

**Progenetische Evolution als Prinzip  
zur Entstehung neuer Arten  
innerhalb der Polychaeten  
am Beispiel der Dinophilidae/„Dorvilleidae“  
(„Polychaeta“, Annelida)**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie/Chemie an der Universität Osnabrück,  
vorgelegt von

Torsten H. Struck  
aus Ibbenbüren

Osnabrück, Mai 2003

Gutachter:

Apl.-Prof. Dr. Günter Purschke  
Prof. Dr. Wilfried Westheide

**Anschrift:**

Torsten Struck  
Sternalerweg 25  
49479 Ibbenbüren

*Für meine Frau Heike,  
meinen Eltern Mechthild und Josef  
und meiner Schwester Kerstin.*



*„Nichts in der Biologie ergibt einen Sinn,  
so man es nicht im Lichte der Evolution betrachtet.“*

Theodosius Dobzhansky

*„Organismen sind selektiven Kräften nicht passiv unterworfen,  
sondern beteiligen sich aktiv an der Gestaltung ihrer Zukunft.“*

Steven Rose



# Inhaltsverzeichnis

|   |          |
|---|----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>  | <b>1</b> |
| <b>2. Material &amp; Methoden.....</b>  | <b>5</b> |
| 2.1 <i>Material</i> .....   | 5        |
| 2.1.1 Gesammeltes Tiermaterial .....  | 5        |
| 2.1.2 Verwendete Chemikalien & häufig verwendete Lösungen.....  | 7        |
| 2.1.3 Verwendete Programme (in alphabetischer Reihenfolge).....   | 9        |
| 2.1.3.1 Chromas 1.5 .....   | 9        |
| 2.1.3.2 ClustalW.....   | 10       |
| 2.1.3.3 GeneDoc.....  | 10       |
| 2.1.3.4 MetaPIGA .....  | 10       |
| 2.1.3.5 Modeltest.....  | 12       |
| 2.1.3.6 MrBayes .....   | 12       |
| 2.1.3.7 MrModeltest.....  | 14       |
| 2.1.3.8 PAUP 4.0 b10 .....  | 14       |
| 2.1.3.9 Phylip .....  | 16       |
| 2.1.3.10 Puzzle.....  | 16       |
| 2.1.3.11 TreeView.....  | 17       |
| 2.2 <i>Methoden</i> .....   | 17       |
| 2.2.1 Extraktion von Organismen .....   | 17       |
| 2.2.2 Aufbereitung & Lagerung des Tiermaterials .....   | 18       |
| 2.2.3 DNA-Isolierung .....  | 18       |
| 2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration .....  | 20       |
| 2.2.5 Amplifikation der Genprodukte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion .....   | 20       |
| 2.2.5.1 Allgemeines.....  | 20       |
| 2.2.5.2 Spezifikationen bei der Amplifikation der 18S-rDNA.....   | 24       |
| 2.2.5.3 Spezifikationen bei der Amplifikation der 28S-rDNA.....   | 24       |
| 2.2.5.4 Spezifikationen bei der Amplifikation der CO I .....  | 24       |
| 2.2.6 Gelelektrophorese .....   | 25       |
| 2.2.7 Reinigung der Amplifikationsprodukte.....   | 26       |
| 2.2.8 Sequenzierung der Amplifikate.....  | 26       |
| 2.2.9 Bearbeitung der Sequenzen.....  | 28       |
| 2.2.10 Phylogenetische Analyse .....  | 28       |
| 2.2.10.1 Verwendete Arten .....   | 28       |
| 2.2.10.2 Alignment der Sequenzen .....  | 32       |
| 2.2.10.3 Voruntersuchungen am Alignment.....  | 33       |
| 2.2.10.3.1 Definition der Variabilitätsbereiche .....   | 33       |
| 2.2.10.3.2 Bestimmung der allgemeinen mittleren Mutationsraten sowie der einzelnen mittleren<br>Substitutionsraten und deren Verhältnis ..... | 34       |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.10.3.3 Bestimmung der Sättigung .....                                | 35        |
| 2.2.10.3.4 Bestimmung der mittleren Basenfrequenzen .....                | 35        |
| 2.2.10.3.5 Likelihood-Mapping-Analyse .....                              | 35        |
| 2.2.10.4 Generalisierte Parsimonie .....                                 | 36        |
| 2.2.10.4.1 Ermittlung der optimalen Gewichtung .....                     | 36        |
| 2.2.10.4.2 Phylogenetische Analyse .....                                 | 37        |
| 2.2.10.4.3 Test von Hypothesen .....                                     | 38        |
| 2.2.10.5 Maximum Likelihood .....  | 39        |
| 2.2.10.5.1 Modeltest .....   | 39        |
| 2.2.10.5.2 Phylogenetische Analyse .....                                 | 40        |
| 2.2.10.5.3 Test von Hypothesen .....                                     | 41        |
| 2.2.10.6 Überprüfung der Robustheit der Zweige durch Bootstrapping ..... | 41        |
| 2.2.10.7 Bayes'sche Analyse .....  | 42        |
| 2.2.10.7.1 MrModeltest .....   | 42        |
| 2.2.10.7.2 Phylogenetische Analyse .....                                 | 43        |
| 2.2.10.8 Darstellung der Bäume .....                                     | 44        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>   | <b>45</b> |
| 3.1 Amplifikation und Sequenzierung der einzelnen Gene .....             | 45        |
| 3.2 Voruntersuchungen der einzelnen Variabilitätsbereiche .....          | 47        |
| 3.2.1 Substitutionsraten und deren Verhältnisse .....                    | 48        |
| 3.2.2 Sättigung .....  | 53        |
| 3.2.3 Basenfrequenzen und deren Homogenität über die Taxa .....          | 59        |
| 3.2.4 Likelihood Mapping .....   | 61        |
| 3.3 Phylogenetische Analysen .....                                       | 62        |
| 3.3.1 18S-rDNA .....   | 62        |
| 3.3.1.1 Generalisierte Parsimonie .....                                  | 62        |
| 3.3.1.2 Maximum Likelihood .....   | 68        |
| 3.3.1.3 Bayes'sche Analyse .....   | 70        |
| 3.3.1.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen .....                  | 74        |
| 3.3.2 28S-rDNA .....   | 76        |
| 3.3.2.1 Generalisierte Parsimonie .....                                  | 76        |
| 3.3.2.2 Maximum Likelihood .....   | 79        |
| 3.3.2.3 Bayes'sche Analyse .....   | 79        |
| 3.3.2.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen .....                  | 81        |
| 3.3.3 CO I .....   | 82        |
| 3.3.3.1 Generalisierte Parsimonie .....                                  | 82        |
| 3.3.3.2 Maximum Likelihood .....   | 85        |
| 3.3.3.3 Bayes'sche Analyse .....   | 85        |
| 3.3.3.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen .....                  | 87        |



|  |            |
|--|------------|
| 3.3.4 18S- und 28S-rDNA.....   | 88         |
| 3.3.4.1 Generalisierte Parsmonie.....  | 88         |
| 3.3.4.2 Maximum Likelihood.....  | 90         |
| 3.3.4.3 Bayes'sche Analyse.....  | 93         |
| 3.3.4.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen .....                                    | 93         |
| 3.3.5 18S-rDNA, 28S-rDNA und CO I.....   | 95         |
| 3.3.5.1 Generalisierte Parsmonie.....  | 95         |
| 3.3.5.2 Maximum Likelihood.....  | 97         |
| 3.3.5.3 Bayes'sche Analyse.....  | 100        |
| 3.3.5.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen .....                                    | 100        |
| <b>4. Diskussion.....</b>  | <b>103</b> |
| 4.1 Amplifikation und Sequenzierung der einzelnen Gene .....                               | 103        |
| 4.2 Wahl des Substitutionsmodells.....   | 106        |
| 4.3 Vergleich der einzelnen Gene sowie deren Kombination .....                             | 110        |
| 4.4 Unterschied zwischen den Bootstrap- und den „posterior probability“-Werten.....        | 114        |
| 4.5 Systematische Stellung der Dinophilidae innerhalb der Annelida .....                   | 118        |
| 4.6 Progenetische Evolution innerhalb der „Dorvilleidae“ .....                             | 124        |
| 4.7 Phylogenie der Eunicida.....   | 127        |
| <b>5. Zusammenfassung .....</b>  | <b>131</b> |
| <b>6. Literatur .....</b>  | <b>135</b> |
| <b>7. Anhang .....</b>   | <b>147</b> |
| 7.1 Alignment & Variabilitätsbereiche .....  | 147        |
| 7.2 Danksagungen .....   | 152        |
| 7.3 Lebens- und Bildungsgang .....   | 154        |
| 7.4 Publikationen.....   | 156        |
| 7.5 Vorträge & Poster .....  | 157        |
| 7.6 Eidesstattliche Erklärung über frühere Promotionsversuche.....                         | 158        |
| 7.7 Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen ..... | 159        |

## Abkürzungen

|                |  |
|----------------|--|
| A              | Adenin   |
| AIC-Test       | Test basierend auf Akaike (1974) Informationskriterium |
| bp             | Basenpaare   |
| BS             | Bootstrap  |
| C              | Cytosin  |
| CO I           | Cytochromoxidase I                                     |
| ddNTP          | Didesoxy-Nukleosidtriphosphat                          |
| dNTP           | Desoxy-Nukleosidtriphosphat                            |
| DTT            | Dithiothreitol   |
| EDTA           | Ethylen-diamin-tetra-aceticacid                        |
| ETS            | External Transcribed Spacer                            |
| F81            | Substitutionsmodell nach Felsenstein (1981)            |
| G              | Guanin   |
| HKY85          | Substitutionsmodell nach Hasegawa <i>et al.</i> (1985) |
| ITS            | Internal Transcribed Spacer                            |
| JC             | Substitutionsmodell nach Jukes & Cantor (1969)         |
| K2P            | Substitutionsmodell nach Kimura (1980)                 |
| KAc            | Kalium-Acetat  |
| kb             | Kilobasenpaare   |
| KH-Test        | Test nach Kishino & Hasegawa (1989)                    |
| LTE            | Low Tris/EDTA  |
| MCMC           | Markov Chain Monte Carlo                               |
| MCMCMC         | Metropolis coupled Markov Chain Monte Carlo            |
| MetaPIGA       | Phylogeny Inference using the meta-genetic algorithm   |
| ML             | Maximum Likelihood                                     |
| N              | Nukleotid  |
| NJ             | Neighbour Joining                                      |
| NNI            | Nearest Neighbour Interchange                          |
| OTU            | Operational Taxonomic Unit                             |
| PAUP           | Phylogenetic Analysis using Parsimony                  |
| PCR            | Polymerase Chain Reaction                              |
| R              | Purine   |
| R <sup>2</sup> | Bestimmtheitsmaß                                       |
| SDS            | Sodium-Docdecylsulfate                                 |
| SH-Test        | Test nach Shimodaira & Hasegawa (1999)                 |
| SPR            | Subtree Pruning-Regrafting                             |
| STS            | Subtree Swap   |
| T              | Thymidin   |
| TBE            | Tris/ Borat/ EDTA                                      |
| TBR            | tree bisection reconnection                            |
| TE             | Tris/ EDTA   |
| Tempelton-Test | Test nach Tempelton (1983)                             |
| Ti             | Transition   |
| Tris           | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                       |
| Tv             | Transversion   |
| TXS            | Taxa Swap  |
| Y              | Pyrimidine   |

## 1. Einleitung

Ein genereller Diskussionspunkt bei der Entstehung neuer Arten ist, ob eine schnelle (auch sprunghaft genannte) Artbildung durch Mutationen in wenigen Hauptgenen möglich ist (Wieser 1994). Eine solche schnelle Artbildung wurde erstmalig in der „Markogenese“-Theorie am Anfang des 20. Jahrhunderts von de Vries postuliert (Goldschmidt 1961; Wuketits 1995). Sie steht damit im Gegensatz zur klassischen, allgemein akzeptierten synthetischen Evolutionstheorie, die eine schrittweise und kontinuierliche Bildung neuer Arten postuliert. Eine schnelle Artbildung wird von den Vertretern der synthetischen Evolutionstheorie abgelehnt (z. B. Mayr 1969). Eine schnelle Artbildung liegt allerdings der Theorie der progenetischen Evolution zugrunde (Gould 1977). In der Progenese evolvieren neue Arten durch eine frühe Geschlechtsreife larvaler und juveniler Stadien bei gleichzeitiger Einstellung der weiteren Entwicklungsprozesse.

Der progenetischen Evolution könnten wenige Mutationen in den Genen, die die Kontrolle der sexuellen Reifung steuern, zugrunde liegen. Die progenetische Evolution „kombiniert also ein Maximum an phänotypischen Veränderungen mit minimalen genotypischen Änderungen“ (Gould 1977). Das Prinzip der Progenese ist daher zur Erklärung des Ursprungs verschiedener Taxa herangezogen worden (z. B. Rieger 1980; Schminke 1981; Warwick 2000) und besitzt im Allgemeinen ein hohes Erklärungspotential auch für den Ursprung höherer taxonomischer Einheiten (Rieger 1988). Ferner wird eine Einwanderung neuer Arten in einen sehr stabilen Lebensraum, wie das marine Sandlückensystem, der aber einen hohen Grad der Anpassung erfordert, begünstigt (Westheide 1987). In einem solchen Lebensraum sind ökologisch optimal eingemischte Arten potentiellen Einwanderern, die sich nur langsam an den neuen Lebensraum adaptieren, überlegen, so dass die Einwanderung sehr unwahrscheinlich wird. Durch die progenetische Evolution hingegen kann sich die Anpassung in sehr wenigen Artbildungsschritten vollziehen, vor allem wenn dieser Lebensraum schon temporär von larvalen und juvenilen Stadien, wie bei vielen Polychaeten, im Laufe des Lebenszykluses genutzt wird.

Der Lebensraum verschiedener Arten der „Polychaeta“ ist das Sandlückensystem. Sie zeichnen sich durch eine geringe Körpergröße (mehrere Millimeter bis unter 300  $\mu\text{m}$  Länge) und scheinbar einfacher Organisation (z. B.: wenige Segmente, fehlende oder wenige Parapodien und Borsten, Kriechwimpersohle, epidermale Lage des Nervensystems, Protonephridien) aus (Westheide 1990). Viele von ihnen wurden deshalb lange Zeit als besonders ursprünglich innerhalb der Annelida angesehen und dementsprechend als „Archiannelida“ zusammengefasst (siehe Hermans 1969 & Mettam 1985). Die Ähnlichkeit vieler Strukturen mit solchen von larvalen und juvenilen Stadien großer Arten der Polychaeten lässt andererseits auf eine

progenetische Evolution schließen (siehe Müller & Westheide 2002). Besonders deutlich wird dies bei den Arten der Dinophilidae und verschiedenen Arten der Dorvilleiden, wie *Parapodrilus psammophilus* und anderen. Aus diesen verschiedenen Arten lassen sich morphologische Reihen mit zunehmenden larvalen Merkmalen bilden. Diese entsprechen post-embryonalen Entwicklungsreihen größerer Arten aus verschiedenen Gruppen der Eunicida bis in Einzelheiten (Westheide 1985; 1987; Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994; Müller & Westheide 2002).

Die Eunicida (im Sinne von Fauchald 1977; George & Hartmann-Schröder 1985) sind ein artenreiches Taxon der Polychaeten. Die Monophylie ist morphologisch durch ein ventrales Pharynx-Organ mit einem auffallenden Kieferapparat aus kutikulären (Purschke 1987) mandibularen und maxillaren Elementen gut begründet. Diese Elemente können in den verschiedenen fossilen und rezenten Taxa wenigstens teilweise homologisiert werden (Kielan-Jaworowska 1966; Kozur 1970; Tzetlin 1980; Wolf 1980; Orensanz 1990). Des Weiteren sind auch kieferlose Taxa, wie *Parapodrilus* und *Apodotrocha*, in ein Subtaxon der Eunicida, den Dorvilleiden, eingeordnet worden, da sie eine allgemeine Ähnlichkeit zu kiefertragenden Arten, insbesondere zu deren juvenilen Stadien, zeigen (Westheide & Riser 1983). Generell ist die Einordnung der Dorvilleiden in die Eunicida aufgrund ihrer ctenognathen Kieferelemente unumstritten. Allerdings sind sie mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht monophyletisch, da der ctenognathe Kiebertyp ein plesiomorphes Merkmal innerhalb der Eunicida ist (Tzetlin 1980; Orensanz 1990; Struck *et al.* 2002a).

Die Dinophilidae wurden lange Zeit in die Gruppe der „Archiannelida“ eingeordnet. Die Monophylie der Dinophilidae (in sensu Kristensen & Niilonen 1982) ist aufgrund ihres ventralen Pharynx-Organ, des unpaaren Kopulationsorgans und der Ultrastruktur der Spermatozoa eindeutig belegt (Jägersten 1944; Westheide & Schmidt 1974; Franzén 1977; Scharnofske 1984, 1986; Purschke 1985a). Die Monophylie und basale Position der „Archiannelida“ kann dagegen durch keine Autapomorphien gestützt werden und sie werden deshalb als polyphyletisch betrachtet (Westheide 1985; Purschke 1985a & b, 1987; Purschke & Jouin 1988; Purschke & Tzetlin 1996).

Sveshnikov (1958) vermutete erstmalig, dass es sich bei den Dinophilidae um Angehörige der Eunicida handeln könnte (zitiert nach Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994). Diese Vermutung wurde häufiger diskutiert und vor allem durch die Beschreibung neuer, vermutlich progenetischer, Arten der „Dorvilleidae“ gestützt (Westheide 1982, 1984, 1985, 1987; Westheide & Riser 1983). Der stärkste Hinweis auf eine nahe Verwandtschaft von „Dorvilleidae“ und Dinophilidae gelang Åkesson (1977) durch die reziproke Infektion mit *Grellia*-Arten (Apicomplexa). Schließlich bilden die Dinophilidae in einer kladistischen Analyse morphologischer Daten den Abschluss einer Reihe aller vermuteten progenetischen Arten von

Dorvilleiden mit graduell steigender juveniler Organisation, ähnlich einer morphologischen Reihe (Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994). Sie stellen somit ein hoch abgeleitetes Taxon innerhalb der „Dorvilleidae“ dar. Diese Einordnung der Dinophilidae sowie deren Zugehörigkeit zu den Eunicida sind allerdings nicht unumstritten, da sich diese Systematisierung nur auf larvale und juvenile Strukturen stützt (Westheide 1982, 1987; Müller & Westheide 2002). Larvale und juvenile Strukturen unterschiedlichster Polychaeten-Gruppen sind sich meistens sehr viel ähnlicher als die Strukturen der späteren adulten Tiere. So kann eine parallele Evolution ähnlicher larvaler und juveniler Merkmale in unterschiedlichen Gruppen nicht ausgeschlossen werden. Außerdem sind die ventralen Pharynx-Organen der Dinophilidae nicht homolog mit denen der Eunicida, im Speziellen der „Dorvilleidae“ (Purschke 1985a, 1987; Purschke & Tzetlin 1996; Purschke 2002).

