraxonemalstäbe in den Euglenozoa demonstrieren. Die parasitisch lebenden Kinetoplastida müssen sehr viel höhere Temperaturen tolerieren können als die übrigen nicht-parasitären Euglenozoa und zeigen deutlich erhöhte GC-Gehalte in den Paraxonemalstab-Genen *par 1* und *par 2*.

Die ebenfalls untersuchten Basenzusammensetzungen der mtLSU rDNA sowie der COI zeigen einen offensichtlich Genom-bedingten erhöhten AT-Gehalt (Boore & Brown 1994; Hatzoglou et al. 1995; Foster et al. 1997; Kurabayashi & Ueshima 2000; Grande et al. 2002), jedoch keine auffälligen Unterschiede zwischen den Taxa.

Sequenzlängen und Sekundärstruktur der SSU rDNA

Das zweite bedeutende molekulare Merkmal, in dem sich die beiden Gruppen GA und die paraphyletische Gruppe 2 deutlich voneinander unterscheiden, sind die Längen der SSU rDNA Sequenzen. Die Analyse der Aeolidida hat signifikant längere Sequenzen in Gruppe GA ergeben. Mit deutlich über 1900 Basenpaaren sind die Sequenzen länger als bei den typischen Eukaryoten, welche Sequenzlängen von 1800-1900 bp besitzen (Gunderson & Sogin 1986). Wollscheid et al. (2005) konnten ebenfalls längere Sequenzen für die Pleurobrancoidea, aber kürzere für die Sacoglossa Anaspidea, Pulmonata, Cephalaspidea und Acochlidia (<1800 bp) finden. Auf Ebene der Primärstruktur der rRNA wechseln sich evolutionär stark konservierte mit eher variablen Bereichen ab (Ware et al. 1983). Die variablen Bereiche sind nicht nur Orte einer erhöhten Substitutionsrate, sondern auch besonders anfällig für Insertions- und Deletionsereignisse, wie z. B. die variablen Regionen V4 und V7. Aus diesem Grund findet man in diesen Regionen auch in anderen – abgeleiteten – Eukaryoten ausgeprägte Längenunterschiede (Busse & Preisfeld 2002a). Durch intensive Untersuchung der Sequenzlängen anhand der Sekundärstruktur der SSU rRNA konnte gezeigt werden, dass die Längenzunahme hauptsächlich in den variablen Regionen der kleinen ribosomalen Untereinheit stattfindet. Die Analyse dieser so genannten Expansionssegmente in den variablen Bereichen V4 und V7 hat signifikant längere Sequenzen in Gruppe GA im Vergleich zur Gruppe 2 ergeben. Im Vergleich zur

Außengruppe sind aber auch schon die Sequenzen von Gruppe 2 signifikant länger. Dieses deutet ebenso wie die Zunahme des GC-Gehaltes auf eine mehr oder weniger Taxon-übergreifende „Verlängerung“ der SSU rDNA im Laufe der Evolution hin.

Verlängerte Expansionssegmente trifft man auch bei Organismen aus phylogenetisch weit entfernt verwandten Taxa an, wie beispielsweise den Insecta (Chalwatzki et al. 1995), den Crustacea (Crease & Colbourne 1998; Dryer & Wägele 2001), Cestoda (Picon et al. 1996), den Pelobionta (Hinkle et al. 1994), den Foraminifera (Pawlowski et al. 1999) oder den Euglenozoa (Busse & Preisfeld 2002a). Dabei sind keineswegs alle Arten der genannten Taxa von einer Längenzunahme der SSU rDNA betroffen. Nicht in jedem Fall konnte, wie in dieser Arbeit, ein Zusammenhang zwischen Sequenzlängen und den evolutionären Beziehungen der Taxa nachgewiesen werden (Gutell 1993; Hinkle et al. 1994; Wuyts et al. 2001). Mehrere Untersuchungen zeigen jedoch die Korrelation der Phylogenese mit den Sequenzlängen der SSU rDNA auf. Beispielsweise konnten Nunn et al. (1996) die Korrelation der Länge von der LSU-Spezies D3 mit der Phylogenese der Isopoda beschreiben. Die Evolution verschiedener Sekundär-Strukturelemente der SSU rRNA konnten Hwang et al. (2000) anhand der Insektenphylogenie erklären. Ähnliche Ergebnisse von Gemeinsamkeiten auf der Ebene der Sekundärstrukturen, nicht aber zwangsläufig in der Primärstruktur der Nukleotide, sind auch aus anderen Arbeiten bekannt (Hinkle et al. 1994; Vogler et al. 1997; Choe et al. 1999; Billoud et al. 2000; Caetano-Anolles 2002a, b; Busse & Preisfeld 2002b; Voigt et al. 2008; Mastra 2010). Interessant ist, dass diese Expansionssegmente vertikal vererbt werden, auch wenn dieses aufgrund des energetischen Aufwandes vermehrt Nukleotide auszubilden nicht parsimonisch erscheint. Es kann natürlich möglich sein, dass sich in diesen Segmenten ein noch nicht aufgeklärter Vorteil, z. B. ein Schutzmechanismus für die „core regions“ durch eine größere Hülle verbirgt.

Die so genannten variablen Regionen der SSU rRNA sind auf der Ebene der Primärstruktur nicht für phylogenetische Analysen innerhalb der Aeolidida geeignet. Da die variablen Bereiche nicht direkt an den ribosomalen Funktionen beteiligt sind, kann eine höhere molekulare Evolutionsrate toleriert werden. Aufgrund der dann nicht eindeutigen Primärstruktur und der hohen Variabilität der Sequenzen ist eine eindeutige Alinierung dieser Bereiche nicht möglich. Dennoch lässt sich das Phänomen der Längenexpansion der SSU rRNA mit den Hypothesen zur Phylogenese in Einklang bringen: So konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Längenzunahme mit der Entstehung der Gruppe GA Taxa verbunden ist. Gruppe GA weist mit durchschnittlich 2009 bp, 101 bp mehr auf als die paraphyletisch, basale Gruppe 2 mit durchschnittlich 1908 bp und 185 bp mehr als die Außengruppe mit durchschnittlich 1824 bp.

Teilweise rühren die ungewöhnlich langen Sequenzen der SSU rDNA von Introns (Gruppe I Introns) her, die in der reifen rRNA fehlen (DeWachter et al. 1992; Wilcox et al. 1992; Bhattacharya et al. 1994; Busse & Preisfeld 2003). Nach der Transkription werden sie aus dem Molekül durch Spleißen entfernt. Jedoch liefern Introns nicht immer die Erklärung der längeren Sequenzen. Weist die reife SSU rRNA eine identische Länge zur SSU rDNA auf, so können keine Introns für die Längenzunahme verantwortlich gemacht werden (Hinkle et al. 1994; Crease & Colbourne 1998; Choe et al. 1999). In diesen Fällen sind die zusätzlichen Nukleotide auch in der rRNA als Expansionssegment vorhanden (Busse & Preisfeld 2002a, b, 2003). Für die Aeolidida könnte eine Überprüfung von Introns in der SSU rDNA und ihre vertikale Verbreitung hilfreiche Informationen zur Rekonstruktion der Phylogenese geben.

Die Rekonstruktion der SSU rRNA-Sekundärstruktur des Expansionssegmentes der variablen Region 7 deckte weitere molekulare Merkmale für die Gruppe GA und die restlichen Aeolidida auf. Wie schon angesprochen, zeigt sich ein „Trend“ zu längeren SSU rDNA Sequenzen. Dieser ist auch im Expansionssegment V7 zu beobachten. Die Außengruppe besitzt an bezeichneter Stelle zwei kleinere Loops, die Aeolidida der paraphyletischen Gruppe 2 haben einen der beiden Loops vergrößert und in Gruppe GA hat sich an genau dieser Stelle ein größerer Loop sowie ein neuer Stem (Basenpaarung) mit anschließendem Loop entwickelt, der kleine Loop davor wurde jedoch reduziert. Es ist möglich, dass sich hier eine Sekundärstruktur entwickelt hat, mit der sich das Molekül stabilisieren kann, indem die Loops ineinander greifen (Woese et al. 1990).

4.3 Rekonstruktion der Phylogenese des Genus *Phyllodesmium*

Die Gattung *Phyllodesmium* zeigt eine große Bandbreite im Grad der morphologischen Anpassung an eine symbiotische Beziehung mit den Zooxanthellen. Bei Formen ohne Zooxanthellen sind die Ausläufer der Mitteldarmdrüse in den Cerata unverzweigt (Rudman 1991, z. B. *Phyllodesmium horridum*, *P. opalescens*, s. u.). Bei mit Symbionten vergesellschafteten Arten sind sie zur Oberflächenvergrößerung in unterschiedlichem Maße verzweigt. Mit steigender Effizienz der Symbiose werden die Cerata zunehmend abgeflacht, vermutlich um eine bessere Lichtexposition der Algen zu erzielen. Auch eine Größenzunahme der Cerata und der allgemeinen Körpergröße ist zu beobachten (Rudman 1981b, 1991). Die von Rudman (1991) vorgestellte Phylogenie von *Phyllodesmium* basiert auf dem oben beschriebenen Grad der Anpassung an eine Symbiose mit den Zooxanthellen und enthält 12 Arten. Die Arten ohne Symbiosepartner werden als basale Taxa angesehen (*Phyllodesmium horridum*, *P. poindimiei*, *P. opalescens*, *P. serratum*, z. B. Rudman 1991). Davon ausgehend haben sich die Mitglieder der Gattung in zwei Linien entwickelt (Rudman 1991). Die Tiere der einen Linie (*Phyllodesmium crypticum*, *P. pecten*, *P. hyalinum* Rudman

1991) ernähren sich von verschiedenen Arten der Xeniididae und sind nur für kurze Zeit in der Lage, ihre Symbionten zu speichern, stattdessen werden sie offensichtlich verdaut. Die Tiere der anderen Linie (*Phyllodesmium macphersonae*, *P. briareum*, *P. colemani*, *P. magnum*, *P. longicirrum*) gehen eine „stabilere“ Symbiose mit den Dinoflagellaten ein und sind in der Lage, diese auch langfristig zu speichern und nicht sofort zu verdauen. Die seit der von Rudman (1991) aufgestellten Phylogenie neu beschriebenen Arten sowie ältere Arten, zu denen neue Informationen vorliegen, lassen sich gut in seine Phylogenie integrieren. Zu den Xeniididae-fressenden Arten sind seitdem noch *P. lizardensis*, *P. jakobsenae* und *P. rudmani*, *P. kabiranum*, *P. lembehensis*, *P. pinnatum* und *P. tuberculatum* hinzugekommen. Bei den nicht Xeniididae-fressenden Tieren sind *Phyllodesmium koehleri*, *P. iriomotense* und *P. guamensis* neu beschrieben worden (Rudman 1999, Avila et al. 1998; Burghardt & Wägele 2004; Burghardt et al. 2005; Burghardt & Gosliner 2006; Burghardt & Wägele 2006; Burghardt et al. 2008a; 2008b; Moore et al. 2010). Die Nahrung von *P. parangatum* sowie *P. karenae* ist bisher unbekannt (Ortiz & Gosliner 2003; Moore & Gosliner 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun erstmals eine Phylogenese des Genus *Phyllodesmium* auf Grundlage molekularer Daten erstellt und mit den morphologischen Daten verglichen werden.

Die Annahme, dass die bei der Homologisierung der Sequenzen des Aeolidida-Datensatzes ausgeschlossenen molekulare Merkmale für ein zu geringes phylogenetisches Signal sorgen, um das Taxon *Phyllodesmium* zu rekonstruieren, konnte durch die vorliegenden Analysen bestätigt werden. Die weiterführende Analyse der Sequenzen des kombinierten Datensatzes unter Ausschluss der übrigen Taxa ergab für die Gattung *Phyllodesmium* eine gut unterstützte Auflösung in die Spezies (Abb. 3.11). Die durch den Ausschluss herbeigeführte Zunahme Parsimonie-informativer Positionen im Datensatz ermöglichte die Rekonstruktion evolutionärer Schritte bei der Diversifikation der Taxa. Wie auch in anderen Untersuchungen (Busse und Preisfeld 2002a; b; Busse et al. 2003), so könnten auch im Hinblick auf die Phylogenese der Aeolidida und ihrer Untergruppen vermutlich stabilere Ergebnisse erzeugt werden, wenn manche Taxa isoliert untersucht würden.