Aus diesem Grund werden auch unterschiedliche Verwandtschaftsverhältnisse von Dinophilidae und „Dorvilleidae“ mit larvalen Merkmalen diskutiert. Westheide (1982), Westheide & Riser (1983) und Orensanz (1990) halten eine mehrfache parallele Progenese innerhalb des Dinophilidae/„Dorvilleidae“-Komplexes für wahrscheinlich. Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994) hingegen postulieren eine gemeinsame Stammart der Dinophilidae und „Dorvilleidae“ mit larvalen Merkmalen und somit eine einmalige progenetische Evolution.

Da sowohl die Einordnung der Dinophilidae in die Eunicida als auch das vermutete Verwandtschaftsverhältnis von Dinophilidae und „Dorvilleidae“ mit morphologischen Daten nicht eindeutig geklärt werden kann, basieren die phylogenetischen Untersuchungen in der hier vorgestellten Arbeit ausschließlich auf molekularen Daten. Die in der Phylogenie verwendeten molekularen Daten haben gegenüber den morphologischen Daten den Vorteil, dass sie unabhängig von Selektionsdrücken, die spezifisch für Taxa sind, evolvieren. Molekulare Daten, wie die der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der Cytochrome-Oxidase I (= CO I), unterliegen viel mehr allgemeinen zellspezifischen Selektionsdrücken. Die Wahrscheinlichkeit für konvergente Entwicklungen aufgrund ähnlicher Lebensräume wird somit stark minimiert (Swofford *et al.* 1996).

In dieser Arbeit wurde die Phylogenie der Dinophilidae und Eunicida basierend auf den Sequenzen zweier Gene des nukleären ribosomalen RNA-Clusters, die 18S-rDNA und die 28S-rDNA, sowie das mitochondriale Gen der CO I verwendet. Die Sequenz der 18S-rDNA wurde schon häufiger in molekular-phylogenetischen Analysen weit von einander entfernter Taxa, auch innerhalb der Annelida, verwendet (siehe McHugh 2000 sowie Eeckhaut *et al.* 2000; Martin 2000; Van de Peer *et al.* 2000; Rota *et al.* 2001; Struck *et al.* 2002 a & b; Bleidorn *et al.* 2003). Deswegen sind auch von vielen Taxa der Annelida schon Sequenzen vorhanden und in diese Analysen können 87 Arten aus 35 Taxa, inklusive Clitellata, Echiura und Siboglinidae

(= Pogonophora), eingehen. Nur in wenigen molekular-phylogenetischen Analysen der Annelida wurden bisher kurze Sequenzabschnitte der 28S-rDNA von 300 bis 600 bp verwendet (Féral *et al.* 1994; Christensen & Theisen 1998; Brown *et al.* 1999; Rousset *et al.* 2003). In dieser Arbeit wurde ein etwa 2250 bp großer Abschnitt der 28S-rDNA zwischen den beiden Abschnitten aus der Analyse von Brown *et al.* (1999) untersucht. Die Sequenz der CO I wurde bisher innerhalb der Annelida nur für Fragestellungen, die Teilgruppen, wie die Clitellata und Siboglinidae betrafen, verwendet (Kojima *et al.* 1997; Christensen & Theisen 1998; Siddall & Bureson 1998; Apakupakul *et al.* 1999; Nylander *et al.* 1999). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Sequenzabschnitt der CO I (488 bzw. 482 bp) für phylogenetische Analysen innerhalb der Polychaeten geeignet ist.

Da sowohl die Schwestergruppe der Annelida als auch die Phylogenie der höheren Taxa der Invertebraten im Allgemeinen ungeklärt ist (z. B. McHugh 2000; Van de Peer *et al.* 2000), wurden in dieser Arbeit für den Außengruppenvergleich, so weit es möglich war, Vertreter verschiedenster Taxa der Invertebraten mit einbezogen. Die Sequenzen von verschiedenen Arten der Eunicida und Dinophilidae sowie von Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ wurden bestimmt. Um die Anzahl der Taxa zu erweitern und die Diversität der Annelida zu berücksichtigen, wurden noch von weiteren Arten der Anneliden die Sequenzen ermittelt. Ein Teil dieser Sequenzen (v. a. der 28S-rDNA und der CO I) wurde von Frau Jördens im Rahmen ihrer Arbeit über die Phylogenie der Parergodrilidae bestimmt und für diese Analysen zur Verfügung gestellt (Jördens *et al.* 2003). Phylogenetische Analysen wurden sowohl mit den verschiedenen Genen alleine als auch in Kombination der nukleären Gene sowie aller Gene durchgeführt.

## 2. Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gesammeltes Tiermaterial

Das gesammelte Tiermaterial sowie der Herkunftsort ist in Tabelle 1 aufgeführt. Die Tiere entstammen Plankton- und Sedimentproben, wobei von letzteren auch Proben aus größeren Tiefen mit einem Greifer bzw. durch SCUBA-Tauchen genommen wurden. Aus den Sandproben wurden die Tiere mit der MgCl<sub>2</sub>-Methode ausgespült bzw. *Parapodrilus psammophilus* wurde mit der Seewassereis-Methode nach Uhlig *et al.* (1973) ausgetrieben (s. auch 2.2.1 Extraktion von Organismen).

**Tabelle 1:** Herkunft des Tiermaterials in alphabetischer Reihenfolge

| Taxon          | Art   | Herkunft  |
|----------------|---|---|
| Annelida       |   |   |
| "Polychaeta"   |   |   |
| Aeolosomatidae | <i>Rheomorpha neiswestonovae</i> (LASTOCHKIN, 1935)   | Stechlin-See (Deutschland) <sup>a</sup>   |
| Amphinomidae   | <i>Eurythoë complanata</i> (PALLAS, 1776)   | Aquarium Osnabrück (Deutschland), ursprünglicher Fundort unbekannt  |
| Capitellidae   | <i>Notomastus latericeus</i> M.SARS, 1851   | Helgoland (Deutschland) <sup>a, b</sup>   |
| Dinophilidae   | <i>Dinophilus gyrociliatus</i> O. SCHMIDT, 1857<br><i>Trilobodrilus axi</i> WESTHEIDE, 1967<br><i>Trilobodrilus heideri</i> REMANE, 1925  | Laborkultur <sup>c</sup><br>List, Sylt (Deutschland) <sup>d</sup><br>Helgoland (Deutschland)  |
| "Dorvilleidae" | <i>Dorvillea bermudensis</i> ÅKESSON & RICE, 1992<br><i>Dorvillea similis</i> CROSSLAND, 1924<br><br><i>Microdorvillea</i> sp. n.<br><i>Ophryotrocha gracilis</i> HUTH, 1933<br><i>Ophryotrocha puerilis</i> (MCINTOSH, 1885)<br><i>Parapodrilus psammophilus</i> WESTHEIDE, 1965<br><i>Parougia</i> sp.<br><i>Pettiboneia urciensis</i> CAMPOY & SAN MARTIN, 1980<br><i>Pusillotrocha akessoni</i> WESTHEIDE & VON NORDHEIM, 1985<br><i>Protodorvillea kefersteinii</i> (MCINTOSH, 1869)<br><i>Schistomeringos rudolphi</i> (CHIAJE, 1828) | Laborkultur <sup>c</sup><br>Aquarium Osnabrück (Deutschland), ursprünglicher Fundort unbekannt<br>Nonsuch-Inland (Bermuda) <sup>e</sup><br>Helgoland (Deutschland)<br>Laborkultur <sup>c</sup><br>List, Sylt (Deutschland)<br>Roscoff (Frankreich)<br>Qawra (Malta) <sup>f</sup><br>Helgoland (Deutschland) <sup>a, b</sup><br>Roscoff (Frankreich)<br>Aquarium Innsbruck (Österreich), ursprünglicher Fundort unbekannt <sup>b</sup> |
| Eunicidae      | <i>Eunice harassii</i> AUDOUIN & MILNE-EDWARDS, 1833<br><i>Eunice</i> sp.<br><i>Eunice vittata</i> (CHIAJE, 1828)<br><i>Lysidice ninetta</i> AUDOUIN & MILNE-EDWARDS, 1834<br><i>Marphysa bellii</i> (AUDOUIN & MILNE-EDWARDS, 1834)<br><i>Marphysa sanguinea</i> (MONTAGU, 1815)<br><i>Nematonereis unicornis</i> (GRUBE, 1840)  | Roscoff (Frankreich) <sup>b</sup><br>Campese, Giglio (Italien) <sup>b</sup><br>Malaysia <sup>b</sup><br>Roscoff (Frankreich)<br>Roscoff (Frankreich)<br>Concarneau (Frankreich) <sup>g</sup><br>Malaysia <sup>b</sup>   |

Fortsetzung Tabelle 1

| Taxon            | Art   | Herkunft  |
|------------------|---|---|
| Hesionidae       | <i>Kefersteinia cirrata</i> (KEFERSTEIN, 1862)  | Banyuls-sur-Mer (Frankreich) <sup>h</sup>   |
| Histriobdellidae | <i>Histriobdella homari</i> VAN BENEDEN, 1958   | Boston (USA) <sup>i</sup>   |
| Lumbrineridae    | <i>Lumbrineris funchalensis</i> (KINBERG, 1865)<br><i>Lumbrineris inflata</i> (MOORE, 1911)<br><i>Lumbrineris latreilli</i> AUDOUIN & MILNE-EDWARDS, 1834                               | Roscoff (Frankreich)<br>AquaZoo Düsseldorf (Deutschland),<br>ursprünglicher Fundort unbekannt <sup>b</sup><br>Aquarium Innsbruck (Österreich),<br>ursprünglicher Fundort unbekannt <sup>b</sup> |
| Nephtyidae       | <i>Nephtys hombergii</i> SAVIGNY, 1818  | Concarneau (Frankreich) <sup>g</sup>  |
| Oeononidae       | <i>Arabella iricolor</i> (MONTAGU, 1804)  | Banyuls-sur-Mer (Frankreich) <sup>e, h</sup>  |
| Onuphidae        | <i>Aponuphis bilineata</i> (BAIRD, 1870)<br><i>Hyalinoecia tubicola</i> O.F. MÜLLER, 1776<br><i>Mooreonuphis stigmatis</i> (TREADWELL, 1922)<br><i>Onuphis similis</i> (FAUCHALD, 1968) | Qawra (Malta) <sup>f</sup><br>Campese, Giglio (Italien) <sup>b</sup><br>Morro Bay (Belize) <sup>h</sup><br>Anse Forbans, Mahé (Seychellen) <sup>e</sup>   |
| Parergodrilidae  | <i>Stygocapitella subterranea</i> KÖLLNER, 1934   | List, Sylt (Deutschland) <sup>a</sup>   |
| Phyllodocidae    | <i>Eteone picta</i> QUATREFAGES, 1865<br><i>Eulalia viridis</i> (LINNAEUS, 1767)  | Roscoff (Frankreich) <sup>b</sup><br>Concarneau (Frankreich) <sup>g</sup><br>Concarneau (Frankreich) <sup>g</sup>   |
| Pisionidae       | <i>Pisione remota</i> (Southern, 1914)  | Cefalù, Sizilien (Italien) <sup>e</sup>   |
| Polygordiidae    | <i>Polygordius appendicularis</i> (FRAIPONT, 1887)<br><i>Polygordius</i> sp.  | Helgoland (Deutschland)<br>Anse Forbans, Mahé (Seychellen) <sup>e</sup>   |
| Polynoidae       | <i>Alentia gelatinosa</i> (M. SARS, 1835)   | Concarneau (Frankreich) <sup>g</sup>  |
| Potamodrilidae   | <i>Potamodrilus fluviatilis</i> LASTOCHKIN, 1935  | Stechlin-See (Deutschland) <sup>a</sup>   |
| Protodrilidae    | <i>Protodrilus ciliatus</i> JÄGERSTEN, 1952<br><i>Protodrilus purpureus</i> (SCHNEIDER, 1868)   | Helgoland (Deutschland)<br>Helgoland (Deutschland)  |
| Protodriloidae   | <i>Protodriloides chaetifer</i> (REMANE, 1926)<br><i>Protodriloides symbioticus</i> (GIARD, 1904)   | List, Sylt (Deutschland) <sup>d</sup><br>List, Sylt (Deutschland) <sup>d</sup>  |
| Sabellidae       | <i>Sabella crassicornis</i> M.SARS, 1851  | Aquarium Osnabrück (Deutschland),<br>ursprünglicher Fundort unbekannt   |
| Saccocirridae    | <i>Saccocirrus papillocercus</i> BOBRETZKY, 1871  | Campese, Giglio (Italien) <sup>b</sup>  |
| Serpulidae       | <i>Spirorbis spirorbis</i> (LINNAEUS, 1758)   | Zoo Osnabrück (Deutschland),<br>ursprünglicher Fundort unbekannt <sup>b</sup>   |
| Spionidae        | <i>Boccardiella ligerica</i> (FERRENNIÈRE, 1898)<br><i>Malacocercus fuliginosus</i> (CLAPAREDE, 1868)   | Helgoland (Deutschland) <sup>a, b</sup><br>St. Efflau (Frankreich) <sup>a</sup>   |
| Syllidae         | <i>Brania</i> sp.   | Fundort unbekannt   |



## Fortsetzung Tabelle 1

| Taxon     | Art                                  | Herkunft |
|-----------|--------------------------------------|----------|
| Mollusca  |                                      |          |
| Bivalvia  |                                      |          |
| Mytilidae | <i>Mytilus edulis</i> LINNEAUS, 1758 | Zucht    |

Proben gesammelt von:

<sup>a</sup>Apl.-Prof. Dr. Günter Purschke; <sup>b</sup>Dr. Monika C. M. Müller; <sup>d</sup>Anna Paul; <sup>e</sup>Prof. Dr. Wilfried Westheide; <sup>f</sup>Dipl.-Biol. Wibke Schwerin; <sup>g</sup>Prof. Dr. Mary Petersen; <sup>h</sup>Dipl.-Biol. Christoph Bleidorn; <sup>i</sup>Dr. Rene Hessling.

<sup>c</sup> Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bertil Åkesson.

## 2.1.2 Verwendete Chemikalien &amp; häufig verwendete Lösungen

## Chemikalien

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Agarose für DNA-Elektrophorese                                     | Serva, Heidelberg           |
| Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> ), kristallin, reinst     | Biomol, Hamburg             |
| Bromphenolblau-Na-Salz, reinst                                     | Serva, Heidelberg           |
| desoxy-Nukleosidtriphosphate (= dNTPs)                             | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Dithiothreitol (DTT)   | Biomol, Hamburg             |
| Ethanol, reinst  | Riedel de Haën, Seelze      |
| Ethidiumbromid   | Amresco, USA                |
| Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Na <sub>2</sub> -Salz (EDTA), reinst | Biomol, Hamburg             |
| Ficoll (Typ 400)   | Sigma, Deisenhofen          |
| iso-Propanol, p.a.   | Merck, Darmstadt            |
| Kaliumacetat (KAc), reinst   | Merck, Darmstadt            |
| Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ), 50 mM                       | Genecraft, Münster          |
| Mineralöl, steril  | Sigma, Deisenhofen          |
| Natriumchlorid (NaCl), >99,5 %                                     | Sigma, Deisenhofen          |
| Natriumdodecylsulfat (SDS), kristallin, reinst                     | Serva, Heidelberg           |
| Phenol-Chloroform-iso-Amylalkohol (25:24:1)                        | Sigma, Deisenhofen          |
| Primer   | Eurogentec, Köln            |
| Salzsäure (HCl), mind. 37 % p.a.                                   | Riedel de Haën, Seelze      |
| Titriplex, p.a.  | Merck, Darmstadt            |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), ultra pure                | Biomol, Hamburg             |

## Enzyme und deren Puffer sowie DNA-Marker

DNA-Polymerase, Biotherm™, 5 U/μl Genecraft, Münster

BioTherm™-Lagerungspuffer Genecraft, Münster

- 10 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0
- 100 mM NaCl
- 0,5 mM EDTA
- 1 mM DTT
- 0,01% Tween-20
- 50% Glycerin (v/v)

BioTherm™ 10x Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub> Genecraft, Münster

- 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>
- 670 mM Tris HCl (pH 8,8 bei 25°C)
- 15 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,1% Tween-20

Proteinase K Serva, Heidelberg

DNA-Leiter, 100 bp, 1 μg/μl Amersham Biosciences, Freiburg

## Sequenzierung

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit v2.0 Applied Biosystems, USA

## Verwendete Kits

QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden

## Häufig verwendete Lösungen

*DNA-Leiter, 100 bp*

- 12,5 % DNA-Leiter
- 62,5 % LTE-Puffer
- 25 % Gelladepuffer

*Ethidiumbromid-Stammlösung*

- 0,1 %

*Gelladepuffer (Sambrook et al. 1989), modifiziert*

- 0,25 % Bromphenolblau
- 15 % Ficoll

*Homogenisationspuffer HOM II spezial* (Kocher et al. 1989)

- 0,1 mM Tris/ HCl
- 10 mM EDTA
- 0,1 M NaCl
- pH 8,0 einstellen und autoklavieren
- 0,5 % SDS
- 0,05 M DTT

*LTE-Puffer* (Sambrook et al. 1989)

- 1 mM Tris/ HCl
- 0,1 mM EDTA
- pH 7,5

*Proteinase K*

- 10 mg/ml

*TBE-Puffer* (Sambrook et al. 1989)

- 0,09 M Tris/ Borsäure
- 2 mM EDTA

### **2.1.3 Verwendete Programme** (in alphabetischer Reihenfolge)

#### *2.1.3.1 Chromas 1.5*

Die optische Wiedergabe der Fluoreszenzspektren der Gel-Elektrophorese erfolgte mit dem Programm Chromas 1.5 als Chromatogramme. Der spezifischen Fluoreszenz einer Base wird eine bestimmte Farbe zur optischen Unterscheidung zu geordnet: Adenin (A)-grün, Thymin (T)-rot, Guanin (G)-schwarz und Cytosin (C)-blau. Oberhalb der Spektren wird die entsprechende Base angegeben. Wenn die Base aufgrund sich überlagernder Spektren nicht eindeutig bestimmbar ist, wird dieses durch ein rosafarbenes N gekennzeichnet. Eine manuelle Editierung der Sequenz nach optischer Kontrolle durch den Benutzer ist möglich und die veränderte Sequenz kann sowohl als Chromatogramm als auch als reine Textdatei abgespeichert werden.

*Angaben zum Programm:* Chromas 1.5

Copyright © 1998 bei Technelysium Pty Ltd.

### 2.1.3.2 ClustalW

Das Programm ClustalW führt ein multiples Alignment sowohl von Nukleotid- als auch von Protein-Sequenzen durch. Dazu werden als erstes die Sequenzen paarweise gegeneinander abgeglichen. Aus diesen paarweisen Alignments wird ein sogenannter Führungsbaum für das multiple Alignment mit Hilfe des Neighbour Joining (NJ)-Algorithmus berechnet. Der Führungsbaum bestimmt, nach welchem Muster die Sequenzen schrittweise in das multiple Alignment eingefügt werden (Hall 2001). Die Einstellungen des Abgleichsprozesses, wie „Gap penalty“, können vom Benutzer verändert werden.

*Angaben zum Programm:* ClustalW 1.7

Copyright © 1997 bei Julie Thompson & Toby Gibson

### 2.1.3.3 GeneDoc

Das Programm GeneDoc ermöglicht den manuellen Abgleich von Sequenzen. Dadurch können sowohl einzelne Sequenzfragmente eines Individuums aneinandergesetzt werden als auch die beiden komplementären Stränge miteinander verglichen werden. Die Durchführung eines multiplen Alignments von Hand oder die Korrektur eines multiplen Alignments ist möglich.

*Angaben zum Programm:* GeneDoc 2.5.000

Copyright © 1999 bei Karl Nicholas

### 2.1.3.4 MetaPIGA

Die Maximum Likelihood (= ML)-Analyse mit mehr als 70 Operativen Taxonomischen Einheiten (= OTUs, „Operational Taxonomic Units“) ist mit Programmen wie PAUP 4.0 oder Phylip nicht mehr in angemessener Zeit (weniger als 1 Monat) möglich (Swofford *et al.* 1996). Deswegen wird in dem Programm MetaPIGA (= „Phylogeny Inference using the meta-genetic algorithm“) eine andere Art der Berechnung sowie der heuristischen Suche angewendet. Programme wie PAUP oder Phylip führen eine Optimierung der Modellparameter und der Zweiglängen (auch Divergenzzeit genannt) für jede Topologie einzelnen durch und suchen in einem „up hill“ genannten heuristischen Prozess den besten Baum, das heißt, es wird so lange gesucht, bis kein besserer Baum gefunden wurde.

Im Programm MetaPIGA wird hingegen ein genetischer Algorithmus, also ein Algorithmus, der die biologische Evolution simuliert, verwendet. Dabei werden von einer Population mit verschiedenen Topologien die Likelihood-Werte berechnet ohne eine Optimierung der Zweiglängen und Modellparameter vorzunehmen. Die beste Topologie bildet den

Ausgangspunkt für die Zusammensetzung der Population der nächsten Generation. Diese Topologie wird mutiert, das heißt, mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 24% werden verschiedene Veränderungen der Topologie [„Subtree Pruning–Regrafting“ (= SPR), „Nearest Neighbour Interchange“ (= NNI), „Taxa Swap“ (= TXS) & „Subtree Swap (= STS)] sowie mit einer 4%igen Wahrscheinlichkeit eine Veränderung der Zweiglänge durchgeführt. Von den neuen Topologien (inklusive der besten der vorherigen Generation) werden erneut die Likelihood – Werte berechnet und die nächste Generation beginnt mit der besten Topologie. Die Parameter des Substitutionsmodells werden nur alle 100 Generationen mit der Hilfe der besten Topologie der Generation optimiert. MetaPIGA führt somit in Bezug auf die Zweiglängen und Modellparameter eine Optimierung zwischen den Schritten durch, während in den Programmen wie PAUP 4.0 oder Phylip jedes Mal eine Optimierung innerhalb des jeweiligen Schrittes erfolgt. Dadurch ist der genetische Algorithmus schneller (Lemmon & Milinkovitch 2002).

Des Weiteren wird in MetaPIGA kein heuristischer „up hill“-Prozess, sondern das neue heuristische Verfahren der Konsensus–Beschneidung (= „Consensus Pruning“) angewendet (Lemmon & Milinkovitch 2002). Dabei werden im genetischen Algorithmus mehrere Populationen verwendet, die nur bedingt von einander unabhängig sind. Nach jeder Generation wird zwischen den Populationen verglichen, ob die besten Topologien gleiche Gruppierungen von OTUs unterstützen. Wenn von Topologien gleiche Gruppierungen unterstützt werden, dürfen die OTUs dieser Gruppierung mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit nicht mehr getrennt werden. Diese Wahrscheinlichkeit ist direkt proportional zu der Anzahl der unterstützenden Topologien im Verhältnis zu den gesamten Topologien (z. B.: bei 2 unterstützenden Topologien für eine Gruppierung von insgesamt 4 Topologien ist die Wahrscheinlichkeit 0,5). Die Topologie innerhalb der Gruppierung ist aber frei von irgendwelchen Zwängen. Während dieser heuristischen Suche können immer mehr Konsensus-Gruppierungen, die für alle Populationen gelten, detektiert werden. Die Anzahl der möglichen Topologien wird dadurch immer weiter eingeschränkt. Das Ende der Suche wird dadurch bestimmt, dass entweder alle Populationen die gleiche Topologie aufweisen oder die Anzahl der noch möglichen Topologien komplett durchsucht worden ist. Dadurch ist das Programm wesentlich schneller als Programme wie PAUP 4.0 oder Phylip (Lemmon & Milinkovitch 2002). Ein Nachteil von MetaPIGA ist im Moment noch, dass nur die vier einfachsten Substitutionsmodelle [JC (Jukes & Cantor 1969), F81 (Felsenstein 1981), K2P (Kimura 1980) & HKY85 (Hasegawa *et al.* 1985)] zur Verfügung stehen.

*Angaben zum Programm:* MetaPIGA (Phylogeny Inference using the metaGA) 1.0.2b

Copyright © 2002 bei Alan R. Lemmon & Michel C. Milinkovitch

### 2.1.3.5 Modeltest

Für die Durchführung einer ML-Analyse ist es entscheidend, dass optimale Substitutionsmodell zu finden (Posada & Crandell 2001). Das optimale Substitutionsmodell wird in dem Programm Modeltest sowohl durch einen hierarchischen Likelihood Verhältnis-Test als auch durch einen Test basierend auf dem Akaike Informationskriterium (= AIC-Test oder minimales theoretisches Informationskriterium) (Akaike 1974) ermittelt und die optimalen Modellparameter werden angegeben. Die ersten Berechnungen müssen allerdings in PAUP 4.0 durchgeführt werden. Um für alle Substitutionsmodelle ein gleiches, beinahe optimales Phylogramm zu verwenden, wird zunächst durch eine NJ-Analyse ein Phylogramm berechnet. Für dieses Phylogramm werden der Likelihood-Wert und die jeweiligen Modellparameter für jedes der 56 möglichen Modelle [14 Substitutionsmodelle mit jeweils vier Möglichkeiten der Ratenheterogenität: a) gleiche Substitutionsraten über alle Positionen („among-site-homogeneity“), b) Anteil an invarianten Positionen („proportion of invariant sites“), c) unterschiedliche Substitutionsraten zwischen den Positionen („ $\Gamma$  (= gamma)-distribution“), d) „ $\Gamma$ -distribution“ und „proportion of invariant sites“] bestimmt. Diese Likelihood-Werte werden in den beiden Tests vom Programm Modeltest zur Berechnung benutzt. Im hierarchischem Likelihood Verhältnis-Test wird auf jeder Hierarchie-Ebene eine Nullhypothese gegen eine alternative Hypothese verglichen, wobei die Nullhypothese ein Spezialfall des komplexeren alternativen Modells ist [beispielsweise ist das Modell nach Jukes & Cantor (1969) ein Spezialfall des 2-Parameter-Modells nach Kimura (1980) mit gleichen Transitions- und Transversions-Raten]. Aus dem Vergleich wird eine Wahrscheinlichkeit  $1-p$  errechnet, mit der die Nullhypothese abzulehnen ist. Bei  $p < 0,01$  wird die Nullhypothese abgelehnt und bei  $p \geq 0,01$  angenommen. Wenn der hierarchische Charakter nicht zwingend gegeben ist oder es aufgrund der Anordnung der Hierarchie-Ebenen zu falschen Schlussfolgerungen kommen kann, sollte der AIC-Test verwendet werden, da in dem Test alle Likelihood-Werte gegeneinander verglichen werden.

*Angaben zum Programm:* Modeltest 3.04

Copyright © 1998-2001 bei David Posada

### 2.1.3.6 MrBayes

Mit dem Programm MrBayes kann eine phylogenetische Untersuchung basierend auf dem Bayes'schen Theorem (Bayes 1763) durchgeführt werden (Huelsenbeck & Ronquist 2001; Altekar *et al.* 2003). In einer Bayes'schen Analyse wird basierend auf den Wahrscheinlichkeiten für spezifische Parameter vor den Ereignissen („prior probability“) und den möglichen Wahrscheinlichkeiten („likelihood“) für die beobachteten Ereignisse eine neue

Wahrscheinlichkeitsaussage über eine bestimmte Hypothese nach den Ereignissen („posterior probability“) getroffen. Der Unterschied zwischen der „prior probability“ und der „posterior probability“ zeigt, ob eine Hypothese wahrscheinlicher geworden und somit eher anzunehmen ist. In phylogenetischen Analysen wird die „posterior probability“ für eine Topologie bestimmt und nicht wie in der ML-Analyse nur der Likelihood-Wert. Die „posterior probability“ einer Topologie wird berechnet, in dem der Likelihood-Wert der Topologie über die anderen Parameter (Zweiglänge, Ratenheterogenität, Parameter des Substitutionsmodells) integriert wird. Die Integration ist allerdings analytisch nicht berechenbar. Eine Approximation der „posterior probabilities“ für die verschiedenen Topologien ist aber mit Hilfe der „Markov chain Monte Carlo“ (= MCMC)-Methode möglich. Dabei werden die Likelihood-Werte von zufälligen Topologien mit zufälliger Verteilung der anderen Parameter bestimmt. Bei jeder neuen Topologie wird durch einen Vergleich mit der vorherigen Topologie bestimmt, ob sie angenommen oder verworfen wird. Dieser Entscheidungsprozeß basiert sowohl auf den „prior probabilities“ als auch auf dem Likelihood-Wert der Topologie, so daß indirekt auch die „posterior probability“ miteinbezogen wird. Zur effektiven Bestimmung der „posterior probabilities“ müssen sich die Topologien allerdings in der Nähe der optimalen Lösung und in einem stabilen Gleichgewicht befinden. Durch den Entscheidungsprozeß wird dieses gewährleistet. Der prozentuale Anteil mit der eine bestimmte Topologie in dem Gleichgewicht gefunden wird, ist eine Annäherung der „posterior probability“ dieser Topologie. Gleichzeitig ist es die „posterior probability“ für jede Gruppe in der Topologie. Durch die Addition der „posterior probabilities“ jeder Topologie, die eine spezifische Gruppe von Taxa unterstützt, kann die „posterior probability“ für diese Gruppe bestimmt werden. Ein Problem besteht in lokalen Optima, in die die Methode enden kann und die somit zu verfälschenden Ergebnissen führen. Dieses Risiko kann minimiert werden, in dem die „Metropolis coupled MCMC“ (= MCMCMC)-Methode benutzt wird. Dabei wird nicht nur eine Kette gestartet, sondern vier. Nur die Kette mit dem in der Generation besten Likelihood-Wert ist „kalt“, das heißt, sie nutzt im Entscheidungsprozeß zwischen neuer und alter Topologie die wirklichen Likelihood-Werte. Die anderen drei Ketten sind „erhitzt“, das heißt, sie verwenden im Entscheidungsprozeß erniedrigte Werte, so dass die Ablehnung einer Topologie unwahrscheinlicher wird. Sie können so schneller von einem Optimum zum anderen gelangen.

*Angaben zum Programm:* MrBayes (Bayesian Analysis of Phylogeny) 3.0B

Copyright © 2002 bei John P. Huelsenbeck & Fredrik Ronquist

### 2.1.3.7 MrModeltest

Das Programm MrModeltest ist dem Programm Modeltest ähnlich und ermittelt das optimale Modell für die Bayes'sche Untersuchung mit dem Programm MrBayes. Da in dem Programm MrBayes nur 24 Modelle (6 Substitutionsmodelle mit jeweils vier Möglichkeiten der Ratenheterogenität) implementiert sind, ist auch die Anzahl der Modelle in MrModeltest dementsprechend reduziert.

*Angaben zum Programm:* MrModeltest 1.1b

Copyright © 2002 bei David Posada & Johan Nylander

### 2.1.3.8 PAUP 4.0 b10

Das Programm PAUP (Phylogenetic Analysis using Parsimony) kann phylogenetische Berechnungen durchführen, die sich sowohl auf Sequenzdaten von Proteinen und Nukleotiden als auch auf morphologischen Daten stützen. Mit der aktuellen Version können sowohl Analysen basierend auf diskreten Merkmalen und einem Vergleich mehrerer Topologien nach einem Optimalitätskriterium wie die Parsimonie - und die ML - Analyse als auch Distanzmethoden wie der NJ - Algorithmus angewendet werden. Darüber hinaus sind Tests für die Signifikanz verschiedener Hypothesen implementiert.

Die Parsimonie-Analyse folgt dem in der Wissenschaft allgemeingültigen Sparsamkeitsprinzip. Die Hypothese, welche zur ihrer Erklärung die wenigstens *ad hoc*-Annahmen benötigt, ist gegenüber den alternativen Hypothesen zu favorisieren. In einer phylogenetischen Untersuchung sind neben den *ad hoc*-Annahmen über das Substitutionsmodell, die unvermeidlich immer vorhanden sind, vor allem die *ad hoc*-Annahmen zu beachten, die die Homoplasien erklären. Praktisch bedeutet dies in phylogenetischen Untersuchungen, dass die Hypothese zu favorisieren ist, welche die geringste Zahl an Merkmalstransformationen, meistens als Baumlänge angegeben, erfordert.

Die ML-Analyse basiert ebenfalls auf der Transformation von diskreten Merkmalszuständen, allerdings werden die Zweiglängen des Stammbaumes sowie die Parameter des spezifischen Substitutionsmodells miteinbezogen und die Wahrscheinlichkeit für eine Transformation entlang eines Zweiges wird berechnet. Daraus lässt sich die Gesamtwahrscheinlichkeit für eine Topologie mit bestimmten Zweiglängen und Parametern ermitteln. In der ML-Analyse werden die Zweiglängen und Parameter jeder Topologie so optimiert, dass sich die maximale Wahrscheinlichkeit (= „Maximum Likelihood“) für die jeweilige Topologie ergibt. Diejenige Phylogenie, die die höchste maximale Wahrscheinlichkeit besitzt, ist die Hypothese, die favorisiert wird. Dieses Verfahren ist sehr rechenintensiv und erfordert pro Topologie relativ viel



Zeit. Die Berechnung lässt sich erheblich beschleunigen, wenn die in Modeltest optimierten Parameter des Substitutionsmodells verwendet werden, so dass die Optimierung dieser Parameter für jede Topologie entfällt.

Da die Zahl der möglichen Topologien mit der Zahl der OTUs exponentiell wächst, ist bei mehreren OTUs ( $> 10$ ) eine vollständige Analyse aller Topologien nicht mehr möglich. Deswegen wird ein heuristisches „up hill“-Verfahren verwendet. Dabei wird zunächst eine Topologie ermittelt. In der ML-Analyse werden die Zweiglängen und die Modellparameter für die Topologie optimiert. Der Wert des gewählten Optimalitätskriteriums wird bestimmt. Anschließend wird die Topologie modifiziert, indem OTUs in der Topologie verschoben werden (= „branch swapping“). Der Wert des Optimalitätskriteriums wird erneut bestimmt. Dieses Verfahren wird solange wiederholt, bis keine der Modifikationen des jeweiligen Ausgangsbaumes einen besseren Wert ergibt.

Der NJ-Algorithmus errechnet aus den paarweisen Distanzen der OTUs des multiplen Alignments das der Distanzmatrix zugrunde liegende Phylogramm. Dabei werden als erstes die beiden OTUs, die am nächsten miteinander verwandt sind (also die geringste Distanz aufweisen), zusammengruppiert. In der Distanzmatrix werden die beiden nun als ein OTU behandelt. Die Distanzmatrix wird entsprechend modifiziert und die Distanzen werden neu berechnet. Als nächstes werden wieder die beiden am nächsten verwandten OTUs gruppiert. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt bis die komplette Phylogenie der OTUs ermittelt wurde, also  $(n-3)$ -mal ( $n =$  Anzahl der OTUs) (Saitou & Nei 1987).

Um die Robustheit der Verzweigungspunkte zu bestimmen, kann in PAUP eine Bootstrap (BS)-Analyse durchgeführt werden (Felsenstein 1985). In der Bootstrap-Analyse wird eine neue Datenmatrix aus der originalen Matrix erstellt, indem die gleiche Anzahl der Positionen beibehalten wird und zufällig Positionen aus der originalen Matrix eingefügt werden. Dieses führt dazu, dass in der neuen Matrix einige Positionen mehrfach, andere gar nicht vorhanden sind. Mit der neuen Matrix wird eine phylogenetische Untersuchung genauso durchgeführt wie mit der originalen Matrix. Dieses wird mehrfach ( $\geq 100$ ) wiederholt. Aus den besten Topologien der Wiederholungen wird ein Bootstrap-Konsensusbaum ermittelt. Die Robustheit der Verzweigungspunkte ergibt sich aus dem Prozentsatz mit dem der jeweilige Verzweigungspunkt in den besten Topologien der Bootstrap-Analyse ebenfalls vorhanden ist (= BS-Werte).