Erste phylogenetische Untersuchungen von Ortiz & Gosliner (2008) basieren auf morphologischen Merkmalen und bestätigen die Monophylie der Gattung *Phyllodesmium*. Dass sich *Godiva* als Außengruppe für die Rekonstruktion der Phylogenese des Genus *Phyllodesmium* eignet, haben die Analysen zur Phylogenese der Aeolidida ergeben. Dieses wird auch bestätigt durch die Ergebnisse von Willan (1987), später von Ortiz & Gosliner (2008) und Moore & Gosliner (2009), auf Grundlage morphologischer Annahmen. *Nanuca sebastiani* als Außengruppentaxon ist neu.

Interessanterweise lassen sich die identifizierten morphologischen Merkmale von Ortiz & Gosliner (2008) und Moore & Gosliner (2009) konfliktfrei auf die Ergebnisse der molekularen Phylogenese übertragen. So zeichnet sich innerhalb der bisher beschriebenen *Phyllodesmium*-Spezies eine Gruppe durch Ausstülpungen der Cerata aus. Dazu zählen von den hier untersuchten Arten *Phyllodesmium crypticum*, *P. hyalinum*, *P. lizardensis*, *P. lembehensis* und *P. koehleri*. Die Tuberkel auf den Cerata von *P. hyalinum* und *P. crypticum* werden als niedrig, oft wenig erhöhte konische beschrieben. *P. jakobsenae* und *P. rudmani* werden nicht erwähnt, jedoch haben auch sie die beschriebenen Ausstülpungen in schwacher Ausprägung (Abb. 3.14). In der hier erstellten Phylogenie bilden die Taxa mit „Ausstülpungen“ der Cerata ein Monophylum mit den Taxa mit „glatten“ Cerata als Schwestertaxon. *Phyllodesmium poindimiei* steht an der Basis der untersuchten *Phyllodesmium* Arten und hat ebenfalls glatte Cerata.

Eine Analyse von Ortiz & Gosliner (2008) zeigt, dass die basalen Taxa *P. horridum* und *P. opalescens* unverzweigte Mitteldarmdrüsen besitzen. Keines der Taxa stand in dieser Arbeit zur Verfügung, in Zukunft sollten die fehlenden Taxa aber auf die gefundenen Merkmale hin analysiert werden. Weitere Übereinstimmungen sind in der Phylogenie von Rudman (1991) zu finden, in welcher der Verzweigungsgrad der Mitteldarmdrüse sowie die Nahrungspräferenzen als Merkmale verwendet werden. Spezies mit einem höheren Verzweigungsgrad („secondary branching“) der Mitteldarmdrüse sind als besser an die Symbiose angepasst beschrieben, während die mit dem plesiomorphen Merkmal eines geringeren Verzweigungsgrads ausgerüsteten Schnecken weniger stabile Symbiosen eingehen. Weitergehend beschrieb Rudman (1991) die Xenidae-fressenden Arten als Taxa mit einem frühen Stadium weniger effizienter Symbiose und belegte dies mit der nicht stark verzweigten Mitteldarmdrüse. Burghardt & Wägele (2004) beschrieben auch bei Xenidae-fressenden Arten einen hohen Verzweigungsgrad der Mitteldarmdrüse, aus denen eine effektive Symbiose resultiert. In Übereinstimmung mit Rudman (1991) kristallisieren sich die Xenidae-fressenden *Phyllodesmium* als eine monophyletische Gruppe heraus. Dieser Gruppe entspringt auch die neu beschriebene Art *P. koehleri*, die sich von Nephtheidae (Alcyonacea) ernährt, aber ansonsten viele morphologische Merkmale der Xenidae-fressenden Arten besitzt (Burghardt et al. 2008). Dieses könnte als weitere Spezialisierung in Anpassung an die Nahrungsquelle angesehen werden. In der Diversifikation von *Phyllodesmium* haben sich die Arten aufgrund der Fähigkeit, bestimmte Symbionten zu fressen und stabil zu halten, in zwei Entwicklungslinien aufgespalten und die Nahrungspräferenz vererbt.

Mittels der seit einigen Jahren eingesetzten PAM-Methode (Burghardt & Wägele 2004) ist es möglich, die photosynthetische Aktivität der Symbionten in den lebenden Schnecken zu

bestimmen, um Aussagen über eine Effektivität der Symbiose zu ermöglichen (z. B. Wägele & Johnson 2001, Burghardt et al. 2008; Wägele et al. 2010). Die Methode sowie die erzielten Ergebnisse werden im weiteren Verlauf behandelt (4.6). Zuvor werden jedoch die Ergebnisse der phylogenetischen Rekonstruktion von *Phyllodesmium* in Zusammenhang mit molekularen Merkmalen der identifizierten Symbionten diskutiert.

4.4 Molekulare Merkmale des Symbionten *Symbiodinium* stützen die Phylogenese von *Phyllodesmium*

Die durchgeführten molekularen Analysen des Symbionten *Symbiodinium* gaben überraschenderweise ebenfalls indirekt Aufschluss über die Evolution im Genus *Phyllodesmium*.

Der in *P. koehleri* gefundene Symbiont *Symbiodinium* Clade CII weist dieselben Merkmale wie die Symbionten aus den anderen Xenidiidae-fressenden Korallen auf (Abb. 3.26, CII), nämlich Substitutionen an drei Positionen innerhalb der plastidären LSU von C – G. (Details siehe 4.5). Zum jetzigen Zeitpunkt stellt dieses Merkmal eine mutmaßliche Verbindung zwischen *P. koehleri* und den anderen Xenidiidae-fressenden Taxa dar. In anderen nicht Xenidiidae-fressenden Arten wurden ausschließlich Symbionten ohne dieses Merkmal gefunden. In weiterführenden Analysen muss geklärt werden, ob auch die Futterorganismen Nephtheidae einen solchen Symbionten mit identischen molekularen Merkmalen beherbergen oder ob – rein spekulativ – *P. koehleri* sich ebenfalls zu einer Zeit von Xenidiidae ernährt hat.

Auch von *P. lizardensis* konnten die angesprochenen molekularen Informationen der plastidären LSU der Symbionten von den Futterkorallen gewonnen werden. Sie bestätigen eindrucksvoll die gleichen molekularen Merkmale der Symbionten in Futterkoralle und Schnecke. Damit liegt eine erste molekulare Bestätigung der sekundären Symbiose zwischen *Phyllodesmium* und *Symbiodinium* vor, bei der die Symbionten von den Korallen übernommen wurden. Bei den nicht Xenidiidae-fressenden Tieren weisen die Symbionten aus *P. hyalinum* und *P. briareum* ebenfalls die gleichen molekularen plastidären LSU-Merkmale auf, wie die Futterkorallen (Abb. 3.26). Weitere Analysen der Symbionten von anderen *Phyllodesmium*-Arten sowie der dazugehörigen Futterkorallen versprechen hilfreiche Information zu diesem bislang noch recht unerforschten Symbiose-System.

4.5 Identifizierungen der Symbionten

Wie schon vorrausnehmend angesprochen, konnten die Symbionten sowohl aus den Schnecken, als auch – wenn vorhanden – aus den Korallen isoliert und molekular identifiziert

werden. Die BLAST-Analyse der hier erhaltenen *Symbiodinium*-Sequenzen half in einem ersten Schritt, die gewonnenen Sequenzen der Gattung *Symbiodinium* zuzuordnen. Eine exakte Bestimmung des jeweiligen Clades der identifizierten *Symbiodinium* war so jedoch nicht möglich. Die darauf folgende phylogenetische Rekonstruktion der neuen mit bekannten und bereits publizierten Sequenzen genau definierter Clades, führte zu einer exakten Zuordnung. An dieser Stelle ist für die Identifizierung des Symbionten *Symbiodinium* festzuhalten, dass eine BLAST-Suche alleine nicht zur genauen systematischen Aufklärung nutzbar ist. Vielmehr kann sie maximal Hinweise auf die grobe systematische Zugehörigkeit der überprüften Sequenzen liefern und ersetzt in keinem Fall eine phylogenetische Analyse.

Erst durch phylogenetische Rekonstruktion der über „normale“ PCR neu generierten *Symbiodinium*-Sequenzen zeigten sich allerdings die genauen systematischen Positionen und damit auch die Clade-Zugehörigkeit. Mittels der untersuchten plastidären LSU-Sequenzen konnten nun auch Symbionten den *Symbiodinium* Clades A und C zugeordnet werden. *Phyllodesmium* enthielt mit diesen herkömmlichen Methoden nachweislich nur Symbionten des Clade C. Dies deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Studien an Korallen oder an anderen Mollusken, die auch häufig nur ein Clade nachweisen konnten (Santos et al. 2003b). In *Phidiana indica* und *Pteraeolidia ianthina* konnten Symbionten der *Symbiodinium* Clades A und C nachgewiesen werden. Für *Pteraeolidia ianthina* ist ein ähnliches Ergebnis schon von Loh et al. (2006) publiziert worden. Weitere Hinweise auf *Symbiodinium*-Clades in Aeolidida sind in der Literatur nicht vorhanden. Jedoch mehren sich Hinweise auf das Vorhandensein mehrerer *Symbiodinium*-Clades in anderen marinen Evertabrata (Baker et al. 2007).

Die in *Flabellina bicolor* gefundene Sequenz von *Symbiodinium* Clade CI stellt ein nicht erwartetes Ereignis dar, denn *F. bicolor* ernährt sich von nichtzooxanthellaten Hydrozoa (Rudman 2007). Mögliche Erklärungen wären, dass *F. bicolor* noch eine andere bisher unbekannte zooxanthellaten Nahrungsquelle hat oder, dass sie zufällig pelagische Symbionten des Clade CI aufgenommen hat.

Zusammenfassend kann bisher nicht von einer Vielfalt der Symbionten in den Schnecken gesprochen werden. Die identifizierten Symbionten des Clades A und C sind entweder die einzigen Clades, die in den Schnecken vorkommen oder aber die bisher verwendeten Methoden reichen nicht aus, die vermutete Vielfalt der Symbionten zu erfassen.

4.6 Relative Quantifizierung der Symbionten *Symbiodinium*

Nachdem die Symbionten verschiedener Aeolidida molekular identifiziert werden konnten (4.5), stellte sich im weiteren Verlauf die Frage, ob mit der angewendeten Methode alle Clades von *Symbiodinium* in den Schnecken und in den Futterkorallen erfasst werden können, oder ob die bisherigen Methoden unbeabsichtigt *Symbiodinium* Clade C-spezifisch waren.

Bei Durchsicht der Literatur fällt auf, dass häufig *Symbiodinium* Clade C identifiziert werden konnte (Ulstrup & Van Oppen 2003; Mieog et al. 2009; Smith et al. 2009). Dieses könnte daran liegen, dass die aus der Literatur übernommenen Primer doch spezifisch und somit bevorzugt die DNA-Abschnitte von Clade C amplifizieren. Es bleibt also die Frage offen, ob überhaupt alle Clades mit den vorhandenen Primern erfasst werden und in welchen tatsächlichen Verhältnissen die gefundenen *Symbiodinium* Clades in den Schnecken stehen. Informationen über die Verhältnisse verschiedener *Symbiodinium*-Clades in Aeolidida finden sich in der publizierten Literatur bisher nicht. Wie bereits dargestellt, haben nur Loh et al. (2006) über *Symbiodinium* in *Pteraeolidia ianthina* berichtet. Sie konnten je nach geografischer Lage *Symbiodinium* der Clades A, B, C oder D aus den Schnecken isolieren, aber keine Angaben zu den jeweiligen Verhältnissen machen.

Auch in der vorliegenden Arbeit stellt *Symbiodinium* Clade C - mit den bisher eingesetzten Methoden - das am häufigsten identifizierte Clade dar. Da die Ergebnisse die Vermutung nahe brachten, dass sich die anderen Clades aus methodischen Gründen nicht mit der PCR erfassen lassen würden, sollte die Methode modifiziert werden. Es wurden stärker auf die Clades abgestimmte Primer aus Sequenzen der Korallen und anderen Wirten entwickelt, so dass es zukünftig zur Vermeidung einer Clade C-Spezifität kommen sollte. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten die bisher nicht häufig bzw. gar nicht gefundenen Symbionten des Clade A und des Clade D in manchen Schnecken-Proben nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit verschiedenen Studien (Mieog et al. 2007) ist zu vermerken, dass die herkömmlichen PCR-Methoden allein nicht sensitiv genug sind, um die *Symbiodinium*-Clades zu erfassen, die innerhalb ihres Wirtsorganismus geringe Abundanzen aufweisen. Untersuchungen an Korallen haben ergeben, dass die herkömmlichen Methoden oft auch nicht die *Symbiodinium*-Diversität innerhalb eines Wirtes erfassen.