*Angaben zum Programm:* PAUP (Phylogenetic Analysis using Parsimony) 4.0 b10

Copyright © 2001 bei Smithsonian Institution.

### 2.1.3.9 *Phylip*

Das Programm Phylip ist dem Programm PAUP ähnlich. Während in PAUP alle Anwendungen in einer Benutzeroberfläche implementiert sind, sind bei Phylip die einzelnen Anwendungen eigene Programme, in die die Ergebnisse der vorherigen Anwendung jeweils eingeladen werden müssen. Dieses macht das Programm Phylip im Vergleich zu PAUP Benutzer-unfreundlicher. Allerdings hat Phylip den Vorteil, dass durch das Anwendungsprogramme SeqBoot Bootstrap-Matrizes generiert und abgespeichert werden können. Diese Möglichkeit, dass die Bootstrap-Matrizes einzelnen abgespeichert werden können, ist zurzeit in PAUP noch nicht gegeben. Diese Möglichkeit war aber notwendig, da in dem Programm MetaPIGA eine Bootstrap-Analyse nicht implementiert ist. Durch die Berechnung der besten Topologie jeder einzelnen Bootstrap-Matrix mit MetaPIGA und anschließender Ermittlung eines 50% „Majority Rule“-Konsensusbaumes aus diesen Topologien in PAUP ist eine Bootstrap-Analyse aber auch für Datensätze mit einer großen Anzahl an OTUs möglich.

*Angaben zum Programm:* Phylip (Phylogeny Inference Package) 3.5c

Copyright © 1986-1999 bei Joseph Felsenstein.

### 2.1.3.10 *Puzzle*

Das Programm Puzzle führt eine ML-Analyse durch, in dem es von einer bestimmten Anzahl an zufälligen Quartetten von OTUs die Wahrscheinlichkeiten für die drei möglichen ungewurzelten Topologien berechnet. Die Summe der drei Wahrscheinlichkeiten ist 1. Aus diesen Topologien und ihren Wahrscheinlichkeiten wird eine Phylogenie aller OTUs ermittelt, die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit, dass Wahrscheinlichkeitsmuster der Topologien aus den Quartetten erklärt. Vor der Rekonstruktion der Phylogenie kann das Wahrscheinlichkeitsmuster in der „Likelihood mapping“-Analyse genutzt werden, um das phylogenetische Signal im Datensatz graphisch darzustellen (Strimmer & von Haeseler 1997). Die Darstellung kann in einem baryzentrischen Dreieck erfolgen, in dem die drei Wahrscheinlichkeiten eines Quartetts als ein Datenpunkt eingetragen werden. In diesem Dreieck steht jede Ecke für eine völlig aufgelöste dichotome Topologie, das heißt, von den drei möglichen Topologien wird eine Topologie zu 100% unterstützt. Wohin gegen ein Datenpunkt im Mittelpunkt des Dreieckes bedeutet, dass alle drei Topologien zu 33,3% unterstützt werden. In dem Dreieck lassen sich 7 Regionen definieren, die einen unterschiedlichen Grad der Auflösung unterstützen. Datenpunkte in den drei Eckbereichen des Dreiecks unterstützen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine völlig aufgelöste dichotome Baumstruktur, Datenpunkte in den drei Seitenbereichen eine polytome Baumstruktur und Datenpunkte im mittleren Bereich eine völlig unaufgelöste sternenförmige Baumstruktur. Für

jede Region kann der prozentuale Anteil der Datenpunkte angegeben werden, so dass ein Maß gegeben ist, wie stark ein völlig aufgelöste dichotome Baumstruktur von den Datensatz unterstützt wird.

*Angaben zum Programm:* Puzzle 4.0.2

Copyright © 1999 bei Korbinian Strimmer & Arndt von Haeseler

### 2.1.3.11 TreeView

Durch das Programm TreeView ist es möglich die in den phylogenetischen Berechnungen erhaltenen Stammbäume graphisch sowohl als Kladogramme wie auch als Phylogramme darzustellen und als Grafiken abzuspeichern, so dass eine graphische Bearbeitung in Grafik-Programmen wie Adobe Illustrator möglich ist.

*Angaben zum Programm:* TreeView 1.6.5

Copyright © 2001 bei Roderic D. M. Page

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Extraktion von Organismen

Die Organismen wurden mit einer 8%igen  $MgCl_2$ -Lösung als Betäubungsmittel aus dem Sediment extrahiert (Westheide 1988). Ein Erlenmeyerkolben wurde zu etwa 20% mit dem jeweiligen Sediment gefüllt. Anschließend wurde bis zum Rand des Gefäßes  $MgCl_2$ -Lösung gegeben, so dass beim Verschluss des Gefäßes mit der Hand keine Luftblasen entstanden. Nach mehrmaligem Schütteln des Kolbens folgte eine 10-minütige Inkubation. Der Überstand mit den narkotisierten Tieren wurde über einem Meiofauna-Sieb (60  $\mu m$  Gaze) dekantiert. Das Filtrat wurde mit Seewasser aus dem Sieb in eine Petrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop wurden anschließend die Individuen aus der Probe isoliert und in reines Seewasser überführt, wo sie von anheftenden Partikeln gereinigt wurden.

*Parapodrilus psammophilus* wurde mit der Seewassereis-Methode nach Uhlig *et al.* (1973) ausgetrieben. Dazu wurde in ein etwa 10 cm langes Rohr, welches unten mit einer 100  $\mu m$  Gaze bespannt war, etwa 1 – 2 cm Sediment gegeben. Der Rest des Rohres wurde mit Seewassereis aufgefüllt. Das Rohr wurde über eine bis zum Rand mit Seewasser gefüllte Glasschale so angebracht, dass die Gaze auf die Wasseroberfläche aufsetzte ohne sie zu durchstoßen. Unter die Glasschale wurde eine weitere Glasschale gestellt, um das während der Extraktion überlaufende Seewasser aufzufangen. Die Extraktion war beendet, wenn das Seewassereis geschmolzen und komplett durch die Probe gelaufen war. Die Organismen werden von dem eiskalten Wasser aus

dem Sediment in die mit Seewasser gefüllte Glasschale getrieben. Sie folgen dabei dem Wärmegradienten. Unter einem Stereomikroskop wurden anschließend die Individuen aus der Glasschale isoliert und in reines Seewasser überführt, wo sie von anhaftenden Partikeln gereinigt wurden.

### 2.2.2 Aufbereitung & Lagerung des Tiermaterials

Bei Extraktion der Tiere im Labor sowie bei einem möglichen sicheren tief gefrorenen Transport wurden die Tiere in 10 - 20 µl LTE-Puffer überführt und sofort eingefroren. Durch das Einfrieren der Proben wurde verhindert, daß es im intakten Gewebe der Tiere zu einem Abbau der DNA durch Endonukleasen kommt. Deshalb wurden auch größere Tiere in kleinere Stücke zerlegt, um ein schnelleres Einfrieren der Gewebestücke zu gewährleisten. Die Lagerung erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Ansonsten wurden die außerhalb des Labors gesammelten Tiere entweder in Persil MegaPerls<sup>®</sup>-Lösung (Bahl & Pfenninger 1996) oder in 100% Ethanol aufbewahrt. Die Aufbewahrung in Persil MegaPerls<sup>®</sup>-Lösung geht auf eine sehr einfache DNA-Isolation aus tierischem Gewebe mit einer Lösung aus handelsüblichen Detergenzien zurück. Die Tiere werden hierzu in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß mit gesättigter Lösung von Persil MegaPerls<sup>®</sup> überführt und homogenisiert. Die Bestandteile des Waschmittels lösen zum einen die Zellmembranen auf, so daß die DNA frei im Homogenisat vorliegt, zum anderen verhindern sie Enzymaktivitäten, die die DNA zerstören würden. Die Aufbewahrung in Persil MegaPerls<sup>®</sup>-Lösung wurde nur vorgenommen, wenn eine Aufbewahrung in 100% Ethanol nicht möglich war (z. B.: aufgrund einer Zerstörung der Tiere an der Oberflächenspannung der Flüssigkeit). Tiere in beiden Aufbewahrungslösungen konnten bei Raumtemperatur transportiert werden und wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.3 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kocher *et al.* (1989) (Schirmacher *et al.* 1998). Bei kleinen Tieren wurde der gesamte Organismus zur DNA-Isolierung verwendet. Bei größeren Tieren wurden Gewebeproben entweder von Körperanhängen, wie Kiemen oder Parapodien, oder von der Muskulatur entnommen. Das in 100% Ethanol fixierte Gewebe wurde zunächst in 10 µl LTE-Puffer überführt und bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Gewebe rehydratisieren konnte. Die in Persil MegaPerls<sup>®</sup>-Lösung aufbewahrten Tiere wurden kurz zentrifugiert und der Überstand mit der genomischen

DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die in LTE-Puffer aufbewahrten Gewebe konnten direkt verarbeitet werden.

90 µl Homogenisationspuffer HOM II spezial wurde zum Gewebe gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 5 µl 10 mg/ml Proteinase K ein weiterer Aufschluß der Gewebe durch proteolytische Spaltung. Da die Aktivität der Proteinase K mit der Zeit abnimmt, wurden nach 2 - 4 Stunden nochmals 5 µl 10 mg/ml Proteinase K zugegeben. Die Inkubation verlief über Nacht bei 37 °C in einem Thermoblock (Liebisch, Bielefeld). Während der Inkubationszeit wurde ein optimaler Aufschluss der Gewebe und eine Lyse der Zellen durch Senkung der Oberflächenspannung erreicht. Aggressive Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel Säuren, wurden neutralisiert und unter Einwirkung des ionischen Detergenz SDS fand eine Trennung der Nukleinsäuren von Zellbestandteilen und chromosomalen Proteinen (wie z. B. Histonen) statt. Der ebenfalls im Homogenisationspuffer enthaltene Komplexbildner EDTA inaktivierte zudem im Lysat enthaltene Nukleinsäure modifizierende Enzyme, in dem bivalente Ionen gebunden wurden, die als Cofaktoren wirken. Die in Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken wurden durch DTT reduziert.

Da SDS durch seine Protein denaturierenden Eigenschaften die PCR stört, wurde eine SDS-Fällung durchgeführt. Es wurde 40 µl 3 M KAc zugefügt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die SDS-KAc-Kristalle wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 20.800 x g und 4°C gefällt (Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg). Während die Proben wieder auf Eis standen, wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Niederschlag verworfen. Anschließend wurde nochmals 10 Minuten bei 17.300 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Durch Ausschütteln des Überstandes mit 150 µl TE gesättigtem Phenol:Chloroform: iso-Amylalkohol (25:24:1) und 5-minütiger Zentrifugation bei 8.800 x g und 4°C wurde eine Phasentrennung der Ansätze erreicht. Die Nukleinsäuren der DNA verblieben in der wäßrigen (oberen) Phase, während sich die lipophilen Proteine und die mRNAs in der organischen Phenol:Chloroform-Phase und der Phasengrenze anreicherten. Die wäßrige Phase wurde vorsichtig bis auf einen kleinen Rest in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um verbliebene DNA und Restbestandteile der Zellen vollständig zu trennen, wurden 20 µl 3 M KAc und 20 µl LTE-Puffer zu dem verbliebenen Rest und der Phenol:Chloroform-Phase gegeben, ausgeschüttelt und erneut 5 Minuten bei 8.800 x g und 4°C zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde wiederum vorsichtig abgenommen und der bereits isolierten Phase beigefügt.

Um die DNA zu fällen, wurde ein gleicher Volumenanteil iso-Propanol hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die DNA bei maximaler

Leistung (20.800 x g) und Raumtemperatur 20 Minuten abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde unter visueller Kontrolle durch Zugabe von 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum 20 Minuten bei maximaler Leistung und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschrift nochmals wiederholt, um eventuell vorhandene Salze aus dem Niederschlag zu entfernen. Das DNA-Pellet wurde schonend bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend in 25 - 50 µl ddH<sub>2</sub>O über eine Dauer von etwa zwei bis drei Tagen im Kühlschrank bei 4 °C resuspendiert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C oder im Gefrierschrank bei -20°C.

#### **2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in der Arbeitsgruppe Spezielle Botanik (Universität Osnabrück) mittels eines Photometers (Ultrospec 3000, Biotech, Freiburg) bei Wellenlängen von 260 und 280 nm, so dass gleichzeitig noch die Reinheit der DNA bestimmt werden konnte. Anschließend wurden die Proben durch Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O auf eine DNA-Konzentration von 25 ng/µl eingestellt.

#### **2.2.5 Amplifikation der Genprodukte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion**

##### *2.2.5.1 Allgemeines*

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (= „polymerase chain reaction“, PCR) können DNA-Sequenzabschnitte aus kleinsten Mengen DNA um das millionenfache vervielfältigt werden (Knippers 1995). Die Methode basiert auf einer enzymatischen Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Die Amplifikation der Zielsequenzen erfolgt in drei Schritten, die zyklisch mehrmals wiederholt werden (je nach Anwendung 20-50 mal). Zunächst wird die DNA-Doppelhelix durch Erhitzen bei etwa 94°C denaturiert, das heißt, die beiden Einzelstränge werden getrennt. An die Denaturierung schließt sich das sogenannte Annealing an. Bei einer optimalen Temperatur von 40 – 60°C lagern sich die zwei Primer an die komplementären Stellen in den Einzelsträngen an und legen damit den Startpunkt der enzymatischen Polymerisation des neuen DNA-Stranges mit ihren 3'-OH-Enden fest. Anschließend folgt die Elongation der Primer durch die enzymatische Polymerisation, die bei dem Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase von 72 °C abläuft. Die Polymerase erkennt die angelagerten Primer als Startsequenz und synthetisiert durch Anknüpfung des jeweiligen Desoxynukleotides den neuen

DNA-Strang in 5'→3'-Richtung, der komplementär zum Matrizenstrang ist. Die Synthese wird durch den Beginn des nächsten Zyklus oder dem Ende des DNA-Fragmentes unterbrochen.

Im ersten Zyklus erfolgt die Anlagerung der Primer nur an die genomische DNA und es werden sehr lange DNA-Stränge unterschiedlicher Länge synthetisiert. Diese dienen nun als zusätzliche Matrizen in den folgenden Zyklen und weisen jeweils die Startsequenz des anderen Primers auf. Durch Ablesen dieser sehr langen DNA-Stränge in die entgegengesetzte Richtung entstehen ab dem zweiten Zyklus die gewünschten kurzen DNA-Fragmente. Diese sind von den beiden Primern begrenzt und fungieren ebenfalls in den anschließenden Zyklen als Matrizen. In jedem Zyklus wird theoretisch jedes mal die gleiche Anzahl an sehr langen DNA-Strängen von der genomischen DNA synthetisiert, so dass die Anzahl linear wächst. Die gewünschten kurzen DNA-Fragmente hingegen werden in jedem Zyklus mehr als verdoppelt, da sowohl die neuen DNA-Fragmente als auch die neuen sehr langen DNA-Stränge als Matrizen hinzukommen. Ihre Anzahl nimmt also exponentiell zu. Mit steigender Zyklenzahl wird es immer unwahrscheinlicher, daß die sehr langen DNA-Stränge als Matrizen benutzt werden. Somit werden praktisch nach mehreren Zyklen nur die gewünschten DNA-Fragmente amplifiziert und am Ende ist der Anteil der sehr langen DNA-Stränge vernachlässigbar gering. In der Elektrophorese sind auch nur die gewünschten DNA-Fragmente nachweisbar.

Von diesem Standardansatz einer PCR gibt es verschiedene Modifikationen, die sowohl die Genauigkeit des Anlagerung der Primer als auch die Menge an amplifizierter DNA verbessern sollen. In dieser Arbeit wurden bei der Amplifikation jedes der drei Gene drei Modifikationen der Standard-PCR angewendet. Als erstes wurde ein normales Protokoll, wie oben beschrieben, benutzt. Das Protokoll umfasste 40 Zyklen mit einer 1-minütigen Denaturierung bei 94°C, einem 1-minütigen Annealing bei unterschiedlichen Temperaturen für die einzelnen Sequenzabschnitte (siehe unten bei den Spezifikationen) und einer 2-minütigen Elongation bei 72°C. Allerdings wurde nach Abschluss der 40 Zyklen noch eine 7-minütige Elongation bei 72°C angehängt, um eventuell nicht vollständige DNA-Fragmente bis zum Ende des komplementären Stranges zu synthetisieren.

Die nächste Modifikation, die bei nicht erfolgreicher Amplifikation in der Standard-PCR, genutzt wurde, war die Hot Start-PCR. Um eine fehlerhafte Anlagerung und Elongation der Primer während der ersten Erhitzung der Probe von Raumtemperatur auf 94°C zu vermeiden, wurde die DNA-Polymerase erst nach der Denaturierung der DNA-Doppelhelix dem Ansatz zugefügt. Durch diesen einfachen Schritt wird sowohl die Genauigkeit des Annealings als auch die Ausbeute an gewünschten DNA-Fragmenten erheblich erhöht. Dazu wurde erst die genomische DNA 5 Minuten bei 94°C denaturiert. Während einer Pause bei 94°C wurde die entsprechende Menge DNA-Polymerase in 2 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt zum Ansatz gegeben. Nach der

Zugabe der DNA-Polymerase wurde nochmals 2 Minuten bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 40 Zyklen mit einer 1-minütigen Denaturierung bei 94°C, einem 1-minütigen Annealing bei unterschiedlichen Temperaturen für die einzelnen Sequenzabschnitte (siehe unten bei den Spezifikationen) und einer 2-minütigen Elongation bei 72°C. Zum Abschluss wurde erneut eine 7-minütige Elongation bei 72°C angehängt.

Als dritte und letzte Modifikation wurde die Hot Start-PCR um die Touchdown-Option erweitert. Bei der Touchdown-Option wird mit einer sehr hohen Annealing-Temperatur angefangen, um eine hohe Genauigkeit der Anlagerung zu erreichen. Die Temperatur wird dann mit steigender Zahl der Zyklen Grad für Grad abgesenkt bis eine 5°C niedrigere Temperatur erreicht ist. Bei dieser Annealing-Temperatur werden die meisten Zyklen durchlaufen. Durch dieses Temperaturprofil wird in den ersten Zyklen erreicht, dass die Bindung der Primer an die Matrize sehr genau und fest sein muss. Allerdings ist die Ausbeute meistens sehr gering. Da es schon nach wenigen Zyklen zu einem deutlichen Überschuss an gewünschten DNA-Fragmenten gekommen ist, kann die Temperatur zur Steigerung der Ausbeute auf nicht so stringente Bedingungen abgesenkt werden. Die Wahrscheinlichkeit für die Amplifikation nicht gewünschter DNA-Fragmente wird dabei nur minimal erhöht. Die unterschiedlichen Temperaturprofile bei der Amplifikation der einzelnen Sequenzabschnitte sind unter den Spezifikationen beschrieben. Am Ende jeder PCR wurde der Thermoblock auf 4°C abgekühlt.