Während in dieser Arbeit, wie schon beschrieben, mit herkömmlichen PCR-Methoden, hauptsächlich *Symbiodinium* Clade C entdeckt wurde, zeigt die Methode der qPCR ein anderes Bild der *Symbiodinium*-Clades in den Schnecken wie auch in den Korallen. *Symbiodinium*-Clade C ist nach Ergebnissen der qPCR nicht das häufigste Clade in den Schnecken und auch nicht in den Korallen. Dies führt zu der Vermutung, dass die PCR-

Primer der herkömmlichen Methode „bevorzugt“ an *Symbiodinium* Clade C binden und dieses dann überrepräsentiert erscheint. Welcher Mechanismus dahinter steckt, ist bisher nicht klar. Durch die in dieser Arbeit etablierten spezifischen Primer für die *Symbiodinium* Clades A, C und D sowie des universellen *Symbiodinium*-Primers All ist es möglich, Aussagen über einen kleinen Teil der vorhandenen Symbionten zu treffen. Weiter ermöglicht der neue Ansatz mit dem Referenzprimer All unabhängig von den in den Proben enthaltenen Schnecken und Korallen-DNAs zu arbeiten.

Da bisher keine der bekannten Methode in der Lage ist, die absoluten DNA Mengen der einzelnen Spezies in dem DNA-Gemisch zu bestimmen, stellt ein Referenzgen, welches nur in den Symbionten vorkommt, die ideale Lösung dar. Verschiedene Arbeiten nutzen als Referenzgen beispielsweise das Produkt von spezifischen Aktin-Primern. Allen diesen Arbeiten gemein ist jedoch, dass sie niemals die DNA von drei Organismen in einer Probe haben (Ulstrup & Van Oppen 2003; Mieog et al. 2007; 2009; Mayfield et al. 2009). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen mit dem Primerpaar All durchgeführt, der zwar einen Sequenzbereich eines in *Symbiodinium* vorkommenden Gens greift und somit die anderen Genome ausschließt.

Mittels der neuen Ergebnisse, kann aber ganz eindeutig gezeigt werden, dass die Vielfalt der Symbionten in den Schnecken mit herkömmlichen Methoden kaum erfassbar ist. Die Methode der qPCR ermöglicht es, auch Symbionten mit geringen Abundanzen zu erfassen. Der große Anteil bisher nur mit dem All-Primer messbaren Symbionten bestätigt dies. Zukünftige Untersuchungen benötigen zunächst eine umfassende Analyse von Primersequenzen für *Symbiodinium*.

4.7 Die Messung der „Effizienz“ der sekundären Symbiose

Im Laufe der Evolution haben sich innerhalb der Opisthobranchia zwei verschiedene Systeme der Symbiose mit photosynthetisch aktiven Organismen bzw. Organellen etabliert. Kleptoplastie kommt bei den Sacoglossa vor und bezeichnet die Aufnahme und langfristige Einlagerung von Chloroplasten, also nur der Organellen. Sacoglossen ernähren sich von marinen Grünalgen und Seegräs. *Plakobranchnus ocellatus* kann die aufgenommenen Chloroplasten über einen Zeitraum von mindestens 11 Monaten (Evertsen et al. 2007) und *Elysia chlorotica* über einen Zeitraum von 10 Monaten (Rumpho et al. 2000) aktiv halten.

Das zweite System stellt die Aufnahme und langfristige Kultivierung eines Symbionten dar, also eines ganzen Organismus. Diese Form ist bei den Cladobranchia, einer Untergruppe der Nudibranchia, zu denen auch die Aeolidida gehören, zu finden. Eine Symbiose mit

eukaryotischen Einzellern kann ebenfalls in vielen anderen Metazoa beobachtet werden, wie Cnidaria, Foraminifera, Bivalvia u.v.a. (Barneah et al 2004; Baker & Romanski 2007). Bei den Symbionten der Cladobranchia handelt es sich um den photosynthetisch aktiven Einzeller *Symbiodinium* (Dinoflagellata), einem Organismus mit einer von Grünalgen und Seegrass verschiedenen Pigmentgarnitur. Während Grünalgen und Embryophyta sich durch den Besitz von Chlorophyll a und b auszeichnen, weisen die Dinoflagellaten der Gattung *Symbiodinium* nur Chlorophyll a, dafür aber mehrere Xanthophylle und besonders das bräunlich gefärbte Peridinin als akzessorisches Pigment auf. Beiden Systemen gemein ist die Fähigkeit, Photosynthese zu betreiben. Die Symbiose mit photosynthetisch aktiven Dinoflagellaten bietet gegenüber der Kleptoplastie verschiedene Vorteile: Durch die Bereitstellung von direkten Photosynthese-Produkten, aber auch bereits vom Organismus abgewandelten Produkten für den Wirt (die Schnecke), sind die Tiere in der Lage, aufgrund der besseren Nährstoffversorgung längere Hungerperioden zu überstehen und womöglich sich auch besser fortzupflanzen.

Um die Symbiosesysteme untersuchen zu können, ist die langfristig stabile Kultivierung dieser Organismen unabdingbar. Die Hälterung und die Zucht von vielen marinen Organismen ist letztendlich durch die Erfahrungen vieler Hobby-Aquarianer etabliert. So kann ein Meerwasseraquarium auch relativ problemlos in Gebieten ohne Zugang zum offenen Meer betrieben werden. Zuchtdaten der im Hinblick auf ihre Ernährung hoch spezialisierten Schnecken sind in der Literatur bisher nur vereinzelt zu finden (*Hermisenda crassicornis*: Avila et al. 1998b; *Spurilla neapolitana*; Schlesinger et al. 2009). Lediglich *Aeolidiella stephanieae*, die unter dem Namen *Berghia verrucicornis* gegen „Glasrosen“ in Meerwasseraquarien eingesetzt wird, ist käuflich erwerbbar. Daher sind auch Zuchtanleitungen zugänglich (u. a. Carroll & Kempf 1990). Für *Phyllodesmium briareum* lagen bisher keine publizierten Zuchterfahrungen vor, weshalb die Zucht im Rahmen dieser Arbeit erst etabliert werden musste. Im Laufe der Studien ist es gelungen, eine stabile *P. briareum*-Population in einem den natürlichen Bedingungen entsprechenden System mit ihren Futterkorallen der Gattung *Briareum* aufzubauen. Als Zuchterfolg können die zahlreichen Gelege betrachtet werden, die für die anstehenden Untersuchungen verwendet wurden. Auf diese Weise konnten die Untersuchungsergebnisse mehrfach reproduziert werden.

Die dadurch vergleichsweise große Anzahl an Versuchstieren ermöglichte die Bearbeitung verschiedener offener Fragen zur Symbiose mit *Symbiodinium*. Neben den schon diskutierten molekularen Untersuchungen spielt die Messung der photosynthetischen Aktivität der Symbionten als Maß für den Grad der Symbiose eine große Rolle. Die eingesetzte PAM (Pulse-Amplitude-Modulation)-Fluorometrie wird in ökologischen Fragestellungen häufig zur effizienten Messung der photosynthetischen Aktivität der Chloroplasten

herangezogen (Schreiber 2004). In diesen Studien wird sie genutzt, um die Effizienz der Symbiose über die relative Quantenausbeute in der Photosynthese der Symbionten-Chloroplasten zu messen. Die PAM-Methode ist besonders geeignet, um die Effizienz der Photosynthese zu messen, weil die Chlorophyll a-Fluoreszenz in direkter Nähe zu den Orten der Transformation von Lichtenergie in chemisch fixierte Energie abläuft. Es ist sogar der identische Anregungsstatus im Photosystem II, der sowohl zur Fluoreszenzemission, als auch zur photochemischen Reaktion führt. Das bedeutet, dass die relative Quantenausbeute als Maß für eine effektive Photosyntheseleistung bei sachgemäßer Anwendung des Fluorometers im natürlichen System erfolgreich gemessen werden kann (Jones et al. 1999). Dennoch ist zu beachten, dass es sich bei diesen natürlichen biologischen Systemen nur um Ergebnisse mit großen Schwankungsbreiten handeln kann. Die zugrunde liegende Fragestellung für die Untersuchungen ist, ob die Photosyntheseleistung der Symbionten bei Hungerversuchen der Schnecken stabil bleibt oder ob eine Abnahme durch entweder Störung der Symbiose oder Verdauung/Ausscheidung der Symbionten beobachtet werden kann.

Die PAM-Methode wurde für Untersuchungen zur Photosyntheseaktivität in lebenden Schnecken des Taxons Opisthobranchia erstmalig von Wägele und Johnsen (2001) angewendet. Inzwischen hat sich die Methode etabliert und wird für vielfältige Fragestellungen benutzt (Burghardt & Wägele 2004; Wägele 2004; Burghardt et al. 2005; 2008a; b; Serodio et al. 2010).

In einer Untersuchung von Burghardt und Wägele (unpublizierte Daten, pers. Mitteilung H. Wägele) konnte *Melibe engeli* über einen Zeitraum von neun Monaten gehältert werden. *Melibe engeli* gehört zu den Dendronotida und lebt ebenfalls in Symbiose mit *Symbiodinium*. Die Untersuchung fand an Kontroll- und Versuchstieren statt. Die Kontrolltiere wurden mit *Artemia salina* (Salinenkrebs, Crustacea) gefüttert, die Versuchstiere wurden unter Hungerbedingungen gehältert. Die Photosynthese-rate beider Untersuchungs-Gruppen blieb konstant, weiterhin waren sowohl Hunger- als auch Kontrolltiere in der



Abbildung 4.2: *Melibe engeli* aus dem Versuch von Burghardt und Wägele (unpublizierte Daten) b: Futtertier (Länge: 95 mm); oben: Hungertier (Länge: 50 mm).

Lage, sich fortzupflanzen. Offensichtlich fand auch in Hungersituationen kein Verdauung der Symbionten statt. Lediglich in ihren Körpergrößen konnten Burghardt und Wägele Unterschiede feststellen (Abb. 4.2). Es wird davon ausgegangen, dass die Hungertiere mit 50 mm Größe im Gegensatz zu 95 mm Größe bei den Futtertieren durch die vom Symbionten zur Verfügung gestellten Photosyntheseprodukte überleben konnten. Bisher ist

in der Literatur nicht belegt, ob sich die Symbionten in der Schnecke vermehren können. In histologischen Präparaten der Schnecken *Phyllodesmium longicirrum* und *Melibe engeli* vorgefundene Teilungsstadien von *Symbiodinium* deuten allerdings stark darauf hin (Burghardt & Wägele, pers. Mitteilung).

Die vorliegenden Untersuchungen wurden hauptsächlich an *Phyllodesmium briareum* durchgeführt, die mit einer sekundär verzweigten Mitteldarmdrüse ausgestattet ist und somit von den anatomischen Voraussetzungen her eine effektive Symbiose mit *Symbiodinium* eingehen kann (Rudman 1991). Die Stabilität dieser Symbiose konnte in dieser Arbeit über einen Zeitraum von maximal 45 Tagen an 53 hungernden Tieren beobachtet werden. In dieser Zeit nahm die photosynthetische Aktivität der Symbionten leicht, aber konstant ab. Burghardt et al. (2005) konnten nach über 70 Tagen noch photosynthetische Aktivität in den Symbionten von *P. briareum* (ein untersuchtes Tier in Australien) nachweisen. Da Burghardt et al. (2005) auch juvenile *P. briareum* untersucht haben, bei denen die photosynthetische Aktivität der Symbionten für maximal 32 Tage gemessen werden konnte, stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit untersuchten Versuchstiere noch nicht genügend ausgewachsen waren und daher nicht die gleiche Lebenszeitspanne erreichen können, wie das eine untersuchte Tier von Burghardt et al. (2005). Eine mögliche Erklärung wäre, dass juvenile Tiere für ihr Wachstum und Gonadenreifung noch erheblich mehr Nahrung und Energie benötigen als Adulte, die nicht mehr wachsen und evtl. auch schon zahlreiche herangereifte Eier in der Gonade besitzen. Somit liegt deren Effizienz in der Symbiose eindeutig unter der von *Melibe engeli*, bei der Wachstum und Gonadenreifung mit zahlreichen Eigelegen ohne jegliche Nahrungszufuhr beobachtet wurde (pers. Mitteilung Heike Wägele). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass juvenile *Phyllodesmium briareum* (1-3 Wochen alt, 1-5 mm groß) ohne ihre Futterkoralle in kürzester Zeit (1-4 Tage) versterben, obwohl in ihrer Mitteldarmdrüse Symbionten mikroskopisch sichtbar waren. Sie sind zu dem Zeitpunkt also auf zusätzliche Nahrung angewiesen und können nicht allein durch die Photosynthese ihrer Symbionten überleben. Da bisher keine Ergebnisse über die Ontogenese von *Phyllodesmium briareum* vorlagen, standen diese Erkenntnisse zu Beginn noch nicht zur Verfügung. Erst in dieser Studie ist es gelungen, die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Tier zu beobachten.

Pteraeolidia ianthina (Favorinidae) zeichnet sich durch eine "effizientere" Symbiose als *Phyllodesmium briareum* aus, gemessen an einer länger anhaltenden photosynthetischen Aktivität sowie höheren Quanten-Ausbeuten ihrer Symbionten (Burghardt et al. 2005). Auch Kempf (1984) beobachtete bei *Pteraeolidia ianthina* eine stabile Symbiose über einen Zeitraum von sechs Monaten.

In der Literatur gibt es kaum weitere Informationen darüber, woran eine nicht oder weniger gut etablierte Symbiose zu erkennen wäre. Die Frage, ob die Tiere dann eher sterben oder ob die photosynthetische Aktivität der Symbionten deutlicher nachlässt, wurde mit einem zweiten potentiellen Symbiosesystem überprüft. Hierbei handelte es sich um *Aeolidiella stephanieae* (Aeolidiidae), welche sich von dem Cnidaria *Aiptasia* sp. ernährt. Beide Tiere konnten erfolgreich etabliert werden und standen so in ausreichender Individuen-Zahl zur Verfügung. Dieses Symbiose-System wurde gewählt weil bekannt ist, dass *Aeolidiella stephanieae* nicht über eine stark verzweigte Mitteldarmdrüse verfügt und deshalb anatomisch nicht optimiert ist für eine dauerhafte Symbiose mit *Symbiodinium* (Kempf 1991; Valdes 2005).

Es zeigte sich bei hungernden *Aeolidiella stephanieae* sehr schnell eine drastische Abnahme der photosynthetischen Aktivität der Symbionten. Durch die Abnahme der Aktivität verringerten sich auch die für die Schnecken potentiell nutzbaren Produkte der Photosynthese. Mit maximal 48 Tagen lebte ein einzelnes Versuchs-Tier allerdings länger als die zuvor diskutierten *Phyllodesmium briareum*, bei der eine stabile Symbiose postuliert wird. Rein spekulativ könnten auch die hier erstmals ermittelten, unterschiedlichen Lebenserwartung der beiden Arten (*P. briareum* 180 Tage, *A. stephanieae* > 400 Tage) die Ursache für die nah beieinander liegenden maximal messbaren Kultivierungszeitäume sein. Eine Hungerphase von 45 Tagen macht bei einer Gesamtlebenserwartung von ca. 180 Tagen einen deutlich größeren Anteil aus als eine Hungerphase von 48 Tagen bei einer Lebenserwartung von über 400 Tagen. Aus diesem Blickwinkel wäre die Symbiose zwischen *P. briareum* und *Symbiodinium* deutlich effizienter.

Die Tatsache, dass im Kot von hungernden *A. stephanieae* bis Tag 10 funktionsfähige und auch "beschädigte" *Symbiodinium* (weniger ausgeprägte Autofluoreszenz) gefunden werden konnten (Abb. 3.24), weist auf eine mögliche Verdauung der Symbionten hin. Es ist zwar bekannt, dass Plastiden noch eine kurze Zeit ihre Autofluoreszenz behalten können, aber in diesem Fall war der beginnende Verdau der gesamten Zellen bereits sichtbar. Folgendes hypothetisches Szenario wäre somit denkbar und würde die Lebensdauer von *A. stephanieae* erklären: Die Symbionten können nicht effektiv und langfristig von *A. stephanieae* kultiviert werden, weil die Mitteldarmdrüse nicht stark verzweigt ist (Valdes 2005). Je länger die Symbionten in der Schnecke verbleiben, desto stärker werden sie von den Verdauungssäften der Schnecke angegriffen und letztendlich verdaut. Das würde auch zu dem Ergebnis passen, dass später keine Symbionten mehr im Kot zu identifizieren sind. Alternativ könnte es auch sein, dass die Symbionten im Laufe der Zeit unbeschadet ausgeschieden werden, ohne im Kot identifiziert werden zu können. Durch die Verdauung der Symbionten bekommt die Schnecke wiederum neue Nährstoffe, die sie zur Ernährung

nutzen kann. Folglich überlebt sie damit ein wenig länger als ohne den Verdau. Diese "Taktik" erscheint sinnvoll, da *A. stephanieae* offensichtlich nicht in der Lage ist, einen "Gewinn" neben den Photosyntheseprodukten aus der Beherbergung von Symbionten zu ziehen. Ein Verdau der Symbionten und die dadurch frei werdende Energie kann sie zum Überleben nutzen.

Zusammenfassend konnte durch die Abnahme der photosynthetischen Aktivität der Symbionten in *Aeolidiella stephanieae* und der eben nur geringen Abnahme in *Phyllodesmium briareum* die Effizienz von Symbiosen in unterschiedlichen evolutionären Stadien beobachtet werden. Bezugnehmend auf die Analysen von Burghardt et al. (2005), muss davon ausgegangen werden, dass unter bestimmten Umständen *Phyllodesmium briareum* auch länger in der Lage sein kann, seine Symbionten zu kultivieren. Möglicherweise spielt aber auch das evtl. angemessenere Habitat eine Rolle. Wir wissen im Grunde genommen fast gar nichts über die Biologie dieser interessanten Tiergruppe. In *Phyllodesmium briareum* ist also eine effektive Langzeitspeicherung möglich, wenngleich auch hier die Nutzbarkeit der Symbionten begrenzt ist. Evtl. werden die Symbionten nicht mehr als Nahrung identifiziert, sondern stattdessen umgehend eingelagert. In *Aeolidiella stephanieae* kann nur eine Kurzzeitspeicherung erfolgen, dafür kann sie offensichtlich die Symbionten verdauen.

4.8 Beginn der Symbiose mit *Symbiodinium*

Die anfangs gestellte Frage nach dem Beginn der Symbiose zwischen den Aeolidida und den Symbionten *Symbiodinium* wirft aus evolutionärer Sicht noch viele Fragen auf. Wann in der Evolution die ersten Symbiosen zwischen den Schnecken und *Symbiodinium* entstanden sind kann genauso wenig beantwortet werden wie die Frage nach den ersten Arten, welche in Symbiose lebten. Durch Untersuchungen heute lebender Organismen dieser Gruppen können jedoch Aussagen über heutige Symbiosen gemacht werden. Bei rezenten Cnidaria findet man Beispiele für horizontale Symbiontenaufnahme (z. B. Xenidiidae, Alcyoniidae), wie auch für vertikale Symbionten-Übertragung (z. B. Nephteidae, Benayahu 1991; Barneah et al. 2004). Die hier ontogenetisch untersuchten Arten *Aeolidiella stephanieae* und *Phyllodesmium briareum* zeigen keine vertikale Symbionten-Übertragung. Vielmehr nehmen sie die Symbionten selbständig aus ihrer Umwelt, also horizontal auf.

5. Literaturverzeichnis

- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor M (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: (5) 399-451
- Albu M, Min XJ, Golding GB, Hickey D (2009) Nucleotide substitution bias within the genus *Drosophila* affects the pattern of proteome evolution. *Genome Biology and Evolution* 1: 288-293
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: (3) 403-410
- Avila C, Ballesteros M, Slattery M, Starmer J, Paul VJ (1998a) *Phyllodesmium guamensis* (Nudibranchia : Aeolidioidea), a new species from Guam (Micronesia). *Journal of Molluscan Studies* 64: 147-160
- Avila C, Tyndale E, Kuzirian AM (1998b) Feeding behavior and growth of *Hermisenda crassicornis* (Mollusca : Nudibranchia) in the laboratory. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 31: (1) 1-19
- Baba K (1959) A new record of an interesting species, *Embletonia gracile* Risbec, from Japan (Nudibranchia- Eolidacea). *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 7: (3) 335-336
- Baba K (1991) Taxonomical study on some species of the genus *Phyllodesmium* from Cape Muroto-misaki, Shikoku and Okinawa Province, Southern Japan (Nudibranchia: Facelinidae). *Venus* 50: (2) 109-123
- Baillie BK, Belda-Baillie CA, Maruyama T (2000) Conspecificity and Indo-Pacific distribution of *Symbiodinium* genotypes (Dinophyceae) from giant clams. *Journal of Phycology* 36: 1153-1161
- Baker AC, Romanski AM (2007) Multiple symbiotic partnerships are common in scleractinian corals, but not in octocorals: Comment on Goulet (2006). *Marine Ecology-Progress Series* 335: 237-242
- Barneah O, Weis VM, Perez S, Benayahu Y (2004) Diversity of dinoflagellate symbionts in Red Sea soft corals: mode of symbiont acquisition matters. *Marine Ecology-Progress Series* 275: 89-95
- Bastin P, Ellis K, Kohl L, Gull K (2000) Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci* 113: (18) 3321-3328
- Benayahu Y (1991) Reproduction and developmental pathways of Red-Sea Xeniidae (Octocorallia, Alcyonacea). *Hydrobiologia* 216: 125-130
- Bernardi G, Bernardi G (1986) Compositional constraints and genome evolution. *Journal of Molecular Evolution* 24: (1-2) 1-11

- Bhattacharya D, Surek B, Rusing M, Damberger S, Melkonian M (1994) Group I introns are inherited through common ancestry in the nuclear-encoded rRNA of Zygnematales (Charophyceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: (21) 9916-9920
- Billoud B, Guerrucci MA, Masselot M, Deutsch JS (2000) Cirripede phylogeny using a novel approach: molecular morphometrics. *Mol Biol Evol* 17: (10) 1435-1445
- Bjorkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77-K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: (4) 489-504
- Boore JL, Brown WM (1994) Complete DNA-sequence of the mitochondrial genome of the black chiton, *Katharina tunicata*. *Genetics* 138: (2) 423-443
- Bouchet P, Rocroi JP, Fryda J, Hausdorf B, Ponder W, Valdes A, Waren A (2005) Classification and nomenclator of Gastropod families. *Malacologia* 47: (1-2) 1-368
- Brown GH (1980) The british species of the Aeolidacean family Tergipedidae (Gastropoda, Opisthobranchia) with a discussion of the genera. *Zoological Journal of the Linnean Society* 69: (3) 225-255
- Burger G, Gray MW, Lang BF (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in Genetics* 19: (12) 709-716
- Burghardt I, Wägele H (2004) A new solar powered species of the genus *Phyllodesmium* Ehrenberg, 1831 (Mollusca : Nudibranchia : Aeolidioidea) from Indonesia with analysis of its photosynthetic activity and notes on biology. *Zootaxa* 596: 1-18
- Burghardt I, Evertsen J, Johnsen G, Wägele H (2005) Solar powered seaslugs - Mutualistic symbiosis of Aeolid Nudibranchia (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia) with *Symbiodinium*. *Symbiosis* 38: (3) 227-250
- Burghardt I, Gosliner TM (2006) *Phyllodesmium rudmani* (Mollusca: Nudibranchia: Aeolidioidea), a new solar powered species from the Indo-West Pacific with data on its symbiosis with Zooxanthellae. *Zootaxa*(1308) 31-47
- Burghardt I, Wägele H (2006) Interspecific differences in the efficiency and photosynthetic characteristics of the symbiosis of "solarpowered" Nudibranchia (Mollusca: Gastropoda) with zooxanthellae and evolution of Opisthobranch Molluscs. *Records of the Western Australian Museum* 69: 1-9
- Burghardt I, Schrödl M, Wägele H (2008a) Three new solar-powered species of the genus *Phyllodesmium* Ehrenberg, 1831 (Mollusca : Nudibranchia : Aeolidioidea) from the tropical Indo-Pacific, with analysis of their photosynthetic activity and notes on biology. *Journal of Molluscan Studies* 74: 277-292
- Burghardt I, Stemmer K, Wägele H (2008b) Symbiosis between *Symbiodinium* (Dinophyceae) and various taxa of Nudibranchia (Mollusca : Gastropoda), with analyses of long-term retention. *Organisms Diversity & Evolution* 8: (1) 66-76
- Burn R (1966) Descriptions of Australian Eolidacea (Mollusca, Ophistobranchia). *Journal of the Malacological Society of Australia* 10: 20-34