Die PCR wurde in 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler mit oder ohne Heizdeckel (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Um ein Verdunsten während der PCR zu verhindern, wurde jeder Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die verwendeten Reaktionskomponenten und deren Konzentrationen sind unter den Spezifikationen beschrieben. Die in den Amplifikationen eingesetzten Primer sind zusammen mit den Primern zur Sequenzierung in Tabelle 2 angegeben. Wenn die in den Spezifikationen angegebenen Standard-Paare von Primern zur Amplifikation der Sequenzabschnitte der 18S- bzw. 28S-rDNA nicht erfolgreich waren, wurden auch andere Kombinationen aus den Primern in Tabelle 2 als Paare mit allen drei Modifikationen der PCR getestet, um den vollständigen Sequenzabschnitt der 18S- bzw. 28S-rDNA in mehreren, sich überlappenden Teilstücken zu amplifizieren.

Zusätzlich zu den Ansätzen mit den DNA-Templates wurde auch jeweils eine negative Kontrolle erstellt, die alle Bestandteile des Reaktionsansatzes enthielt, mit Ausnahme von genomischer DNA. Die negative Kontrolle ermöglichte es, Verunreinigungen der Reagenzien mit Fremd-DNA auszuschließen.



**Tabelle 2:** Primer für Amplifikation und Sequenzierung der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der CO I. Nukleotide im IUB Code angegeben. Die Positionsangaben korrespondieren zu der Position der 18S-rDNA von *Nereis virens* (Z83754), der 28S-rDNA von *Drosophila melanogaster* (M21017 REGION: join 3288..5075, 5121..7232) und der CO I von *Terebratalia transversa* (AF331161).

| Name                 | Sequenz (5'→3')                               | Position    | Richtung  | Annealing-Temperatur (Sequenzierung) |
|----------------------|---|-------------|-----------|--------------------------------------|
| <b>18S-rDNA</b>      |   |             |           |                                      |
| 18F <sup>a</sup>     | AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT                   | 1 - 21      | vorwärts  | 48°C                                 |
| 18F35                | TCT CAA AGA TTA AGC CAT GCA                   | 35 – 55     | vorwärts  | 48°C                                 |
| 18R399               | CCC TCT CCG GAA TCG AAC CCT GAT               | 376 – 399   | rückwärts | 48°C                                 |
| 18F509               | CCC CGT AAT TGG AAT GAG TAC A                 | 509 – 530   | vorwärts  | 48°C                                 |
| 18R772               | CTC TAA TTT TTT CAA AGT AAA C                 | 751 – 772   | rückwärts | 40°C                                 |
| 18R925               | GAT CCA AGA ATT TCA CCT CT                    | 906 – 925   | rückwärts | 48°C                                 |
| 18F997               | TTC GAA GAC GAT CAG ATA CCG                   | 997 – 1017  | vorwärts  | 48°C                                 |
| 18R1256              | AGC TCT CAA TCT GTC AAT CCT                   | 1236 – 1256 | rückwärts | 48°C                                 |
| 18F1435              | AGG TCT GTG ATG CCC TTA GAT                   | 1435 – 1455 | vorwärts  | 48°C                                 |
| 18R1779              | TGT TAC GAC TTT TAC TTC CTC TA                | 1757 – 1779 | rückwärts | 48°C                                 |
| 18R <sup>a</sup>     | TGA TCC TCC CGC AGG TTC ACC TAC               | 1788 - 1811 | rückwärts | 45°C                                 |
| <b>28S-rDNA</b>      |   |             |           |                                      |
| 28F5 <sup>b</sup>    | CAA GTA CCG TGA GGG AAA GTT G                 | 343 – 363   | vorwärts  | 60 °C                                |
| 28F5_2 <sup>c</sup>  | GGA CCC GTC TTG AAA CAC GGA CCA AG            | 758 – 783   | vorwärts  | 50 °C                                |
| 28MT4.1 <sup>c</sup> | TCC TTG GTC CGT GTT TCA AGA GG                | 763 – 785   | rückwärts | 60 °C                                |
| 28F1_2 <sup>b</sup>  | GGG ACC CGA AAG ATG GTG AAC                   | 973 – 993   | vorwärts  | 60 °C                                |
| 28nn <sup>b</sup>    | GGA ACC AGC TAC TAG ATG GTT CG                | 1098 – 1120 | rückwärts | 50 °C                                |
| 28F2_2 <sup>b</sup>  | GCA GAA CTG GCG CTG AGG GAT GAA C             | 1320 – 1344 | vorwärts  | 45 °C                                |
| 28ff <sup>c</sup>    | GGT GAG TTG TTA CAC ACT CCT TAG CGG           | 1444 – 1470 | rückwärts | 60 °C                                |
| 28FJJ <sup>c</sup>   | GCA GAT CTT GGT GGT AGT AGC AA                | 1647 – 1669 | vorwärts  | 45 °C                                |
| 28F2_3 <sup>c</sup>  | ATC GAA AGG GAA TCG GGT TAA TAT TCC           | 1797 – 1823 | vorwärts  | 48 °C                                |
| 28R2 <sup>b</sup>    | GAG GCT GTK CAC CTT GGA GAC CTG CTG<br>CG     | 2094 – 2118 | rückwärts | 50 °C                                |
| 28F4_2 <sup>c</sup>  | AAT GTA GGT AAG GGA AGT CGG                   | 2132 – 2152 | vorwärts  | 48 °C                                |
| 28R3 <sup>b</sup>    | GAT GAC GAG GCA TTT GGC TAC C                 | 2580 – 2601 | rückwärts | 48 °C                                |
| <b>CO I</b>          |   |             |           |                                      |
| COI 3 <sup>d</sup>   | GTN TGR GCN CAY CAY ATR TTY ACN GT            | 853 – 878   | vorwärts  | 48 °C                                |
| COI 6n <sup>c</sup>  | GCR TCN GGR TAR TCN GAR TAY CGY CGN<br>GGY AT | 1300 – 1331 | rückwärts | 48 °C                                |

<sup>a</sup> zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Schlegel

<sup>b</sup> zur Verfügung gestellt von Yale Passamaneck

<sup>c</sup> in Zusammenarbeit mit Janina Jördens entworfen

<sup>d</sup> Kojima *et al.* 1997

<sup>e</sup> Hillis & Dixon 1991

### 2.2.5.2 Spezifikationen bei der Amplifikation der 18S-rDNA

Von der 18S-rDNA wurde ein Abschnitt von etwa 1750 bp aus dem Genom amplifiziert. Die Amplifikation geschah standardmäßig als ein Fragment. Dazu wurden die Primer 18F35 und 18R1779 oder 18F und 18R verwendet. Die Bedingungen im Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl waren wie folgt: 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 67 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,01% Tween-20; 2,5 - 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 - 3 ng/µl genomische DNA; 1 - 2 mM dNTPs; 200 - 600 nM von jedem Primer; 0,025 U/µl BioTherm DNA Polymerase (GeneCraft, Münster).

Die Temperatur beim Annealing war im Bereich von 45-50°C. In der Hot Start-PCR mit Touchdown-Option wurde die erste Annealing-Temperatur auf 55°C eingestellt. Die Temperatur wurde dann nach jedem zweiten Zyklus um einen Grad gesenkt. Nach 10 Zyklen wurde die Temperatur für weitere 30 Zyklen bei 50°C gehalten.

### 2.2.5.3 Spezifikationen bei der Amplifikation der 28S-rDNA

Von der 28S-rDNA wurde ein Abschnitt von etwa 2250 bp aus dem Genom amplifiziert. Die Amplifikation geschah standardmäßig in zwei Fragmenten. Dazu wurden die Primer 28F5 und 28ff, die ein etwa 1100 bp langes Fragment begrenzen, sowie die Primer 28F2\_2 und 28R3, die ein etwa 1300 bp langes Fragment amplifizieren, verwendet. Die Bedingungen im Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl waren wie folgt: 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 67 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,01% Tween-20; 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 - 3 ng/µl genomische DNA; 2 mM dNTPs; 200 - 600 nM von jedem Primer; 0,025 U/µl BioTherm DNA Polymerase (GeneCraft, Münster).

Die Temperatur beim Annealing lag im Bereich von 50-60°C. In der Hot Start-PCR mit Touchdown-Option wurde die erste Annealing-Temperatur auf 65°C bzw. 60°C eingestellt. Die Temperatur wurde dann nach jedem zweiten Zyklus um einen Grad gesenkt. Nach 10 Zyklen wurde die Temperatur für weitere 30 Zyklen bei 60°C bzw. 55°C gehalten.

### 2.2.5.4 Spezifikationen bei der Amplifikation der CO I

Von der CO I wurde ein Abschnitt von etwa 500 bp mit den Primern COI 3 und COI 6n aus dem Genom amplifiziert. Die Bedingungen im Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µl waren wie folgt: 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 67 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,01% Tween-20; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 - 3 ng/µl genomische DNA; 1 mM dNTPs; 400 - 1600 nM von jedem Primer; 0,025 U/µl BioTherm DNA Polymerase (GeneCraft, Münster).

Die Temperatur beim Annealing war im Bereich von 40-50°C. In der Hot Start-PCR mit Touchdown-Option wurde die erste Annealing-Temperatur auf 55°C eingestellt. Die Temperatur wurde dann nach jedem zweiten Zyklus um einen Grad gesenkt. Nach 10 Zyklen wurde die Temperatur für weitere 30 Zyklen bei 50°C gehalten.

### 2.2.6 Gelelektrophorese

Bei der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen macht man sich zu nutze, dass sie negativ geladen sind und somit im elektrischen Feld der Anode zustreben. Dabei erfolgt eine Auftrennung der Fragmente im Trägermedium nach Größe. Als Trägermaterial dienten bei diesen Untersuchungen 1,5%ige Agarosegele mit einer optimalen Trennschärfe zwischen 0,2 und 3 kb (Sambrook *et al.* 1989). 0,6 g Agarose wurde in 40 ml TBE-Puffer gelöst und so lange gekocht bis die Lösung klar war. Erst nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde 4 µl 1%iges Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,001%) hinzugegeben, da diese Substanz bei höheren Temperaturen instabil ist. Anschließend wurde die Lösung möglichst rasch und blasenfrei in den Gelträger gegossen und die Kämme für 16 Probenreservoirs eingesetzt. Nach etwa halbstündiger Polymerisation waren die Gele gebrauchsfertig. Die Kämme konnten entfernt und der Gelträger in die mit TBE-Puffer gefüllten Gelelektrophorese-Kammer gesetzt werden.

Je 5 µl der zu untersuchenden Proben (inklusive der negativen Kontrolle) aus der PCR wurden auf Parafilm mit 1,3 µl Gelladepuffer durchmischt und in die Taschen pipettiert. Jeweils auf den äußeren Bahnen wurde ein 100 bp DNA-Längenstandard appliziert, um die Länge der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente einschätzen zu können.

Die DNA-Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von ~ 75 V für ca. 80 Minuten, bis der im Gelladepuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau fast aus dem Gel gewandert war. Bromphenolblau wandert dabei in einem 1,5%igen Agarosegel etwa so schnell wie DNA-Moleküle mit einer Länge von 100 bp (Sambrook *et al.* 1989).

Die DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge im Gel konnten auf einem UV-Transilluminator (Bachhofer, Reutlingen) durch Fluoreszenz sichtbar gemacht und photographisch mittels einer Kamera mit Rotfilter dokumentiert werden. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid lagert sich während der Elektrophorese zwischen den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix ein und wird so in der DNA konzentriert. Durch die Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm wird die orange-rötliche Fluoreszenz angeregt.

### 2.2.7 Reinigung der Amplifikationsprodukte

Die Reinigung des Amplifikates der PCR-Ansätze von den restlichen Bestandteilen der Ansätze erfolgte mit einem Kit zur DNA-Reinigung der Firma QIAGEN (Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

Die Reaktionsansätze eines Amplifikates wurden vereinigt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das 5fache Volumen PB-Puffer wurde hinzugefügt und die Komponenten wurden vollständig gemischt. Die Probe wurde auf eine QIAquick spin Säule, einem Anionen-Austauscher, überführt und die Säule wurde in ein Reaktionsgefäß als Sammelgefäß gestellt. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 10.000 x g und Raumtemperatur durchgeführt. Zur Bindung der DNA an die Säule wurde die Probe 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Auf die Säule wurde 375 µl PE-Puffer zum Waschen gegeben und dann 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und der Waschschrift wiederholt. Um die gesamte Flüssigkeit aus der Säule zu entfernen, wurde die Probe nochmals 1 Minute zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Auf die Membran der Säule wurden 25-50 µl ddH<sub>2</sub>O pipettiert und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde durch eine 1-minütige Zentrifugation bei maximaler Leistung (20.800 x g) und Raumtemperatur von der Säule eluiert.

Um eine erfolgreiche Reinigung zu kontrollieren und die DNA-Konzentration abschätzen zu können, wurden die Proben auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und das Ergebnis photographisch festgehalten (siehe auch 2.2.6 Gelelektrophorese).

Die zur Aufreinigung eingesetzten Säulen wurden anschließend regeneriert. Dafür wurden die Säulen mit 200 µl 100%igem Ethanol beladen und 1 Minute bei 20.800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach anschließender Sterilisation im Autoklaven waren die Säulen wieder verwendbar.

### 2.2.8 Sequenzierung der Amplifikate

Die Sequenzierung der Amplifikate erfolgte nach der Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977). Bei dieser Methode wird die 5'→3'-Synthese des komplementären Stranges gezielt, aber statistisch verteilt beendet, in dem Didesoxynukleosid-tri-phosphate (= ddNTP) in einem bestimmten Verhältnis zu den Desoxynukleosid-tri-phosphaten (= dNTP) im Reaktionsansatz gegeben werden. Didesoxynukleosid-tri-phosphate haben keine 3'-OH-Gruppe, so dass die Synthese unterbrochen wird, sobald ein solches Didesoxynukleotid in die wachsende Kette eingebaut wird. Es entstehen somit unterschiedlich lange Fragmente des komplementären Stranges, die sich in der Länge um jeweils +1 bzw. -1 Base von ihren direkten

Nachbarfragmenten unterscheiden. In einem hochauflösenden Polyacrylamidgel können diese Längenunterschiede getrennt werden. Die Base am 3'-Ende des Stranges gibt an, welche Base an dieser Position in der Sequenz vorhanden ist. Durch eine Markierung der unterschiedlichen Didesoxynukleosid-tri-phosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) mit verschiedenen Fluorophoren kann diese Base über ihre jeweilige Fluoreszenz im Gel bestimmt werden. Jede Fragmentlänge hat somit ein Fluoreszenzspektrum die ihrer 3'-endständigen Base entspricht. Über das Muster der Fluoreszenzspektren im Gel kann die gesamte Sequenz Base für Base bestimmt werden. Die Reaktion wurde mit einer thermostabilen DNA-Polymerase in einem Thermocycler durchgeführt. Dieses hatte den Vorteil, dass mehrere Zyklen durchlaufen wurden und so die einzusetzende DNA-Menge relativ gering war.

Der Reaktionsansatz der Sequenzierung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Applied Biosystems. Jeder Ansatz hatte ein Endvolumen von 10 µl und enthielt neben 2 µl des ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v2.0 ca. 100 ng DNA des Amplifikates und 10 pmol des jeweiligen Primers bei der Sequenzierung der 18S- und 28S-rDNA bzw. 40 pmol bei der CO I. Da die Sequenz sowohl der 18S-rDNA mit ca. 1800 bp als auch der 28S-rDNA mit ca. 2250 bp nicht mit einem Sequenzierungsansatz bestimmt werden kann, wurde die Sequenz in mehreren sich überlappenden Teilstücken bestimmt. Die in der Sequenzierung eingesetzten Primer sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Reaktion lief in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Biometra, Göttingen) ab. Der Vorgang umfasste 25 Zyklen: eine 30-sekündige Denaturierung bei 96°C, einem 15-sekündigen Annealing bei unterschiedlichen Temperaturen je nach Primer und einer 4-minütigen Elongation bei 60 °C. Die optimalen Temperaturen jedes Primers für das Annealing sind in Tabelle 2 wiedergegeben. In einigen Fällen wurde unabhängig von der optimalen Temperatur eine Temperatur von 40°C gewählt, um ein Annealing des Primers bei nicht 100%iger Komplementarität zu erzwingen.

Anschließend wurde die DNA gefällt, um sie gereinigt im Gelladepuffer aufzunehmen. Dazu wurde zum Reaktionsansatz 60 µl 100% Ethanol und 30 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben, vorsichtig gemischt und das Gemisch in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur und 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte wiederum eine Zentrifugation bei 20.800 x g und Raumtemperatur für 10 Minuten. Das Ethanol wurde vollständig entfernt und das Pellet anschließend schonend an der Luft getrocknet.

Die so gefällten und gereinigten Sequenzprodukte wurden daraufhin in der Arbeitsgruppe Spezielle Botanik mittels des Sequenzierers ABI Prism 377 (Perkin Elmer) elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.9 Bearbeitung der Sequenzen

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Programmes Chromas 1.5 graphisch dargestellt. Zum Teil konnten die problematischen Positionen in den Sequenzen, die von dem Programm mit N gekennzeichnet wurden, durch die genaue Betrachtung der entsprechenden Fluoreszenzspektren korrigiert werden. Solche Positionen wurden mit kleingeschriebenen Nukleotid-Abkürzungen (a, g, t, c, r, y, usw.) gekennzeichnet. Die bearbeiteten Sequenzen wurden im Sequenz-Format gespeichert. Im Windows-Editor wurden die unsicheren Bereiche am Anfang und Ende jeder Sequenz entfernt und die editierte Sequenz im Textformat abgespeichert.