- Busse I, Preisfeld A (2002a) Phylogenetic position of *Rhynchopus* sp. and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan small subunit ribosomal DNA. *Gene* 284: (1-2) 83-91
- Busse I, Preisfeld A (2002b) Unusually Expanded SSU Ribosomal DNA of Primary Osmotrophic Euglenids: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *J Mol Evol* 55: (6) 757-767
- Busse I, Preisfeld A (2003) Application of spectral analysis to examine phylogenetic signal among euglenid SSU rDNA data sets (Euglenozoa). *Organisms Diversity & Evolution* 3: (1) 1-12
- Caetano-Anolles G (2002a) Evolved RNA secondary structure and the rooting of the universal tree of life. *Journal of Molecular Evolution* 54: (3) 333-345
- Caetano-Anolles G (2002b) Tracing the evolution of RNA structure in ribosomes. *Nucleic Acids Res* 30: (11) 2575-2587
- Caetano-Anolles G (2002c) Tracing the evolution of RNA structure in ribosomes. *Nucleic Acids Research* 30: (11) 2575-2587
- Carlos AA, Baillie BK, Kawachi M, Maruyama T (1999) Phylogenetic position of *Symbiodinium* (Dinophyceae) isolates from tridacnids (Bivalvia), cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft coral (Anthozoa), and a free-living strain. *Journal of Phycology* 35: (5) 1054-1062
- Carroll DJ, Kempf SC (1990) Laboratory culture of the aeolid nudibranch *Berghia verrucicornis* (Mollusca, Opisthobranchia) - some aspects of its development and life history. *Biological Bulletin* 179: (3) 243-253
- Castresana J, Lubben M, Saraste M, Higgins DG (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *Embo Journal* 13: (11) 2516-2525
- Cavalier-Smith T. (1991). Cell diversification in heterotrophic flagellates. On *The Biology of Free-Living Heterotrophic Flagellates*.
- Cavalier-Smith T (1993) Evolution and diversity of zooflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: (5) 603-605
- Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73: (3) 203-266
- Cavalier-Smith T (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science* 5: (4) 174-182
- Cavalier-Smith T, Chao EE (2004) Protalveolate phylogeny and systematics and the origins of Sporozoa and dinoflagellates (phylum Myzozoa nom. nov.). *European Journal of Protistology* 40: (3) 185-212
- Chalwatzis N, Baur A, Stetzer E, Kinzelbach R, Zimmermann FK (1995) Strongly expanded 18S rRNA genes correlated with a peculiar morphology in the insect order of Strepsiptera. *Zoology* 98: 115-126
- Chan YL, Olvera J, Wool IG (1983) The structure of rat 28S ribosomal ribonucleic-acid inferred from the sequence of nucleotides in a gene. *Nucleic Acids Research* 11: (22) 7819-7831
- Choe CP, Hancock JM, Hwang UW, Kim W (1999) Analysis of the primary sequence and secondary structure of the unusually long SSU rRNA of the soil bug, *Armadillidium vulgare*. *Journal of Molecular Evolution* 49: (6) 798-805

- Clark CG, Tague BW, Ware VC, Gerbi SA (1984) *Xenopus laevis* 28S ribosomal RNA - a secondary structure model and its evolutionary and functional implications. *Nucleic Acids Research* 12: (15) 6197-6220
- Collins AG, Schuchert P, Marques AC, Jankowski T, Medina M, Schierwater B (2006) Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology* 55: (1) 97-115
- Crease TJ, Colbourne JK (1998) The unusually long small-subunit ribosomal RNA of the crustacean, *Daphnia pulex*: sequence and predicted secondary structure. *Journal of Molecular Evolution* 46: (3) 307-313
- Crease TJ, Taylor DJ (1998) The origin and evolution of variable-region helices in V4 and V7 of the small-subunit ribosomal RNA of branchiopod crustaceans. *Molecular Biology and Evolution* 15: (11) 1430-1446
- Cuvier G. (1817). *Le règne animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée. Avec figures, dessinées d'après nature. Tome II, contenant les reptiles, les poissons, les mollusques et les annélides.* Paris. (Deterville), 532 pp.
- De Rijk P, De Wachter R (1997) RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 25: (22) 4679-4684
- De Rijk P, Wuyts J, De Wachter R (2003) RnaViz 2: an improved representation of RNA secondary structure. *Bioinformatics* 19: (2) 299-300
- Deane JA, Fraunholz M, Su V, Maier UG, Martin W, Durnford DG, McFadden GI (2000) Evidence for nucleomorph to host nucleus gene transfer: light-harvesting complex proteins from cryptomonads and chlorarachniophytes. *Protist* 151: (3) 239-52.
- DeWachter R, Neefs JM, Goris A, Vandeppeer Y (1992) The gene coding for small ribosomal-subunit RNA in the basidiomycete *Ustilago maydis* contains a group I intron *Nucleic Acids Research* 20: (6) 1251-1257
- Dinapoli A, Klusmann-Kolb A (2010) The long way to diversity - Phylogeny and evolution of the Heterobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: (1) 60-76
- Dreyer H, Wägele J-W (2001) Parasites of crustaceans (Isopoda: Bopyridae) evolved from fish parasites: Molecular and morphological evidence. *Zoology* 103: 157-178
- Edmunds M (1968) Eolid Mollusca from Ghana with further details of west atlantic species. *Bulletin of Marine Science* 18: (1) 203-219
- Edmunds M (1970) Opisthobranchiate Mollusca from Tanzania. II. Eolidacea (Cuthonidae, Piseinotecidae and Facelilnidae). *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 15-57
- Edmunds M (1971) Opisthobranchiate Mollusca from Tanzania (Suborder - Dordidacea). *Zoological Journal of the Linnean Society* 50: (4) 339-396
- Edmunds M (1975) An eolid nudibranch feeding on Bryozoa. *The Veliger* 17: (3) 269-270

- Edmunds M (1981) Opisthobranchiate Mollusca from Ghana - Chromodorididae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 72: (2) 175-201
- Eliot CNE. (1910). *A monograph of the british nudibranchiate Mollusca*, 1-198 pp.
- Evertsen J, Burghardt I, Johnsen G, Wägele H (2007) Retention of functional chloroplasts in some sacoglossans from the Indo-Pacific and Mediterranean. *Marine Biology* 151: (6) 2159-2166
- Fast NM, Xue LR, Bingham S, Keeling PJ (2002) Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: (1) 30-37
- Fauci A, Toonen RJ, Hadfield MG (2007) Host shift and speciation in a coral-feeding nudibranch. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: (1606) 111-119
- Felsenstein J (1978) Case in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27: (4) 401-410
- Felsenstein J (1988) Phylogenies from molecular sequences - inference and reliability. *Annual Review of Genetics* 22: 521-565
- Ferussac A (1822) Tableaux Systematiques des Animaux mollusques. *Suivie d'un Prodrôme Générale* I-XLVII: 1-110
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: (5) 294-299
- Foster PG, Jermini LS, Hickey DA (1997) Nucleotide composition bias affects amino acid content in proteins coded by animal mitochondria. *Journal of Molecular Evolution* 44: (3) 282-288
- Freudenthal HD (1962) *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a Zooxanthella - taxonomy, life cycle, and morphology. *Journal of Protozoology* 9: (1) 45-52
- Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, Gunderson J, Ariztiacarmona EV, Sogin ML (1991) Ribosomal-RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptosporidium parvum* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates and ciliates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 45: (1) 147-154
- Gorski JL, Gonzalez IL, Schmickel RD (1987) The secondary structure of human 28S ribosomal RNA: The structure and evolution of a mosaic ribosomal RNA gene. *Journal of Molecular Evolution* 24: (3) 236-251
- Gosliner TM (1979) The systematics of the Aeolidacea (Nudibranchia, Mollusca) of the hawaiian islands, with descriptions of 2 new species. *Pacific Science* 33: (1) 37-77
- Gosliner TM (1981) A new species of Tergipedid-Nudibranch from the coast of California. *Journal of Molluscan Studies* 47: 200-205
- Gosliner TM, Griffiths RJ (1981) Description and revision of some South African aeolidacean Nudibranchia (Mollusca, Gastropoda). *Annals of the South African Museum* 84: (2) 105-150
- Gosliner TM, Ghiselin MT (1984) Parallel evolution in opisthobranch gastropods and its implications for phylogenetic methodology. *Systematic Zoology* 33: (3) 255-274

- Gosliner TM (1985) The aeolid nudibranch family aeoliidae from tropical southern africa. *Annals of the south african museum* 95: (6) 233-267
- Gosliner TM. (1987). *Nudibranchs of southern Africa, a guide to opisthobranch molluscs of southern Africa*: Sea Challengers, 136 pp.
- Gosliner TM, Kuzirian AM (1990) Two new species of Flabellinidae (Ophistobranchia: Aeolidacea) from Baja california. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 47: (1) 1-15
- Gosliner TM, Willan RC (1991) Review of the Flabellinidae (Nudibranchia, Aeolidacea) from the tropical Indo-Pacific, with the descriptions of 5 new species. *Veliger* 34: (2) 97-133
- Gosliner TM, Gonzalez-Duarte MM, Cervera JL (2007) Revision of the systematics of Babakina Roller, 1973 (Mollusca : Opisthobranchia) with the description of a new species and a phylogenetic analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society* 151: (4) 671-689
- Grande C, Templado J, Cervera JL, Zardoya R (2002) The complete mitochondrial genome of the nudibranch *Roboastra europaea* (Mollusca, Gastropoda) supports the monophyly of opisthobranchs. *Molecular Biology and Evolution* 19: (10) 1672-1685
- Grande C, Templado J, Cervera JL, Zardoya R (2004a) Phylogenetic relationships among Opisthobranchia (Mollusca : Gastropoda) based on mitochondrial cox 1, trnV, and rrnL genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: (2) 378-388
- Grande C, Templado J, Cervera JL, Zardoya R (2004b) Molecular phylogeny of Euthyneura (Mollusca : Gastropoda). *Molecular Biology and Evolution* 21: (2) 303-313
- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: (5407) 1476-1481
- Gunderson JH, Sogin ML (1986) Length variation in eukaryotic rRNAs: small subunit rRNAs from the protists *Acanthamoeba castellanii* and *Euglena gracilis*. *Gene* 44: (1) 63-70
- Gutell RR (1993) Collection of small subunit (16S 16S-like) ribosomal-RNA structures. *Nucleic Acids Research* 21: (13) 3051-3054
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 41: 95-98
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of escherichia-coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: (4) 557-580
- Harper JT, Waanders E, Keeling PJ (2005) On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 487-496
- Harris EH, Boynton JE, Gillham NW (1994) Chloroplast ribosomes and protein-synthesis. *Microbiological Reviews* 58: (4) 700-754
- Hasegawa M, Hashimoto T (1993) Ribosomal RNA trees misleading? *Nature* 361: (6407) 23
- Hassouna N, Michot B, Bachelierie JP (1984) The complete nucleotide sequence of mouse 28S ribosomal RNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit ribosomal RNA in higher eucaryotes. *Nucleic Acids Research* 12: (8) 3563-3583