Die einzelnen, sich überlappenden Teilstücke der 18S- bzw. 28S-rDNA aus den Sequenzierungen wurden anschließend in GeneDoc zum vollständigen Sequenzabschnitt zusammengesetzt.

Um die Richtigkeit der Sequenzen der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der CO I zu bestätigen, wurden sie jeweils mit ihrem Komplementärstrang verglichen. Bei Unstimmigkeiten wurde mit Bezug auf die originalen Chromatogramme korrigiert oder eine Codierung entsprechend des IUB-Codes vorgenommen, wenn eine Entscheidung zu einer der Optionen nicht eindeutig möglich war.

### 2.2.10 Phylogenetische Analyse

#### 2.2.10.1 Verwendete Arten

Die in den phylogenetischen Analysen der einzelnen Gene (18S-rDNA, 28S-rDNA bzw. CO I) verwendeten Arten sowie die Zugangsnummern in GenBank (soweit vorhanden) sind in Tabelle 3 aufgeführt.

In der kombinierten Analyse der nukleären Gene 18S- und 28S-rDNA gingen die folgenden 27 Arten ein: *Amphiporus* sp., *Aplysia californica*, *Capitella capitata*, *Ctenodrilus serratus*, *Erpobdella octoculata*, *Eunice* sp., *Eurythoë complanata*, *Halicryptus spinulosus*, *Hirudo medicinalis*, *Hrabeiella periglandulata*, *Hyalinoecia tubicola*, *Limulus polyphemus*, *Lumbrineris inflata*, *Lumbrineris latreilli*, *Ophelia rathkei*, *Parergodrilus heideri*, *Phoronis vancouverensis*, *Placopecten magellanicus*, *Proceraea cornuta*, *Protodorvillea kefersteinii*, *Protodriloides chaetifer*, *Scoloplos armiger*,

*Stygocapitella subterranea*, *Stylaria lacustris*, *Terebratalia transversa*, *Trilobodrilus heideri*, *Urechis caupo*.

Die kombinierten Analyse aller Gene, der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der CO I, basierte auf den folgenden 16 Arten: *Erpobdella octoculata*, *Eunice* sp., *Eurythoë complanata*, *Hirudo medicinalis*, *Hrabeiella periglandulata*, *Hyalinoecia tubicola*, *Limulus polyphemus*, *Lumbrineris inflata*, *Lumbrineris latreilli*, *Ophelia rathkei*, *Parergodrilus heideri*, *Protodorvillea kefersteinii*, *Protodriloides chaetifer*, *Stygocapitella subterranea*, *Terebratalia transversa*, *Trilobodrilus heideri*.

**Tabelle 3:** Zugangsnummern der in den phylogenetischen Analysen verwendeten Sequenzen. + = Sequenz bekannt; - = Sequenz nicht bekannt; n. k. v. = noch keine Zugangsnummer vorhanden.

| Taxon                     | Art                                       | 18S-rDNA     | 28S-rDNA                  | CO I                      |
|---------------------------|---|--------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Annelida</b>           |   |              |                           |                           |
|                           | <i>Hrabeiella periglandulata</i>          | + (AJ310501) | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
| Aeolosomatidae            | <i>Aeolosoma hemprichi</i>                | + (AJ310500) | -                         | -                         |
|                           | <i>Aeolosoma</i> sp.                      | + (Z8374)    | -                         | -                         |
|                           | <i>Rheomorpha neiswestonovae</i>          | + (n. k. v.) | -                         | + (n. k. v.)              |
| Alvinellidae              | <i>Paralvinella palmiformis</i>           | + (AF168747) | -                         | -                         |
| Amphinomidae              | <i>Eurythoë complanata</i>                | + (AY040685) | -                         | -                         |
|                           |   | + (n. k. v.) | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
| Apistobranchidae          | <i>Apistobranchus typicus</i>             | + (AF448150) | -                         | -                         |
| Arenicolidae              | <i>Arenicola marina</i>                   | + (AJ310502) | -                         | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                           |   | + (AF508116) |                           |                           |
|                           | <i>Branchiomaldane vincenti</i>           | + (AF508117) | -                         | -                         |
| Capitellidae <sup>b</sup> | <i>Capitella capitata</i>                 | + (AF508118) | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | -                         |
|                           | <i>Dasybranchus caducus</i>               | + (AF448153) | -                         | -                         |
|                           | <i>Notomastus latericeus</i>              | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                           |   | + (AY040697) |                           |                           |
|                           |   | + (AF508121) |                           |                           |
| Chaetopteridae            | <i>Chaetopterus variopedatus</i>          | + (U67324)   | -                         | -                         |
|                           | <i>Telepsavus</i> sp.                     | + (AF448165) | -                         | -                         |
| Cirratulidae              | <i>Caulleriella parva</i>                 | + (AF448151) | -                         | -                         |
|                           | Cirratulidae                              | + (AY040682) | -                         | -                         |
|                           | <i>Dodecaceria atra</i>                   | + (AF448154) | -                         | -                         |
|                           | <i>Dodecaceria concharum</i>              | + (U50967)   | -                         | -                         |
| Clitellata                | <i>Alboglossiphonia heteroclita</i>       | + (AF103730) | -                         | -                         |
|                           | <i>Branchiobdella parasita</i>            | + (AF310690) | -                         | -                         |
|                           | <i>Cambarincola holti</i>                 | + (AF115975) | -                         | -                         |
|                           | <i>Dero digitata</i>                      | + (AF021879) | -                         | -                         |
|                           | <i>Enchytraeus</i> sp.                    | + (Z83750)   | -                         | -                         |
|                           |   | + (U95948)   |                           |                           |
|                           | <i>Erpobdella octoculata</i> <sup>c</sup> | + (AF099949) | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                           | <i>Erpobdella testacea</i>                | -            | -                         | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                           | <i>Glossiphonia complanata</i>            | + (Z83751)   | -                         | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                           | <i>Haemopsis sanguisuga</i>               | + (X91401)   | -                         | -                         |
|                           | <i>Hirudo medicinalis</i>                 | + (Z83752)   | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                           | <i>Lumbriculus variegatus</i>             | + (AF209457) | -                         | -                         |
|                           | <i>Lumbricus rubellus</i>                 | + (Z83753)   | -                         | -                         |
|                           | <i>Lumbricus terrestris</i>               | + (AJ272183) | -                         | -                         |
|                           | <i>Nais elinguis</i>                      | -            | -                         | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                           | <i>Stylaria lacustris</i>                 | -            | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | -                         |
|                           | <i>Stylaria</i> sp.                       | + (U95946)   | -                         | -                         |
|                           | <i>Tubificoides bermudae</i>              | + (AF209467) | -                         | -                         |
|                           | <i>Xironogiton victoriensis</i>           | + (AF115977) | -                         | -                         |

Fortsetzung Tabelle 3

| Taxon                      | Art                                | 18S-rDNA                                  | 28S-rDNA                  | CO I                      |
|----------------------------|------------------------------------|---|---------------------------|---------------------------|
| Ctenodrilidae <sup>b</sup> | <i>Ctenodrilus serratus</i>        | + (n. k. v.) <sup>a</sup><br>+ (AF508119) | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | -                         |
| Dinophilidae               | <i>Dinophilus gyrocolatus</i>      | + (AF412805)<br>+ (AF119074)              | -                         | -                         |
|                            | <i>Trilobodrilus axi</i>           | + (AF412806)                              | -                         | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Trilobodrilus heideri</i>       | + (AF412807)                              | + (n. k. v.)              | + (n. k. v.)              |
| "Dorvilleidae"             | <i>Dorvillea bermudensis</i>       | + (AF412802)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Dorvillea similis</i>           | + (AF412803)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Microdorvillea</i> sp. n.       | + (n. k. v.)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Ophryotrocha gracilis</i>       | + (n. k. v.)                              | -                         | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Ophryotrocha puerilis</i>       | -   | -                         | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Parapodrilus psammophilus</i>   | + (AF412800)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Parougia</i> sp.                | + (AF412798)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Pettiboneia urciensis</i>       | + (AF412801)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Protodorvillea kefersteinii</i> | + (AF412799)                              | + (n. k. v.)              | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Schistomeringos rudolphi</i>    | + (AF412804)                              | -                         | + (n. k. v.)              |
| Echiurida                  | <i>Ochetosoma erythrogrammon</i>   | + (X79875)                                | -                         | -                         |
|                            | <i>Urechis caupo</i>               | + (AF119076)                              | + (AF342804)              | -                         |
| Eunicidae <sup>b</sup>     | <i>Eunice harassii</i>             | + (n. k. v.)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Eunice pennata</i>              | + (AY040684)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Eunice</i> sp.                  | + (AF412791)                              | + (n. k. v.)              | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Eunice vittata</i>              | + (AF412790)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Lysidice ninetta</i>            | + (AF412793)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Marphysa bellii</i>             | + (AF412789)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Marphysa sanguinea</i>          | + (n. k. v.)                              | -                         | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Nematoneis unicornis</i>        | + (AF412792)                              | -                         | -                         |
| Glyceridae                 | <i>Glycera americana</i>           | + (U19519)                                | -                         | -                         |
| Hesionidae                 | <i>Kefersteinia cirrata</i>        | + (n. k. v.)                              | -                         | -                         |
| Histriobdellidae           | <i>Histriobdella homari</i>        | + (n. k. v.)                              | -                         | -                         |
| Lumbrineridae              | <i>Lumbrineris funchalensis</i>    | + (AF412796)<br>+ (AF412797)              | -                         | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Lumbrineris inflata</i>         | + (n. k. v.)                              | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                            | <i>Lumbrineris latreilli</i>       | + (n. k. v.)                              | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
| Magelonidae                | <i>Magelona mirabilis</i>          | + (U50969)                                | -                         | -                         |
| Maldanidae                 | <i>Clymenura clypeata</i>          | + (AF448152)                              | -                         | -                         |
|                            | Maldanidae                         | + (AY040694)                              | -                         | -                         |
| Nephtyidae                 | <i>Nephtys hombergii</i>           | + (n. k. v.)<br>+ (U50970)                | -                         | -                         |
| Nereidae <sup>b</sup>      | <i>Nereis limbata</i>              | + (U36270)                                | -                         | -                         |
|                            | <i>Platynereis dumerilii</i>       | -   | -                         | + (NC_000931)             |
| Oeononidae                 | <i>Arabella iricolor</i>           | + (n. k. v.)                              | -                         | + (n. k. v.)              |
| Onuphidae                  | <i>Aponuphis bilineata</i>         | + (AF412795)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Hyalinoecia tubicola</i>        | + (AF412794)                              | + (n. k. v.)              | + (n. k. v.)              |
|                            | <i>Mooreonuphis stigmatis</i>      | + (n. k. v.)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Onuphis similis</i>             | + (n. k. v.)                              | -                         | -                         |
| Opheliidae <sup>b</sup>    | <i>Ophelia bicornis</i>            | + (AF508122)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Ophelia neglecta</i>            | + (AF448156)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Ophelia rathkei</i>             | + (AF448157)                              | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                            | <i>Ophelina acuminata</i>          | + (AY083310+<br>AY083311)                 | -                         | -                         |
|                            | <i>Polyopthalmus pictus</i>        | + (AF448161)                              | -                         | -                         |
| Orbiniidae                 | <i>Leodamas johnstonei</i>         | + (AF508126)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Naineris laevigata</i>          | + (AY040696)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Orbinia bioreti</i>             | + (AF448158)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Orbinia latreilli</i>           | + (AF448159)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Proscoloplos cygnochaetus</i>   | + (AF448162)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Protoaricia oerstedii</i>       | + (AF508123)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Protoariciella uncinata</i>     | + (AF508124)                              | -                         | -                         |
|                            | <i>Scoloplos armiger</i>           | + (U50972)                                | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | -                         |



Fortsetzung Tabelle 3

| Taxon              | Art                               | 18S-rDNA     | 28S-rDNA                  | CO I                      |
|--------------------|-----------------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Oweniidae          | <i>Owenia fusiformis</i>          | + (AF448126) | -                         | -                         |
| Parergodrilidae    | <i>Parergodrilus heideri</i>      | + (AJ310504) | + (n. k. v.)              | + (n. k. v.)              |
|                    | <i>Stygocapitella subterranea</i> | + (AF412810) | + (n. k. v.)              | + (n. k. v.)              |
|                    |                                   | + (AJ310505) |                           |                           |
| Phyllodocidae      | <i>Eteone longa</i>               | + (AF448155) | -                         | -                         |
|                    | <i>Eteone picta</i>               | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    | <i>Eulalia viridis</i>            | + (n. k. v.) | -                         | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
| Pisionidae         | <i>Pisione remota</i>             | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
| Polygordiidae      | <i>Polygordius appendicularis</i> | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    | <i>Polygordius</i> sp.            | + (AF412809) | -                         | -                         |
| Polynoidae         | <i>Alentia gelatinosa</i>         | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    | <i>Harmthoë impar</i>             | + (U50968)   | -                         | -                         |
| Potamodrilidae     | <i>Potamodrilus fluviatilis</i>   | + (n. k. v.) | -                         | + (n. k. v.)              |
| Protodriloidae     | <i>Protodriloides chaetifer</i>   | + (n. k. v.) | + (n. k. v.) <sup>a</sup> | + (n. k. v.) <sup>a</sup> |
|                    | <i>Protodriloides symbioticus</i> | + (AF508125) | -                         | -                         |
| Protodrilidae      | <i>Protodrilus ciliatus</i>       | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    | <i>Protodrilus purpureus</i>      | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    |                                   | + (AJ310506) |                           |                           |
| Questidae          | <i>Questa paucibranchiata</i>     | + (AF209464) | -                         | -                         |
| Sabellidae         | <i>Sabella crassicornis</i>       | + (n. k. v.) | -                         | + (n. k. v.)              |
|                    | <i>Sabella pavonina</i>           | + (U67144)   | -                         | -                         |
| Saccocirridae      | <i>Saccocirrus papillocercus</i>  | + (AF412808) | -                         | -                         |
| Scalibregmatidae   | <i>Lipobranchus jeffreysii</i>    | + (AF508120) | -                         | -                         |
|                    | <i>Scalibregma inflatum</i>       | + (AF448163) | -                         | -                         |
|                    | <i>Travisia forbesii</i>          | + (AF508127) | -                         | -                         |
| Serpulidae         | <i>Protula</i> sp.                | + (U67142)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Spirorbis spirorbis</i>        | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
| Siboglinidae       | <i>Escarpia spicata</i>           | + (AF168741) | -                         | -                         |
|                    | <i>Galathealinum brachiosum</i>   | + (AF168738) | -                         | -                         |
|                    | <i>Lamellibrachia barhami</i>     | + (AF168742) | -                         | -                         |
|                    | <i>Oasisia alvinae</i>            | + (AF168743) | -                         | -                         |
|                    | <i>Polybrachia</i> sp.            | + (AF168739) | -                         | -                         |
|                    | <i>Ridgeia piscesae</i>           | + (X79877)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Riftia pachyptila</i>          | + (AF168745) | -                         | -                         |
|                    | <i>Sclerolinum brattstromi</i>    | + (AF315061) | -                         | -                         |
|                    | <i>Siboglinum fiordicum</i>       | + (X79876)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Spirobrachia</i> sp.           | + (AF168740) | -                         | -                         |
|                    | <i>Tevnia jerichonana</i>         | + (AF168746) | -                         | -                         |
| Spionidae          | <i>Aonides oxycephala</i>         | + (AF448164) | -                         | -                         |
|                    | <i>Boccardiella ligerica</i>      | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    | <i>Malacocercus fuliginosus</i>   | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    | <i>Polydora ciliata</i>           | + (U50971)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Pygospio elegans</i>           | + (U67143)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Scolecopsis squamata</i>       | + (AF448164) | -                         | -                         |
| Syllidae           | <i>Brania</i> sp.                 | + (n. k. v.) | -                         | -                         |
|                    | <i>Proceraea cornuta</i>          | + (n. k. v.) | + (AF212165)              | -                         |
|                    |                                   | + (AF212179) |                           |                           |
| Terebellidae       | <i>Amphitritides gracilis</i>     | + (AF508115) | -                         | -                         |
|                    | <i>Lanice conchilega</i>          | + (X79873)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Loimia medusa</i>              | + (AY040694) | -                         | -                         |
| <b>Arthropoda</b>  | <i>Artemia salina</i>             | + (X01723)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Craterostigma tasmanianuss</i> | + (AF000774) | -                         | -                         |
|                    | <i>Cylindroiulus punctatus</i>    | + (AF005448) | -                         | -                         |
|                    | <i>Ixodes ricinus</i>             | + (Z74479)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Lepidocyrtus paradoxus</i>     | + (U61301)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Lepisma saccharina</i>         | + (X89484)   | -                         | -                         |
|                    | <i>Limulus polyphemus</i>         | + (U91490)   | + (AF212167)              | + (NC_003057)             |
| <i>Nebalia</i> sp. | + (L81945)                        | -            | -                         |                           |

Fortsetzung Tabelle 3

| Taxon               | Art  | 18S-rDNA     | 28S-rDNA     | CO I         |
|---------------------|--|--------------|--------------|--------------|
| <b>Brachiopoda</b>  | <i>Lingula anatina</i>                       | + (X81631)   | -            | -            |
|                     | <i>Terebratalia transversa</i> <sup>c</sup>  | + (AF025945) | + (AF342802) | + (AF331161) |
| <b>Byrozoa</b>      | <i>Plumatella repens</i>                     | + (U12649)   | -            | -            |
| <b>Kamptozoa</b>    | <i>Barentsia hildegardae</i>                 | + (AJ001734) | -            | -            |
| <b>Kinoryncha</b>   | <i>Pycnophyes kielensis</i>                  | + (U67997)   | -            | -            |
| <b>Mollusca</b>     |  |              |              | -            |
| Bivalvia            | <i>Argopecten irradians</i>                  | + (L11265)   | -            | -            |
|                     | <i>Mytilus edulis</i>                        | + (n. k. v.) | -            | -            |
|                     | <i>Ostrea edulis</i>                         | + (L49052)   | -            | -            |
|                     | <i>Placopecten magellanicus</i> <sup>c</sup> | + (X53899)   | + (AF342798) | -            |
| Caudofoveata        | <i>Scutopus ventrolineatus</i>               | + (X91977)   | -            | -            |
| Gastropoda          | <i>Anthosiphonaria sirius</i>                | + (X98828)   | -            | -            |
|                     | <i>Aplysia californica</i> <sup>c</sup>      | + (AY039804) | + (AY026366) | -            |
|                     | <i>Aplysia</i> sp.                           | + (X94268)   | -            | -            |
| Polyplacophora      | <i>Lepidochitona corrugata</i>               | + (X91975)   | -            | -            |
| <b>Myzostomida</b>  | <i>Myzostoma cirriferum</i>                  | + (AF260585) | -            | -            |
|                     | <i>Myzostoma fissum</i>                      | + (AF260584) | -            | -            |
|                     | <i>Myzostoma</i> sp.                         | + (AF123305) | -            | -            |
| <b>Nematomorpha</b> | <i>Gordius aquaticus</i>                     | + (X80233)   | -            | -            |
| <b>Nemertini</b>    | <i>Amphiporus</i> sp. <sup>c</sup>           | + (AF119077) | + (AF342786) | -            |
|                     | <i>Prostoma eilhardi</i>                     | + (U29494)   | -            | -            |
| <b>Phoronida</b>    | <i>Phoronis australis</i>                    | + (AF119079) | -            | -            |
|                     | <i>Phoronis vancooverensis</i> <sup>c</sup>  | + (U12648)   | + (AF342797) | -            |
| <b>Priapulida</b>   | <i>Halicryptus spinulosus</i> <sup>c</sup>   | + (AF342790) | + (AF342789) | -            |
|                     | <i>Priapulus caudatus</i>                    | + (AF025927) | -            | -            |
| <b>Sipunculida</b>  | <i>Aspidosiphon misakiensis</i>              | + (AF119090) | -            | -            |
|                     | <i>Phascolopsis gouldii</i>                  | + (AF342796) | -            | -            |
|                     | <i>Phascolosoma granulatum</i>               | + (X79874)   | -            | -            |
|                     | <i>Themiste alutacea</i>                     | + (AF119075) | -            | -            |

<sup>a</sup> Sequenzen zur Verfügung gestellt von Dipl.-Biol. Janina Jördens.

<sup>b</sup> von folgenden Arten wurden die in GenBank vorhandenen Sequenzen der 18S-rDNA ausgeschlossen, da es begründete Hinweise gibt, dass sie falsch sind (Bleidorn *et al.* 2003; Martin 2001; persönliche Mitteilung Arné Nygren; eigene Untersuchungen): *Aphrodita aculeata* (Z83749), *Armandia maculata* (AY040681), *Capitella capitata* (U67323), *Ctenodrilidae* sp. n. (AJ310503), *Marphysa sanguinea* (AY040682), *Nereis virens* (Z83754), *Pectinaria regalis* (AY040698).

<sup>c</sup> nur in den kombinierten Analysen verwendete Sequenzen der 18S-rDNA.

### 2.2.10.2 Alignment der Sequenzen

Jeweils ein multiples Alignment der Sequenzen sowohl der 18S-rDNA als auch der 28S-rDNA und der CO I wurde mit dem Programm ClustalW (Thompson *et al.* 1994) durchgeführt. Entstehende Lücken („gaps“) wurden mit Strafen (= „gap-penalties“) belegt, um ihre Anzahl gering zu halten. Für die einzelnen Parameter des multiplen Alignments, wie die „gap-penalties“, wurden die Standardeinstellungen des Programmes übernommen.

Die in ClustalW errechneten Alignments der einzelnen Gene wurden anschließend im Programm GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997) visuell kontrolliert und manuell korrigiert. Gleichzeitig wurden die Bereiche, die sich nicht mit 100%iger Sicherheit homologisieren liessen, ermittelt. In den späteren Analysen wurden diese unsicheren Bereiche sowie die Sequenzen der Primer für die Amplifikation am Anfang und Ende jedes Alignments ausgeschlossen. Die Alignments wurden anschließend sowohl in der gesamten Länge als auch in der um die ausgeschlossenen Bereiche gekürzten Länge im Aln-, Phylip-, PIR- und FASTA-Format gespeichert und mit Hilfe von PAUP 4.0 b10 in das Nexus-Format konvertiert.

Durch die Zusammenführung der Alignments der einzelnen Gene, reduziert um die nicht in der Analyse verwendeten Taxa, wurden die Alignments für die kombinierten Analysen hergestellt.

### 2.2.10.3 Voruntersuchungen am Alignment

Vor den phylogenetischen Analysen wurden verschiedene Parameter der Datensätze bestimmt. Die drei Gene haben Bereiche unterschiedlicher Variabilität (Nylander *et al.* 1999; Van de Peer *et al.* 2000). Diese Unterschiede müssen in phylogenetischen Analysen adäquat berücksichtigt werden (z. B. Milinkovitch *et al.* 1996; Swofford *et al.* 1996; Van de Peer *et al.* 2000). Vorab wurden in dieser Arbeit die Bereiche unterschiedlicher Variabilität definiert. Der Unterschied der allgemeinen Mutationsrate sowie der einzelnen Substitutionsraten zwischen den Variabilitätsbereichen und untereinander wurde ermittelt. In Bereichen, die sich durch erhöhte Substitutionsraten auszeichnen, kann häufig eine Sättigung von einzelnen Substitutionstypen bei zunehmender genetischer Distanz beobachtet werden (Swofford *et al.* 1996). Die Datensätze wurden daraufhin untersucht. In allen Analysen wird implizit angenommen, dass die Basenfrequenzen über alle Taxa homogen sind (Swofford *et al.* 1996). Deswegen wurden die mittleren Basenfrequenzen bestimmt und ein Homogenitätstest durchgeführt. Abschließend wurde noch das phylogenetische Signal der Datensätze mit der Likelihood-Mapping-Analyse abgeschätzt (Strimmer & von Haeseler 1997).

#### 2.2.10.3.1 Definition der Variabilitätsbereiche

Die Definition der Variabilitätsbereiche der 18S- und 28S-rDNA in den verschiedenen Datensätzen erfolgte für jedes einzelne Gen durch eine „sliding window“-Analyse (Pesole *et al.* 1992; Sturmbauer & Meyer 1992). Dazu wurde in PAUP 4.0 b10 mit dem Befehl „CStatus Full=Yes“ der vollständige Charakterstatus einer Position ermittelt. Dieser wurde ausgedruckt und in einem Fenster von 9 Positionen wurde der prozentuale Grad der genetischen Variation bestimmt. Die genetische Variation wird ausgedrückt als der Prozentsatz von 27 möglichen

Basensubstitutionen in einem Fenster von 9 Positionen. Während der Analyse entlang des Datensatzes wurde das Fenster allerdings nicht um 9 sondern um 6 Positionen verschoben, so dass sich die Fenster um 3 Positionen überlappten und die Variabilität homogener erfasst werden konnte. Die Fenster von 6 Positionen wurden entsprechend ihrem prozentualen Grad der genetischen Variation in Variabilitätsbereiche eingeteilt. In jeder Analyse wurde ein Bereich von 0 - 20% genetischer Variation angenommen. Die Fenster mit größerer genetischer Variation wurden in weitere 2-4 Variabilitätsbereiche eingeteilt, so dass die Variabilitätsbereiche eine etwa gleiche Anzahl an Positionen enthielten. In den Untersuchungen, die nur auf den einzelnen Genen basierten, waren die Bereiche für die 18S-rDNA 20-40%, 40-60%, 60-80% und 80-100% bzw. für die 28S-rDNA 20-30%, 30-50%, 50-70% und 70-100%. In der kombinierten Analyse der beiden nukleären Gene waren die Bereiche für die 18S-rDNA 20-30% und 30-100% bzw. für die 28S-rDNA 20-30%, 30-50%, 50-70% und 70-100%. In der kombinierten Analyse aller Gene waren die Bereiche für die 18S-rDNA 20-30% und 30-100% bzw. für die 28S-rDNA 20-30%, 30-50% und 50-100%.

Die Variabilitätsbereiche der protein-codierenden CO I wurden in allen Analysen nicht über die „sliding window“-Analyse bestimmt, sondern ergaben sich aus dem Codon-Triplett für eine Aminosäure. Es wurden die Variabilitätsbereiche erste, zweite und dritte Position definiert.

#### *2.2.10.3.2 Bestimmung der allgemeinen mittleren Mutationsraten sowie der einzelnen mittleren Substitutionsraten und deren Verhältnis*

Über die Bestimmung der paarweisen Differenzen der OTUs eines Alignments konnten die allgemeinen mittleren Mutationsraten, die einzelnen mittleren Substitutionsraten, sowohl der einzelnen Substitutionstypen (z. B. A↔G) als auch der Transversion und Transition, und das Verhältnis der mittleren Transitions- zu Transversionsraten für das gesamte Alignment wie für die einzelnen Variabilitätsbereiche bestimmt werden. Dazu wurden in PAUP 4.0 b10 mit dem Befehl „PairDiff /ShortFmt=Yes LongFmt=No“ und durch den Ein- bzw. Ausschluss der verschiedenen Variabilitätsbereiche die paarweisen Differenzen der OTUs ermittelt. In Microsoft Word wurden die Ergebnisse in eine Tabelle umgewandelt, die in Microsoft Excel genutzt werden konnten. Die einzelnen Substitutionsraten wurden errechnet in dem für jedes Paar von OTUs der Quotient aus der absoluten Anzahl der jeweiligen Substitution und der gesamten Anzahl gepaarter Positionen gebildet wurde. Die Transitions- und Transversionsraten und die allgemeine Mutationsrate jedes Paares ergaben sich durch die Summation der Raten der entsprechenden Substitutionen. Anschließend wurden die Mittelwerte aus den Werten aller möglichen OTU-Paare berechnet. Das Verhältnis der Transitions- zu Transversionsraten wurde aus den Mittelwerten der beiden Raten gebildet.

### 2.2.10.3.3 Bestimmung der Sättigung

Die Ergebnisse der paarweisen Differenzen der OTUs (siehe 2.2.10.3.2 Bestimmung der allgemeinen mittleren Mutationsraten sowie der einzelnen mittleren Substitutionsraten und deren Verhältnis) lassen sich in Microsoft Excel auch zur Überprüfung auf eine Sättigung sowohl für das gesamte Alignment als auch für die einzelnen Variabilitätsbereiche nutzen. Dazu wurden die Transitions- bzw. Transversionsraten jedes Paares gegen die jeweilige unkorrigierte paarweise Distanz  $p$  in einem Diagramm aufgetragen. In das Diagramm wurden zwei Trendlinien mit Formel und Bestimmtheitsmaß  $R^2$  eingefügt, um den Verlauf der Kurve und den Unterschied zwischen einem linearen und einem gesättigten Verlauf zu verdeutlichen. Die erste Trendlinie wurde durch eine lineare Regression und die zweite durch eine polynomische Regression 2. Ordnung berechnet.

### 2.2.10.3.4 Bestimmung der mittleren Basenfrequenzen

Durch den Befehl „BaseFreq“ in PAUP 4.0 b10 konnten sowohl für das gesamte Alignment eines Genes als auch für die einzelnen Variabilitätsbereiche die mittleren Basenfrequenzen bestimmt werden. Gleichzeitig wurde eine Homogenitätstest über alle OTUs durchgeführt.

### 2.2.10.3.5 Likelihood-Mapping-Analyse

Die Likelihood-Mapping-Analyse der in die phylogenetischen Analysen eingegangenen Datensätze wurde mit dem Programm Puzzle durchgeführt. Es wurden die Wahrscheinlichkeiten für die drei Topologien von 10.000 Quartetten berechnet. Für eine korrekte Abschätzung des phylogenetischen Signals ist es wichtig, aus den in Puzzle möglichen Substitutionsmodellen das Substitutionsmodell zu wählen, welches dem optimalen Substitutionsmodell möglichst nahe kommt, da sonst das phylogenetische Signal zu hoch bestimmt wird (Struck *et al.* 2002b). Das optimale Substitutionsmodell war für alle Berechnungen das „general time reversible“-Modell (Lanave *et al.* 1984; Tavaré 1986; Rodríguez *et al.* 1990) mit einer  $\Gamma$ -Verteilung (Yang 1993, 1994) und einem Anteil invarianter Positionen (Gu *et al.* 1995; Waddell & Steel 1997), siehe auch 2.2.10.5.1 Modeltest und 2.2.10.7.1 MrModeltest. Deswegen wurde das Modell von Tamura & Nei (1993) mit einer  $\Gamma$ -Verteilung und 4 Kategorien gewählt. Die Parameter des Modells wurden angenähert bestimmt („fitting approximate“). Die Darstellung des phylogenetischen Signals erfolgte in baryzentrischen Dreiecken (siehe 2.1.3.10 Puzzle).

#### 2.2.10.4 Generalisierte Parsimonie

Aufgrund der Ergebnisse der Voruntersuchungen (siehe 3.2 Ergebnisse der Voruntersuchungen) wurde eine ungewichtete, über alle Positionen gleichgewichtete Parsimonie-Analyse, also eine Maximum Parsimonie-Analyse, für alle Gene abgelehnt, da sie den Datensatz nicht in adäquater Weise wiedergegeben würde. Vielmehr wurde eine generalisierte Parsimonie-Analyse angewendet (Swofford *et al.* 1996), in der über definierte Gewichtungen die Unterschiede sowohl zwischen den Transitions- und Transversionsraten als auch zwischen den Variabilitätsbereichen berücksichtigt wurden.

##### 2.2.10.4.1 Ermittlung der optimalen Gewichtung

Die Gewichtungen für die Gene in den Analysen, die nur auf einem Gen beruhen, wurden ermittelt, in dem die Transitions- und Transversionsraten aller Variabilitätsbereich durch die größte Rate in den Variabilitätsbereichen geteilt wurden. Anschließend wurde der Kehrwert gebildet und der Wert mit 2 multipliziert, um eine feinere Abstufung der Gewichtungen zu erhalten. Für die Gewichtungsschemata in PAUP wurden die Gewichtungen auf ganze Zahlen auf- oder abgerundet.

Die Gewichtungen in den kombinierten Analysen wurden ähnlich bestimmt. Anstelle der größten Rate ein jedes Genes in der Analyse wurde die größte Rate des gesamten Datensatz verwendet. Dadurch konnten neben den Unterschieden in den einzelnen Variabilitätsbereichen eines Gens auch die Unterschiede zwischen den Genen in adäquater Weise berücksichtigt werden.

Die in den Analysen angewendeten Gewichtungen sind in Tabelle 4 angegeben. In allen Analysen wurde die dritte Position der CO I ausgeschlossen (siehe 3.2 Ergebnisse der Voruntersuchungen sowie 3.3 Phylogenetische Analysen).

**Tabelle 4:** Gewichtungen der Transitionen und Transversionen in den einzelnen Variabilitätsbereichen bei den verschiedenen Analysen. Die dritte Position bei der CO I wurde in allen Analysen ausgeschlossen.

| Variabilitätsbereich | Analyse mit 18S-rDNA |        |        |        |         | Analyse mit 28S-rDNA |        |        |        |         | Analyse mit CO I |        |
|----------------------|----------------------|--------|--------|--------|---------|----------------------|--------|--------|--------|---------|------------------|--------|
|                      | 0-20%                | 20-40% | 40-60% | 60-80% | 80-100% | 0-20%                | 20-30% | 30-50% | 50-70% | 70-100% | erste            | zweite |
| <b>Transition</b>    | 22                   | 6      | 3      | 2      | 3       | 17                   | 5      | 4      | 3      | 3       | 4                | 11     |
| <b>Transversion</b>  | 53                   | 12     | 4      | 2      | 2       | 29                   | 9      | 6      | 3      | 2       | 4                | 7      |

| Variabilitätsbereich | kombinierte Analyse mit 18S- & 28S-rDNA |        |         |          |        |        |        |         |
|----------------------|---|--------|---------|----------|--------|--------|--------|---------|
|                      | 18S-rDNA                                |        |         | 28S-rDNA |        |        |        |         |
|                      | 0-20%                                   | 20-30% | 30-100% | 0-20%    | 20-30% | 30-50% | 50-70% | 70-100% |
| <b>Transition</b>    | 19                                      | 6      | 4       | 17       | 5      | 4      | 3      | 3       |
| <b>Transversion</b>  | 28                                      | 9      | 5       | 29       | 9      | 6      | 3      | 2       |

| Variabilitätsbereich | kombinierte Analyse mit 18S-rDNA, 28S-rDNA & CO I |        |         |          |        |        |         |       |        |
|----------------------|---|--------|---------|----------|--------|--------|---------|-------|--------|
|                      | 18S-rDNA  |        |         | 28S-rDNA |        |        |         | CO I  |        |
|                      | 0-20%   | 20-30% | 30-100% | 0-20%    | 20-30% | 30-50% | 50-100% | erste | zweite |
| <b>Transition</b>    | 14  | 5      | 4       | 13       | 4      | 3      | 3       | 4     | 12     |
| <b>Transversion</b>  | 30  | 7      | 4       | 23       | 6      | 4      | 2       | 4     | 7      |

#### 2.2.10.4.2 Phylogenetische Analyse

Phylogenetische Analysen nach dem Parsimonie-Kriterium sind bei einer großen Zahl an OTUs (> 100) und einer nicht eindeutigen Unterstützung einer Verwandtschaftshypothese sehr rechen- und zeitintensiv, wenn sie ohne Beschränkungen in der Zahl der gespeicherten Bäume oder der absolut versuchten Modifikationen der Bäume (= „branch swapping“) durchgeführt werden. Solche Einschränkungen erhöhen aber die Wahrscheinlichkeit bei einer heuristischen Suche die beste Lösung nicht zu finden. Um dieses zu vermeiden und gleichzeitig die Rechenzeit erheblich zu verkürzen, wurde eine zweistufige Parsimonie-Analyse durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde versucht durch ein ungenaues, aber mehrmals wiederholtes Verfahren die beste Lösung zu finden. Dazu wurden die Taxa bei der Bildung des ersten Stammbaumes schrittweise und zufällig hinzugefügt (= „random taxon addition“) und dieses wurde 100mal wiederholt. Das „branch swapping“ wurde mit der TBR (= „tree bisection and reconnection“)-Methode durchgeführt. Entscheidend war, dass in jeder Wiederholung maximal 50 Bäume gespeichert wurden. Wenn dieser Grenzwert erreicht wurde, wurden nur noch diese 50 Bäume modifiziert (ohne dass allerdings neue Bäume gespeichert wurden). Wenn dabei keine bessere Hypothese gefunden wurde, wurde die Wiederholung beendet und die nächste begann.