- Hatzoglou E, Rodakis GC, Lecanidou R (1995) Complete sequence and gene organisation of the mitochondrial genomic of the land snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* 140: (4) 1353-1366
- Häuber MM, Muller SB, Speth V, Maier UG (1994) How to evolve a complex plastid - a hypothesis. *Botanica Acta* 107: (6) 383-386
- Hendy MD, Penny D (1989) A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Systematic Zoology* 38: (4) 297-309
- Hillis DM, Pollock DD, McGuire JA, Zwickl DJ (2003) Is sparse taxon sampling a problem for phylogenetic inference? *Systematic Biology* 52: (1) 124-126
- Hinkle G, Leipe DD, Nerad TA, Sogin ML (1994) The unusually long small subunit ribosomal RNA of *Phreatamoeba balamuthi*. *Nucleic Acids Research* 22: (3) 465-469
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Hall B (2001) MrBayes: A program for the Bayesian inference of phylogeny.
- Hwang UW, Ree HI, Kim W (2000) Evolution of hypervariable regions V4 and V7 of insect 18S rRNA and their phylogenetic implications. *Zoological Science* 17: 111-121
- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194
- Jones RJ, Kildea T, Hoegh-Guldberg O (1999) PAM chlorophyll fluorometry: a new in situ technique for stress assessment in scleractinian corals, used to examine the effects of cyanide from cyanide fishing. *Marine Pollution Bulletin* 38: (10) 864-874
- Katoh K, Asimenos G, Toh H (2009) Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT.
- Keeling P (2004) A brief history of plastids and their hosts. *Protist* 155: (1) 3-7
- Keeling PJ, Burger G, Durnford DG, Lang BF, Lee RW, Pearlman RE, Roger AJ, Gray MW (2005) The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution* 20: (12) 670-676
- Kempf SC (1991) A primitive symbiosis between the aeolid nudibranch *Berghia verrucicornis* (Costa, 1867) and a zooxanthella. *Journal of Molluscan Studies* 57: 75-85
- Kiko R, Kramer M, Spindler M, Wagele H (2008) *Tergipes antarcticus* (Gastropoda, Nudibranchia): distribution, life cycle, morphology, anatomy and adaptation of the first mollusc known to live in Antarctic sea ice. *Polar Biology* 31: (11) 1383-1395
- Kitajima M, Butler WL (1975) Excitation-spectra for photosystem-I and photosystem-II in chloroplasts and spectral characteristics of distribution of quanta between 2 photosystems. *Biochim Biophys Acta* 408: (3) 297-305
- Klussmann-Kolb A, Dinapoli A (2006) Systematic position of the pelagic Thecosomata and Gymnosomata within Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda) - revival of the Pteropoda. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 44: (2) 118-129
- Klussmann-Kolb A, Dinapoli A, Kuhn K, Streit B, Albrecht C (2008) From sea to land and beyond - New insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). *Bmc Evolutionary Biology* 8: 1-16

- Kofoed CA, Skogsberg T (1928) The Dinoflagellata: The Dinophysoidae. *Harvard Coll., Mus. Comp. Zool. Mem* 51: 1-766
- Kromkamp JC, Forster RM (2003) The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal of Phycology* 38: (2) 103-112
- Kumar S (1996) PHYLTEST: a program for testing phylogenetic hypothesis. Version 2.0. *Institute of Molecular and Evolutionary Genetics and Department of Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.*
- Kurabayashi A, Ueshima R (2000) Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: Systematic implication of the genome organization. *Molecular Biology and Evolution* 17: (2) 266-277
- Kuvarina ON, Leander BS, Aleshin VV, Mylnikov AP, Keeling PJ, Simdyanov TG (2002) The phylogeny of colpodellids (alveolata) using small subunit rRNA gene sequences suggests they are the free-living sister group to apicomplexans. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: (6) 498-504
- LaJeunesse TC (2001) Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the its region: In search of a "species" level marker. *Journal of Phycology* 37: (5) 866-880
- Lamarck JBPA (1819) *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres*. Déterville , Paris. (6) 297-316
- Target B, Simon DL (1999) Markov Chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: (6) 750-759
- Leander BS, Keeling PJ (2003) Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 18: (8) 395-402
- Leander BS, Kuvarina ON, Aleshin VV, Mylnikov AP, Keeling PJ (2003) Molecular phylogeny and surface morphology of *Colpodella edax* (Alveolata): Insights into the phagotrophic ancestry of apicomplexans. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50: (5) 334-340
- Leander BS, Keeling PJ (2004) Early evolutionary history of dinoflagellates and apicomplexans (Alveolata) as inferred from hsp90 and actin phylogenies. *Journal of Phycology* 40: (2) 341-350
- Lesica P, Leary RF, Allendorf FW, Bilderback DE (1988) Lack Of Genic Diversity Within and Among Populations Of an Endangered Plant, *Howellia-Aquatilis*. *Conservation Biology* 2: (3) 275-282
- Liu H, Beckenbach AT (1992) Evolution of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase II Gene among 10 Orders of Insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: (1) 41-52
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25: (4) 402-408
- Lobban CS, Scheffter M, Simpson AGB, Pochon X, Pawlowski J, Foissner W (2002) *Maristentor diniferus* n. gen., n. sp., a giant heterotrich ciliate (Spirotrichea : Heterotrichida) with zooxanthellae, from coral reefs on Guam, Mariana Islands. *Marine Biology* 140: (2) 411-423

- Loh WKW, Cowlshaw M, Wilson NG (2006) Diversity of *Symbiodinium* dinoflagellate symbionts from the Indo-Pacific sea slug *Pteraeolidia ianthina* (Gastropoda : Mollusca). *Marine Ecology-Progress Series* 320: 177-184
- MacFarland FM (1923) The morphology of the nudibranch genus *Hancockia*. *Journal of Morphology* 38: (1) 65-104
- MacNae W (1954a) On the status of the generic names of the nudibranch genera *Catriona*, *Cratena*, *Hervia*, *Rizzolia* and *Trinchesia*. *Journal of Molluscan Studies* 31: (2) 52
- MacNae W (1954b) On some eolidacean nudibranchiate molluscs from South Africa. *Annals of the Natal Museum* 13: 1-50
- Martin R, Hess M, SchrodL M, Tomaschko KH (2009) Cnidosac morphology in dendronotacean and aeolidacean nudibranch molluscs: from expulsion of nematocysts to use in defense? *Marine Biology* 156: (3) 261-268
- Martin R, Tomaschko K-H, Heß M, Schrödl M (2010) Cnidosac-related structures in *Embletonia* (Mollusca, Nudibranchia) compared with dendronotacean and aeolidacean species. *The Open Marine Biology Journal*(4) 96-100
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *Journal of Molecular Biology* 288: (5) 911-940
- Mayfield AB, Hirst MB, Gates RD (2009) Gene expression normalization in a dual-compartment system: a real-time quantitative polymerase chain reaction protocol for symbiotic anthozoans. *Molecular Ecology Resources* 9: (2) 462-470
- Maynard BT, Kerr LJ, McKiernan JM, Jansen ES, Hanna PJ (2005) Mitochondrial DNA sequence and gene organization in Australian backup abalone *Haliotis rubra* (leach). *Marine Biotechnology* 7: (6) 645-658
- Michot B, Hassouna N, Bachelierie JP (1984) Secondary structure of mouse 28S ribosomal RNA and general model for the folding of the large ribosomal RNA in eucaryotes. *Nucleic Acids Research* 12: (10) 4259-4279
- Mieog JC, van Oppen MJH, Cantin NE, Stam WT, Olsen JL (2007) Real-time PCR reveals a high incidence of *Symbiodinium* clade D at low levels in four scleractinian corals across the Great Barrier Reef. Implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs* 26: (3) 449-457
- Mieog JC, Van Oppen MJH, Berkelmans R, Stam WT, Olsen JL (2009) Quantification of algal endosymbionts (*Symbiodinium*) in coral tissue using real-time PCR. *Molecular Ecology Resources* 9: (1) 74-82
- Mikkelsen PM (2002) Shelled Opisthobranchs. *Advances in Marine Biology* 42: 67-136
- Millen SV (1986) Northern, primitive tergipedid nudibranchs, with a description of a new species from the Canadian Pacific. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 64: (6) 1356-1362
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*

- Miller MC (1974) Aeolid nudibranchs (Gastropoda-Opisthobranchia) of family Glaucidae from New Zealand waters. *Zoological Journal of the Linnean Society* 54: (1) 31-61
- Miller MC (1977) Aeolid nudibranchs (Gastropoda: Opisthobranchia) of the family Tergipedidae from New Zealand waters. *Zoological Journal of the Linnean Society* 60: (3) 197-222
- Miller MC, Willan RC (1992) Redescription of *Embletonia gracile* Risbec, 1928 (Nudibranchia, Embletoniidae) - relocation to suborder Dendronotacea with taxonomic and phylogenetic implications. *Journal of Molluscan Studies* 58: 1-12
- Miller MC (2001) Aeolid nudibranchs (Gastropoda : Opisthobranchia) of the family Aeolidiidae from New Zealand waters. *Journal of Natural History* 35: (5) 629-662
- Miller MC (2004) An appraisal of the identity of the New Zealand species of the aeolid nudibranch family Tergipedidae (Gastropoda : Opisthobranchia). *Journal of Natural History* 38: (9) 1183-1192
- Milne-Edwards H (1848) Note sur la classification naturelle des mollusques gasteropodes. *Annales des Sciences Naturelles* 3: (9) 102-112
- Moore E, Gosliner T (2009) Three new species of *Phyllodesmium* Ehrenberg (Gastropoda: Nudibranchia: Aeolidioidea), and a revised phylogenetic analysis. *Zootaxa*(2201) 30-48
- Moore RB, Obornik M, Janouskovec J, Chrudimsky T, Vancova M, Green DH, Wright SW, Davies NW, Bolch CJS, Heimann K, Slapeta J, Hoegh-Guldberg O, Logsdon JM, Carter DA (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451: (7181) 959-963
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA invitro - the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273
- Noren F, Moestrup O, Rehnstam-Holm AS (1999) *Parvilucifera infectans* Norén et Moestrup gen. et sp nov. (Perkinsozoa phylum nov.): a parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology* 35: (3) 233-254
- Nunn GB, Theisen BF, Christensen B, Arctander P (1996) Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order Isopoda. *Journal of Molecular Evolution* 42: (2) 211-223
- Nylander JAA. (2001). *Taxon sampling in phylogenetic analysis: Problems and strategies reviewed*. Unpublished manuscript, Introductory Research Essay No. 1. Uppsala University, Sweden.
- Odhner NH (1934) The Nudibranchiata. British Antarctic (Terra Nova) expedition 1910. *British Museum (Natural History) Report. Zoology* 7: 229-310
- Odhner NH (1939) Opisthobranchiate Mollusca from the western and northern coasts of Norway. *Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter (Meddelels fra Trondheims Biologiske Stasjon, 115)* 1: 1-93
- Olsen GJ (1988) Phylogenetic analysis using ribosomal-RNA. *Methods in Enzymology* 164: 793-812

- Ortiz DM, Gosliner TM (2003) A new species of *Phyllodesmium* Ehrenberg 1831 (Mollusca, Nudibranchia) from the tropical Indo-Pacific. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 54: 161-168
- Ortiz DM, Gosliner TM (2008) Anatomical review and preliminary phylogeny of the facelinid nudibranchs (Opisthobranchia : Aeolidina) of the taxon *Phyllodesmium* Ehrenberg, 1831. *Veliger* 50: (1) 1-23
- Pawlowski J, Bolivar I, Fahrni JF, De Vargas C, Bowser SS (1999) Molecular evidence that *Reticulomyxa filosa* is a freshwater naked foraminifer. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: (6) 612-617
- Philippe H (2000) Opinion: Long branch attraction and protist phylogeny. *Protist* 151: (4) 307-16.
- Philippe H, Snell EA, Baptiste E, Lopez P, Holland PWH, Casane D (2004) Phylogenomics of eukaryotes: Impact of missing data on large alignments. *Molecular Biology and Evolution* 21: (9) 1740-1752
- Picón M, Gutell RR, Ehrlich R, Zaha A (1996) Characterization of a flatworm ribosomal RNA-encoding gene: promoter sequence and small subunit rRNA secondary structure. *Gene* 171: (2) 215-220
- Pochon X, Pawlowski J, Zaninetti L, Rowan R (2001) High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Marine Biology* 139: (6) 1069-1078
- Pochon X, LaJeunesse TC, Pawlowski J (2004) Biogeographic partitioning and host specialization among foraminiferan dinoflagellate symbionts (*Symbiodinium*; Dinophyta). *Marine Biology* 146: (1) 17-27
- Pochon X, Montoya-Burgos JI, Stadelmann B, Pawlowski J (2006) Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: (1) 20-30
- Pochon X, Gates RD (2010) A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawaii. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: (1) 492-497
- Pola M, Gosliner TM (2010) The first molecular phylogeny of cladobranchian opisthobranchs (Mollusca, Gastropoda, Nudibranchia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: (3) 931-941
- Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: (9) 817-818
- Preisfeld A, Busse I, Klingberg M, Talke S, Ruppel HG (2001) Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 751-758
- Remigio EA, Hebert PDN (2003) Testing the utility of partial co1 sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: (3) 641-647
- Renger G, Dohnt G, Kayed A, Voss M, Gräber P (1987) Die Chlorophyll-a-Fluoreszenz als Indikator des Funktionszustandes des Photosyntheseapparates in Pflanzen. Theoretische Grundlagen und praktische Anwendung. *Archiv für Hydrobiologie Beih.*(29) 1-24

- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: (2) 154-160
- Rowan R, Knowlton N (1995) Intraspecific density and ecological zonation in coral algal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: (7) 2850-2853
- Rowan R (1998) Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *Journal of Phycology* 34: (3) 407-417
- Rudman B. (2007). *Comment on Flabellina bicolor feeding by Leanne & David Atkinson* [Message in] Sea Slug Forum., Australian Museum, Sydney:
- Rudman WB (1981a) The anatomy and biology of alcyonarian-feeding aeolid opisthobranch molluscs and their development of symbiosis with zooxanthellae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 72: (3) 219-262
- Rudman WB (1981b) Further studies on the anatomy and ecology of opisthobranch molluscs feeding on the scleractinian coral *Porites*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 71: (4) 373-412
- Rudman WB (1982) The taxonomy and biology of further aeoliacean and arminacean nudibranch molluscs with symbiotic zooxanthellae. *Zoological Journal of the Linnean Society London* 74: 147-196
- Rudman WB (1991) Further-Studies on the taxonomy and biology of the octocoral feeding genus *Phyllodesmium* Ehrenberg, 1831 (Nudibranchia, Aeolidioidea). *Journal of Molluscan Studies* 57: 167-203
- Rudman WB. (2001a, Mai 8). *Phyllodesmium poindimiei* (Risbec, 1928) [In] Sea Slug Forum, Australian Museum, Sydney, <http://www.seaslugforum.net/factsheet/phylpoin>
- Rudman WB. (2001b, April 29). *Phyllodesmium macphersonae* (Burn, 1962) [In] Sea Slug Forum, Australian Museum, Sydney, <http://www.seaslugforum.net/factsheet/phyllmacp>
- Rudman WB. (2002, September 11). *Embletonia gracilis* Risbec 1928 [In] Sea Slug Forum, Australian Museum, Sydney, <http://www.seaslugforum.net/factsheet/emblgrac>
- Rumpho ME, Summer EJ, Manhart JR (2000) Solar-powered sea slugs. Mollusc/ algal chloroplast symbiosis. *Plant Physiology* 123: (1) 29-38
- Saldarriaga JF, McEwan ML, Fast NM, Taylor FJR, Keeling PJ (2003) Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 355-365
- Salvini-Plawen Lv (1991) The status of the Rhodopidae (Gastropoda, Euthyneura). *Malacologia* 32: (2) 301-311
- Salvini-Plawen Lv (1990) Origin, phylogeny and classification of the phylum Mollusca. *Iberus* 9: 1-33
- Santos SR, Gutierrez-Rodriguez C, Coffroth MA (2003a) Phylogenetic identification of symbiotic dinoflagellates via length heteroplasmy in domain V of chloroplast large subunit (cp23S)-ribosomal DNA sequences. *Marine Biotechnology* 5: (2) 130-140
- Santos SR, Gutierrez-Rodriguez C, Lasker HR, Coffroth MA (2003b) *Symbiodinium* sp associations in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* in the Bahamas: high levels of genetic

- variability and population structure in symbiotic dinoflagellates. *Marine Biology* 143: (1) 111-120
- Schlesinger A, Goldshmid R, Hadfield MG, Kramarsky-Winter E, Loya Y (2009) Laboratory culture of the aeolid nudibranch *Spurilla neapolitana* (Mollusca, Opisthobranchia): life history aspects. *Marine Biology* 156: (4) 753-761
- Schmekel L, Kälker H (1976) Bau und Funktion des Cnidosacks der Aeolidoidea (Gastropoda Nudibranchia). *Zoomorphologie* 86: 41-60
- Schmekel L (1979) Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Regeneration bei Nudibranchiern. *Malacologia* 18: 413-420
- Schmekel L, Portmann A. (1982). *Opisthobranchia des Mittelmeeres: Nudibranchia und Saccoglossa*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 410 pp.
- Schmekel L (1985) Aspects of evolution within the opisthobranchs. *The Mollusca. Trueman R. & Clarke, M.R. (eds.) Academic Press, New York* 10 Evolution: 221-267
- Schoenberg DA, Trench RK (1980) Genetic variation in *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. 1. Isoenzyme and soluble-protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microadriaticum*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 207: (1169) 405-427
- Schreiber U. (2004). Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In G. GC Papageorgiou (Ed.), *Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview* (pp. 279-319). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Schrödl M (1999) *Hancockia schoeferti*, spec. nov., a new dendronotoidean nudibranch species from central Chile. *Spixiana* 22: 247-254
- Serodio J, Pereira S, Furtado J, Silva R, Coelho H, Calado R (2010) In vivo quantification of kleptoplastic chlorophyll a content in the "solar-powered" sea slug *Elysia viridis* using optical methods: spectral reflectance analysis and PAM fluorometry. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9: (1) 68-77
- Shimodaira H, Hasegawa M (2001) CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 17: (12) 1246-1247
- Shimodaira H (2002) An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic Biology* 51: (3) 492-508
- Shuman S (1994) Novel approach to molecular-cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry* 269: (51) 32678-32684
- Silberman JD, Collins AG, Gershwin LA, Johnson PJ, Roger AJ (2004) Ellobiopsids of the genus *Thalassomyces* are alveolates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51: (2) 246-252
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: (6) 651-701

- Sitte P (1993) Symbiogenetic evolution of complex cells and complex plastids. *European Journal of Protistology* 29: (2) 131-143
- Smith RT, Pinzon JH, LaJeunesse TC (2009) *Symbiodinium* (Dinophyta) diversity and stability in aquarium corals. *Journal of Phycology* 45: (5) 1030-1036
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH (1986) Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 83: (5) 1383-1387
- Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA (1989) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243: (4887) 75-77
- Söller R, Wohltmann A, Witte H, Blohm D (2001) Phylogenetic relationships within terrestrial mites (Acari : Prostigmata, Parasitengona) inferred from comparative DNA sequence analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18: (1) 47-53
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: (21) 2688-2690
- Steel MA, Lockhart PJ, Penny D (1993) Confidence in evolutionary trees from biological sequence data. *Nature* 364: (6436) 440-442
- Swofford DL (2003) PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takezaki N, Rzhetsky A, Nei M (1995) Phylogenetic Test Of the Molecular Clock and Linearized Trees. *Molecular Biology and Evolution* 12: (5) 823-833
- Talke S, Preisfeld A (2002) Molecular evolution of euglenozoan paraxonemal rod genes par1 and par2 coincides with phylogenetic reconstruction based on small subunit rDNA data. *Journal of Phycology* 38: (5) 995-1003
- Tarrio R, Rodriguez-Trelles F, Ayala FJ (2000) Tree rooting with outgroups when they differ in their nucleotide composition from the ingroup: The *Drosophila saltans* and *willistoni* groups, a case study. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: (3) 344-349
- Tautz D, Hancock JM, Webb DA, Tautz C, Dover GA (1988) Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 5: (4) 366-76.
- Thollesson M (1999) Phylogenetic analysis of dorid nudibranchs (Gastropoda : Doridacea) using the mitochondrial 16S rRNA gene. *Journal of Molluscan Studies* 65: 335-353
- Thompson TE (1972) Eastern australian Dendronotoidea (Gastropoda:Opisthobranchia). *Zoological Journal of the Linnean Society* 51: (1) 63-77
- Thompson TE, Brown GH. (1984). *Biology of ophistobranch molluscs* (Vol. II). London: The Ray Society, 229 pp.
- Trench RK (1993) Microalgal - invertebrates symbioses: a review. *Endocytobiosis and Cell Research* 9: (2-3) 135-175
- Ulstrup KE, Van Oppen MJH (2003) Geographic and habitat partitioning of genetically distinct zooxanthellae (*Symbiodinium*) in *Acropora* corals on the Great Barrier Reef. *Molecular Ecology* 12: (12) 3477-3484

- Valdes A, Campillo OA (2004) Systematics of pelagic aeolid nudibranchs of the family Glaucidae (Mollusca, Gastropoda). *Bulletin of Marine Science* 75: (3) 381-389
- van Oppen MJH, Palstra FP, Piquet AMT, Miller DJ (2001) Patterns of coral-dinoflagellate associations in *Acropora*: significance of local availability and physiology of *Symbiodinium* strains and host-symbiont selectivity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268: (1478) 1759-1767
- van Oppen MJH, Mieog JC, Sanchez CA, Fabricius KE (2005) Diversity of algal endosymbionts (zooxanthellae) in octocorals: the roles of geography and host relationships. *Molecular Ecology* 14: (8) 2403-2417
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F (2002) Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real time RT-PCR. *Analytical Biochemistry* 303: (1) 95-98
- Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *The EMBO Journal* 20: (10) 2587-2595
- Vogler AP, Welsh A, Hancock JM (1997) Phylogenetic analysis of slippage-like sequence variation in the V4 rRNA expansion segment in tiger beetles (Cicindelidae). *Molecular Biology and Evolution* 14: (1) 6-19
- Vonnemann V, Schrodli M, Klussmann-Kolb A, Wagele H (2005) Reconstruction of the phylogeny of the Opisthobranchia (Mollusca : Gastropoda) by means of 18S and 28S rRNA gene sequences. *Journal of Molluscan Studies* 71: 113-125
- Wägele H, Willan RC (2000) Phylogeny of the Nudibranchia. *Zoological Journal of the Linnean Society* 83: 181
- Wägele H (2001) Schmetterlinge der Meere - Vielfalt und Farbenpracht bei Hinterkiemerschnecken. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 54: (2) 61-70
- Wägele H, Johnsen G (2001) Observations on the histology and photosynthetic performance of "solar-powered" Opisthobranchs (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia) containing symbiotic chloroplasts or zooxanthellae. *Organisms Diversity & Evolution* 1: (3) 193-210
- Wägele H, Vonnemann V, Wägele J-W (2003) Towards a phylogeny of the Opisthobranchia. *Molecular systematics and phylogeography of Mollusks* Lydeard C., Lindberg D. (Hrsg.). Smithsonian Books. Washington, London: 185-228
- Wägele H (2004) Potential key characters in Opisthobranchia (Gastropoda, Mollusca) enhancing adaptive radiation. *Organisms Diversity & Evolution* 4: 175-188
- Ware VC, Tague BW, Clark CG, Gourse RL, Brand RC, Gerbi SA (1983) Sequence analysis of 28S ribosomal DNA from the amphibian *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Research* 11: (22) 7795-7817
- Wells FE, Bryce CW. (1993). *Sea slugs and their relatives of Western Australia*. Western Australian Museum, I-viii, 1-184 pp.
- Wilcox LW, Lewis LA, Fuerst PA, Floyd GL (1992) Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae. *Molecular Biology and Evolution* 9: (6) 1103-1118

- Wilcox TP (1998) Large-subunit ribosomal RNA systematics of symbiotic dinoflagellates: Morphology does not recapitulate phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: (3) 436-448
- Willan RC (1987) Phylogenetic systematics and zoogeography of Australian nudibranchs. 1. Presence of the aeolid *Godiva quadricolor* (Barnard, 1927) in Western Australia. *Journal of the Malacological Society of Australia*(8) 71-85
- Williams GC, Gosliner T (1979) Two new species of nudibranchiate molluscs from the west coast of North America, with a revision of the family Cuthonidae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 67: (3) 203-223
- Woese CR, Winker S, Gutell RR (1990) Architecture of ribosomal RNA constraints on the sequence of tetra-loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: (21) 8467-8471
- Wollscheid-Lengeling E, Boore J, Brown W, Wägele H (2001) The phylogeny of Nudibranchia (Opisthobranchia, Gastropoda, Mollusca) reconstructed by three molecular markers. *Organisms Diversity & Evolution* 1: (4) 241-256
- Wollscheid E, Wägele H (1999) Initial results on the molecular phylogeny of the nudibranchia (Gastropoda, Opisthobranchia) based on 18S rDNA data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: (2) 215-226
- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: Structure & evolution. *International Review of Cytology* 141: 173-216
- Wuyts J, Van de Peer Y, De Wachter R (2001) Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 29: (24) 5017-5028
- Zhang ZD, Green BR, Cavalier-Smith T (2000) Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: A possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. *Journal of Molecular Evolution* 51: (1) 26-40
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31: (13) 3406-3415