Die Befehlszeile in PAUP war wie folgt:

```
„HSearch /Swap=TBR AddSeq = Random NReps=100 Retain=No NChuck=50 ChuckScore=1“.
```

Dadurch war eine schnelle Suche nach der besten Lösung möglich. Allerdings wurden nur maximal 50 und nicht alle möglichen besten Möglichkeiten gespeichert. Um alle besten

Lösungen zu ermitteln und um zu gewährleisten, dass eine bessere Lösung nicht gefunden wird, wurde ein zweiter Schritt vorgenommen. In diesem Schritt wurden die 50 besten Bäume als Startpunkt für die heuristische Suche verwendet. Der heuristischen Suche wurden keine Beschränkungen aufgelegt, so dass so viele Bäume gespeichert und so viele Modifikationen der Bäume vorgenommen werden konnten wie notwendig waren. Das „branch swapping“ wurde mit der TBR-Methode durchgeführt.

Die Befehlszeilen in PAUP waren wie folgt:

„Gettrees File=*Name des Tree-Files* Mode=7“ und

„HSearch /Start=Current Swap=TBR Retain=No“.

In allen Analysen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Gewichtungen für die einzelnen Variabilitätsbereiche verwendet und Lücken im Alignment (= „gaps“) wurden als fehlend gewertet. Aus allen besten Bäumen wurde der strikte Konsensusbaum gebildet.

#### 2.2.10.4.3 Test von Hypothesen

Da verschiedene Verwandtschaftshypothesen für die Dinophilidae diskutiert werden, wurde getestet, ob bestimmte Hypothesen gegenüber anderen Hypothesen oder der besten Lösung signifikant abgelehnt werden können. In allen Analysen wurden folgende Hypothesen getestet:

- a) Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,
- b) Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae und
- c) Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“.

Die Hypothesen wurden in den phylogenetischen Analysen in PAUP durch den Befehl „constraints“ und die Optionen „enforce“ und „constraints“ in der heuristischen Suche erzwungen, so dass nur Bäume, die die jeweilige Hypothese unterstützten, in der Analyse verwendet wurden. Es wurde wie in der ungezwungenen Analyse eine zweistufige Analyse durchgeführt (siehe 2.2.10.4.2 Phylogenetische Analyse).

Anschließend wurden die besten Lösungen der Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae statistisch gegeneinander getestet. Dazu wurden die Signifikanztests nach Tempelton (1983) und nach Kishino & Hasegawa (1989) benutzt. Mit diesen beiden Signifikanztests wurden auch die besten Lösungen der drei Hypothesen gegen die besten Lösungen aus der ungezwungenen Analyse statistisch verglichen.



### 2.2.10.5 *Maximum Likelihood*

#### 2.2.10.5.1 *Modeltest*

Aufgrund der Anordnung der Hierarchie-Ebenen im hierarchischen Likelihood Verhältnis-Test kann es zu falschen Schlussfolgerungen kommen. Die erste Ebene der Unterscheidung betrifft die Entscheidung zwischen gleichen und empirisch aus dem Datensatz ermittelten Basenfrequenzen [das Modell von Jukes & Cantor (1969) gegen das von Felsenstein (1981)]. Auf dieser Ebene sind die Unterschiede meistens noch nicht signifikant, so dass eine gleiche Verteilung der Basenfrequenzen von je 25% im weiteren Test angenommen wird. Ein Vergleich des optimalen komplexeren Substitutionsmodells mit gleichen Basenfrequenzen gegen das entsprechende Substitutionsmodell nur mit empirisch ermittelten Basenfrequenzen ergibt allerdings signifikante Unterschiede (eigene Beobachtungen sowie Cunningham *et al.* 1998; Zhang 1999; Posada & Crandall 2001). Da die Anordnung der Hierarchie-Ebenen einen deutlichen Einfluss auf die Wahl des optimalen Modells hat, wurde in allen Analysen die Auswahl des optimalen Substitutionsmodells basierend auf dem Akaike Informationskriterium und nicht auf dem hierarchischen Likelihood Verhältnis-Test getroffen.

In der Analyse, die nur auf der 18S-rDNA basierte, wurde ein reduzierter Modeltest durchgeführt. Da im Programm MetaPIGA nur 4 Substitutionsmodelle mit je 4 Möglichkeiten der Ratenheterogenität implementiert sind (siehe 2.1.3.4 MetaPIGA), wurden nur die 16 möglichen Substitutionsmodelle getestet. In den anderen Analysen, die alle mit dem Programm PAUP 4.0 b10 durchgeführt wurden, wurden alle 56 möglichen Modelle getestet. Die genaue Anwendung des Programmes Modeltest ist in 2.1.3.5 Modeltest beschrieben.

Die ermittelten Modelle sowie die optimalen Modellparameter sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Die angegebenen Daten für die Analyse basierend auf der 18S-rDNA entsprechen dem Substitutionsmodell nach Hasegawa *et al.* (1985) und für die anderen Analysen dem „general time reversible“-Modell (Lanave *et al.* 1984; Tavaré 1986; Rodríguez *et al.* 1990). Des Weiteren ist in allen Analysen eine  $\Gamma$ -Verteilung (Yang 1993, 1994) mit einem Anteil invarianter Positionen (Gu *et al.* 1995; Waddell & Steel 1997) optimal. Diese Modelle und Parameter sind jeweils in die phylogenetischen Analysen eingegangen.

**Tabelle 5:** Bedingungen der Substitutionsmodelle, die in den Maximum Likelihood - Analysen benutzt wurden.  
n. a. = nicht angewendet

|                                      |                                      | 18S-rDNA | 28S-rDNA | CO I   | 18S-rDNA<br>& 28S-rDNA | 18S-rDNA,<br>28S-rDNA<br>& CO I |
|--------------------------------------|--------------------------------------|----------|----------|--------|------------------------|---------------------------------|
| Nukleotid-<br>frequenz               | A                                    | 0,2572   | 0,2590   | 0,2391 | 0,2565                 | 0,2484                          |
|                                      | C                                    | 0,2160   | 0,2165   | 0,1973 | 0,2247                 | 0,2215                          |
|                                      | G                                    | 0,2812   | 0,3017   | 0,2093 | 0,2929                 | 0,2916                          |
|                                      | T                                    | 0,2452   | 0,2228   | 0,3543 | 0,2259                 | 0,2385                          |
| Transition/Transversion - Verhältnis |                                      | 1,5639   | n. a.    | n. a.  | n. a.                  | n. a.                           |
| Relative<br>Substitutions-<br>raten  | A - C                                | n. a.    | 0,8245   | 2,3910 | 0,8664                 | 1,0533                          |
|                                      | A - G                                | n. a.    | 1,8730   | 5,4883 | 2,0124                 | 2,2917                          |
|                                      | A - T                                | n. a.    | 1,0367   | 2,2950 | 1,0242                 | 1,1609                          |
|                                      | C - G                                | n. a.    | 0,7162   | 2,2971 | 0,7096                 | 0,7780                          |
|                                      | C - T                                | n. a.    | 4,7728   | 4,4828 | 4,4512                 | 4,4621                          |
|                                      | G - T                                | n. a.    | 1,0000   | 1,0000 | 1,0000                 | 1,0000                          |
| Raten-<br>heterogenität              | Anteil invarianter<br>Positionen (I) | 0,2540   | 0,2742   | 0,4361 | 0,3251                 | 0,3993                          |
|                                      | Γ-Verteilung                         |          |          |        |                        |                                 |
|                                      | Gestaltspareter $\alpha$             | 0,6759   | 0,6116   | 0,6855 | 0,6154                 | 0,6068                          |

#### 2.2.10.5.2 Phylogenetische Analyse

Die Analyse, die nur auf der 18S-rDNA basierte, wurde mit dem Programm MetaPIGA durchgeführt. Es wurde das Substitutionsmodell nach Hasegawa *et al.* (1985) mit einer  $\Gamma$ -Verteilung und einem Anteil invarianter Positionen gewählt. Das Verhältnis der Transitionen zu Transversionen wurde vorab mit 1,536 festgesetzt, dieses entspricht einem K (= Kappa) von 3,0993. Die anderen Modellparameter (Basenfrequenzen, Gestaltspareter  $\alpha$  und Anteil invarianter Positionen) wurden empirisch aus dem Datensatz ermittelt. Es wurden 4 Populationen mit jeweils 4 Individuen in der phylogenetischen Analyse benutzt. In der Konsensus-Beschneidung (= „Consensus Pruning“) wurde die Option Gruppenwahrscheinlichkeit gewählt. Bei dieser Option ist die Wahrscheinlichkeit mit der eine Konsensusgruppe nicht mehr getrennt werden darf proportional zu den Gruppen, die diese Konsensusgruppe unterstützen. Die Bäume am Anfang der Berechnung wurden über den implementierten verbrauchten NJ-Algorithmus mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5 ermittelt. Ansonsten wurden die Standardeinstellungen des Programms beibehalten.

Bei den anderen Berechnungen wurde das Programm PAUP 4.0 b10 verwendet, da maximal 32 OTUs verwendet wurden. Dadurch konnte das „general time reversible“-Modell gewählt werden. Die optimalen Parameter aus Tabelle 5 wurden in den Analysen vorab über den Befehl „Lset“ festgelegt, so dass diese Parameter während der Optimierung eines Stammbaumes in der heuristischen Suche nicht mehr verändert wurden. Dieses beschleunigte die Berechnungen erheblich. Die Taxa wurden bei der Bildung des ersten Baumes der heuristischen Suche schrittweise zufällig hinzugefügt und die heuristische Suche wurde 10mal wiederholt. Das

„branch swapping“ wurde mit der TBR-Methode durchgeführt. Bei Bedarf wurde der strikte Konsensusbaum gebildet.

#### *2.2.10.5.3 Test von Hypothesen*

Wie in der Parsimonie-Analyse können auch in der ML-Analyse in PAUP Hypothesen getestet werden. Auch in diesen Analysen wurden die drei Hypothesen Monophylie der Eunicida mit und ohne die Dinophilidae sowie Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“ getestet.

Die Hypothesen wurden in den phylogenetischen Analysen in PAUP durch den Befehl „constraints“ und die Optionen „enforce“ und „constraints“ in der heuristischen Suche erzwungen, so dass nur Bäume, die die jeweilige Hypothese unterstützten, in der Analyse verwendet wurden. Es wurden dieselben Bedingungen wie in der ungezwungenen Analyse angewendet (siehe 2.2.10.5.2 Phylogenetische Analyse und Tabelle 5).

Anschließend wurden die besten Lösungen der Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae statistisch gegeneinander getestet. Dazu wurde der Signifikanztest nach Kishino & Hasegawa (1989) benutzt. Mit dem Signifikanztest nach Shimodaira & Hasegawa (1999) wurden die besten Lösungen der drei Hypothesen gegen die besten Lösungen aus der ungezwungenen Analyse statistisch verglichen.

In der Analyse mit der 18S-rDNA konnten keine Hypothesen getestet werden, da in MetaPIGA eine Option, die die Vorgabe von erzwungenen Konsensusgruppen in der Analyse erlauben würden, noch nicht implementiert wurde. Aufgrund der Anzahl von 173 OTUs ist eine Analyse in PAUP nicht mehr in angemessener Zeit (< 1- 2 Monate pro Analyse) möglich.

#### *2.2.10.6 Überprüfung der Robustheit der Zweige durch Bootstrapping*

Um die Robustheit der Zweige gegen statistische Stichprobenfehler in den besten Lösungen zu überprüfen, wurde sowohl in den generalisierten Parsimonie- als auch in den ML-Analysen ein nicht-parametrisches Bootstrapping angewendet (Felsenstein 1985).

In der generalisierten Parsimonie wurden die Gewichtungen der phylogenetischen Analyse verwendet (siehe 2.2.10.4.2 Phylogenetische Analyse). Die Anzahl der gespeicherten Bäume pro Wiederholung wurde bei der Stammbaumrekonstruktion auf maximal 100 festgesetzt. Die Taxa wurden bei der Bildung des ersten Baumes der Stammbaumrekonstruktion schrittweise in der Reihenfolge des Alignments hinzugefügt (= „simple taxon addition“). Die TBR-Methode wurde für das „branch swapping“ genutzt. Bei der Analyse der 18S-rDNA wurden 250 Wiederholungen durchgeführt, bei den anderen Analysen 1000.

Außer in der ML-Analyse der 18S-rDNA wurde das Bootstrapping in den anderen ML-Analysen in PAUP durchgeführt. Es wurden die optimierten Parameter und das Modell der phylogenetischen Analyse verwendet (siehe 2.2.10.5.2 Phylogenetische Analyse und Tabelle 5). Die Taxa wurden schrittweise in der Reihenfolge des Alignments hinzugefügt und die TBR-Methode wurde für das „branch swapping“ angewendet. Es wurden 100 Wiederholungen durchgeführt.

Eine Bootstrapping-Option ist in dem Programm MetaPIGA nicht implementiert, trotzdem kann sie durchgeführt werden. Mit der Programmoption BootSeq des Programms Phylip wurden 100 Datensätze für das Bootstrapping aus dem originalen Datensatz generiert. Diese 100 Datensätze im Phylip-Format wurden mit PAUP in das Nexus-Format konvertiert. Mit jedem der 100 Datensätze im Nexus-Format wurde eine phylogenetische Analyse in MetaPIGA durchgeführt. Die verwendeten Einstellungen in der Analyse waren dieselben wie bei der phylogenetischen Analyse der originalen Datenmatrix (siehe 2.2.10.5.2 Phylogenetische Analyse), nur das Verhältnis der Transitionen zu Transversionen wurde nicht vorab festgelegt. Dieses Verhältnis wurde im Laufe der Analyse alle 100 Generationen optimiert. Die ermittelten Bäume aus den 100 Datensätzen wurde in das Programm PAUP über den Befehl „gettrees“ eingelesen und der „50% Majority Rule“-Konsensusbaum wurde bestimmt. Dieser „50% Majority Rule“-Konsensusbaum entspricht dem Bootstrap-Konsensusbaum in PAUP.

### 2.2.10.7 Bayes'sche Analyse

#### 2.2.10.7.1 MrModeltest

Genauso wie im Modeltest für die ML-Analyse kann es im Modeltest für die Bayes'sche Analyse zu falschen Schlussfolgerungen aufgrund der Anordnung der Hierarchie-Ebenen im hierarchischen Likelihood Verhältnis-Test kommen. Deswegen wurde auch in MrModeltest in allen Analysen die Auswahl des optimalen Substitutionsmodells basierend auf dem Akaike Informationskriterium getroffen.

In allen Analysen wurden die 24 in MrBayes möglichen Modelle getestet. Die genaue Anwendung des Programmes MrModeltest ist in 2.1.3.7 MrModeltest beschrieben. Das optimale Substitutionsmodell in allen Analysen ist das „general time reversible“-Modell mit einer  $\Gamma$ -Verteilung und einem Anteil invarianter Positionen. Dieses Modell wurden in allen Bayes'schen Analysen verwendet.

### 2.2.10.7.2 Phylogenetische Analyse

Die Bayes'sche Analyse wurde mit dem Programm MrBayes durchgeführt. Es wurde für alle Analysen das „general time reversible“-Modell mit einer  $\Gamma$ -Verteilung und einem Anteil invarianter Positionen gewählt. Die Befehle in MrBayes, die die Modellparameter und die Grenzen für die „prior distribution“ der Modellparameter angeben, waren:

```
lset nst = 6 rates = invgamma und  
prset revmatpr = uniform(0.0,50.0) statefreqpr = dirichlet(1,1,1,1) shapepr = uniform(0.0,100.0)  
pinvarpr = uniform(0.0,1.0).
```

Es wurde in allen Analysen die MCMCMC-Methode angewendet. Es wurden 4 Ketten, 3 heiße und 1 kalte, gestartet und nach 10.000.000 Generationen wurden die Ketten beendet. Alle 500 Generationen wurden der beste Baum gespeichert und alle 10.000 Generationen wurden die Likelihood-Werte der Bäume und die noch verbleibende Rechenzeit auf dem Bildschirm angezeigt. Um zu gewährleisten, dass während der MCMCMC-Methode innerhalb der festgesetzten Anzahl an Generationen das absolute Optimum und ein stabiles Gleichgewicht erreicht wurde, wurden in allen Analysen der beste Baum aus der ML-Analyse und nicht zufällige Bäume als Startbäume genommen. Ansonsten wurden die Standardeinstellungen des Programms verwendet. Der Befehl in MrBayes war:

```
mcmc ngen = 10000000 nchains = 4 samplefreq = 500 printfreq = 10000 savebrlens = yes  
startingtree = User.
```

Nach Beendigung der Ketten wurde aus den sich im stabilen Gleichgewicht befindenden Bäumen der „50% Majority Rule“-Konsensusbaum gebildet, um die „posterior probabilities“ der einzelnen Gruppen von Taxa zu bestimmen. Dazu wurden die Likelihood-Werte jeder 500.ten Generation gegen die Generationen in Microsoft Excel in ein Diagramm eingetragen. Dieses ermöglichte eine relativ einfache Ermittlung des stabilen Gleichgewichtes sowie dessen Beginns. Über den Befehl „sumt“ in dem Programm MrBayes wurde der „50% Majority Rule“-Konsensusbaum aus den abgespeicherten Bäumen gebildet. Alle Bäume, die sich nicht im Gleichgewicht befanden, wurden vorab über die Befehlsoption „burnin“ verworfen.

In der Analyse mit 18S-rDNA wurde auch eine Analyse mit vier zufälligen Bäumen als Startbäume vorgenommen, um den Unterschied zu der Analyse mit dem besten Baum aus der ML-Analyse aufzuzeigen. Die Anzahl der Generationen wurde in dieser Analyse auf 20.000.000 verdoppelt. Nach der Beendigung der Ketten wurden die Likelihood-Werte jeder 500.ten Generation gegen die Generationen in Microsoft Excel in ein Diagramm eingetragen.

### 2.2.10.8 Darstellung der Bäume

Die graphische Darstellung der ermittelten Bäume erfolgte mit dem Programm TreeView. In der Analyse der 18S-rDNA wurden die Stammbäume mit dem Nematomorphen *Gordius aquaticus* gewurzelt. In den anderen Analysen wurde dafür der Arthropode *Limulus polyphemus* benutzt. Die Phylogramme bzw. Kladogramme, wenn es sich um einen Konsensusbaum handelte, wurden als Graphik-Dateien zur weiteren Bearbeitung in dem