6. Anhang

6.1 Publikationen / Poster

Bleidißel, S., Waegele, H. & Preisfeld, A: Symbiont distribution in different aeolidian species. in: "Mehlhorn H, Klimpel S & Palm HW (2010): Science in Parasitology and Protozoology solves problems. Joint Meeting of the German Societies of Parasitology and Protozoology. 288 Seiten. Düsseldorf University Press. ISBN 978-3-940671-37-0"

Bleidißel S., Waegele H. & Preisfeld A. The swapped symbiont: Molecular identification of symbiotic dinoflagellates in the nudibranch seaslug *Phyllodesmium* (Nudibranchia; Mollusca). in: Gradstein S, et al. (2008) Systematics 2008 Programme and Abstracts. 426 pp. Göttingen University Press. ISBN 978—3-940344-23-6

20.-23.02.2007

9. GfBS meeting, Wien, Austria

S. Bleidissel, B. Misof, A. Preisfeld, H. Wägele

Phylogeny of the Aeolidioidea with Notes on their Food

Kurzbeitrag in:

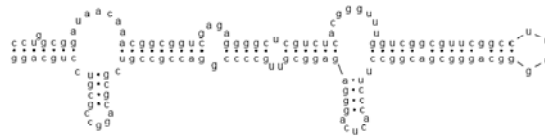
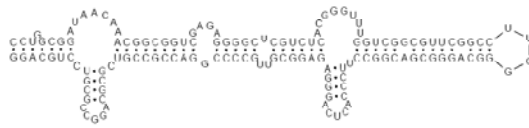
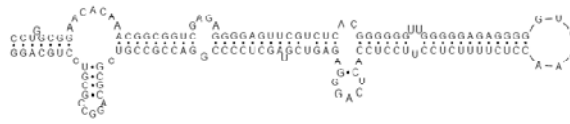
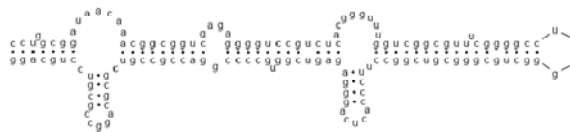
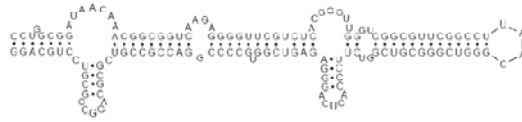
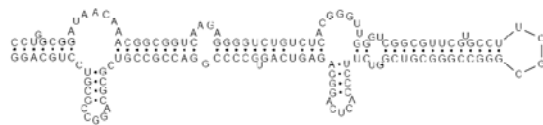
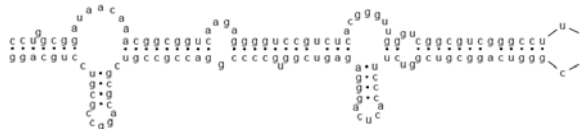
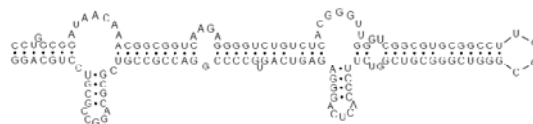
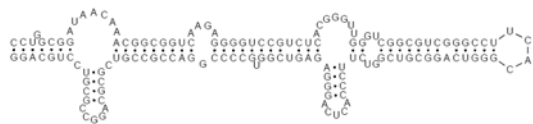
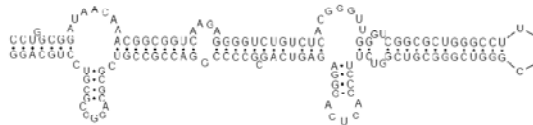
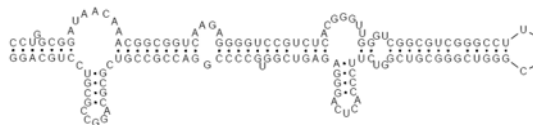
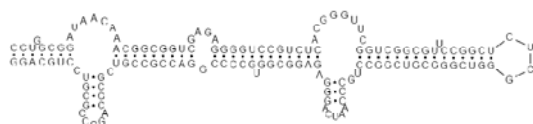
Quarks & Co (WDR)

Thema: Evolution

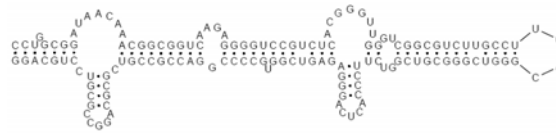
Wie wir wurden, was wir sind

6.2 Abkürzungsverzeichnis

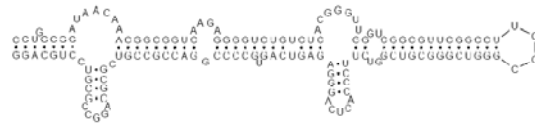
Abb.	Abbildung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
COI	Cytochromoxidase Untereinheit I
cpLSU	plastidäre große ribosomale Untereinheit
ddest.	doppeltdestilliert
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Engl.: Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
EtoH	Ethanol
Fa.	Firma
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
kb	Kilobasenpaar
Konz.	Konzentration
LSU	Engl.: Large subunit, große ribosomale Untereinheit
m	milli
M	Molar (Mol pro Liter)
min	Minute
ML	Maximum Likelihood
MP	Maximum Parsimony
mtLSU	mitochondriale große ribosomale Untereinheit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P	piko
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rDNA	Ribosomale DNA: Gene, die für die ribosomale RNA kodieren
RNA	Ribonukleinsäure (Engl.: Ribonucleic acid)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
SSU	Engl.: Small subunit, kleine ribosomale Untereinheit
Stammlsg.	Stammlösung
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
u	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
verd.	verdünnt
Vol.-%	Volumenprozent
w/v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro

Facelina bostoniensis*Facelina drummondii**Phidiana indica**Phidiana lynceus**Phyllodesmium briareum**Phyllodesmium crypticum**Phyllodesmium magnum**Phyllodesmium jakobsenae**Phyllodesmium colemani**Phyllodesmium koehleri**Phyllodesmium longicirrum**Phyllodesmium macphersonae*

Phyllodesmium poindemiei

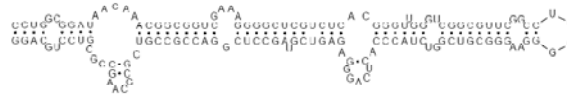


Phyllodesmium rudmani

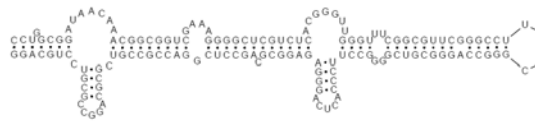


Favorinidae

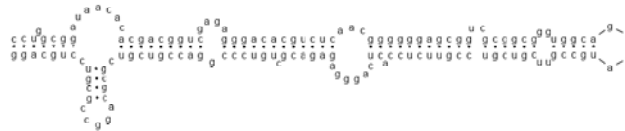
Cratena lineata



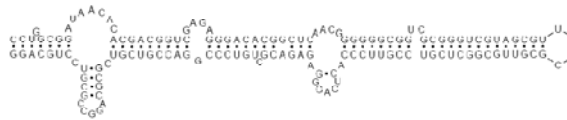
Cratena peregrine



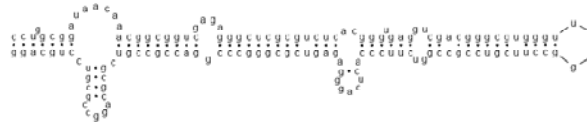
Favorinus sp.



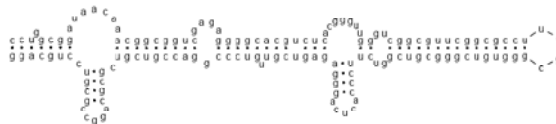
Favorinus tsuruganus



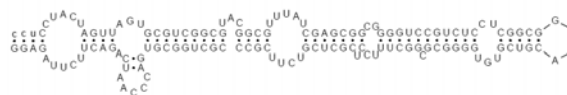
Godiva banyulensis



Nanuca sebastiani

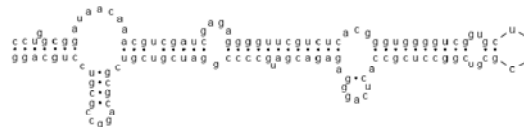


Pteraeolidia ianthina (AU, Botany Bay)



Glaucidae

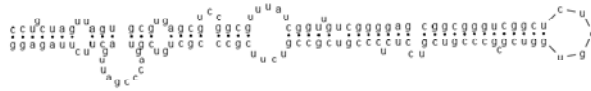
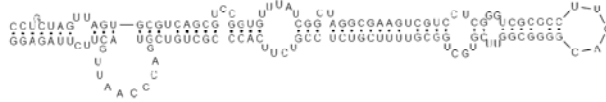
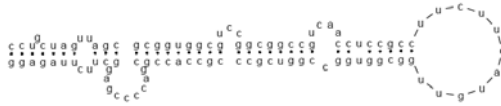
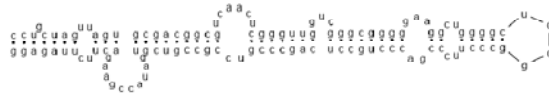
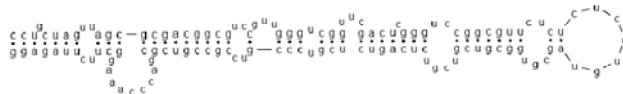
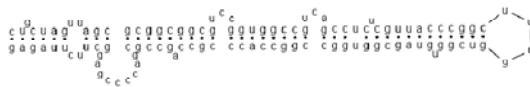
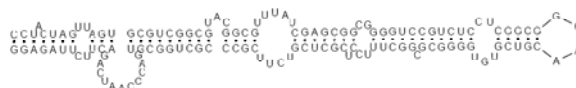
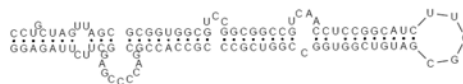
Glaucus atlanticus



Notaeolidiidae

Notaeolidia depressa



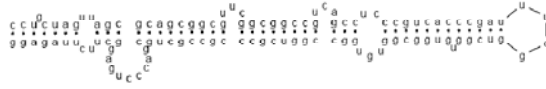
Flabellinidae***Calmella cavolini* 63*****Flabellina affinis******Flabellina babai******Flabellina exoptata******Flabellina falklandica*
(Fehlbestimmung)*****Flabellina* sp.*****Flabellina verrucosa******Flabellina rubrolineata******Flabellina pedata******Flabellina ischitana******Flabellina bicolor***

Tergipedidae

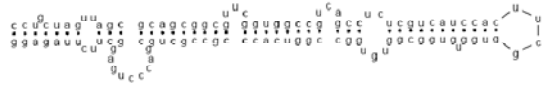
Cuthona caerulea



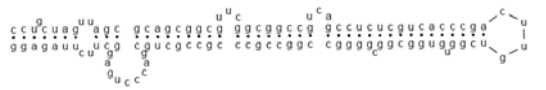
Cuthona foliata



Cuthona nana



Cuthona sibogae 28



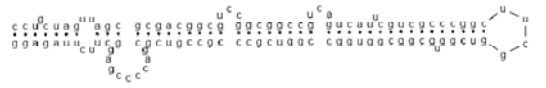
Phestilla melanobrachia



Tergipes antarcticus

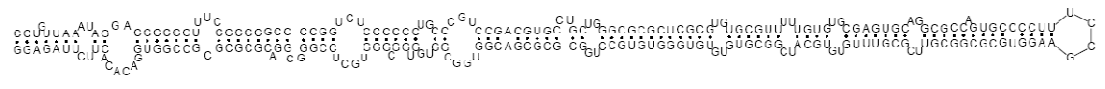


Tergipes tergipes

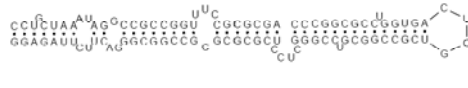


Außengruppe

Bathydoris clavigera



Chromodoris krohni



Hypselodoris villafranca

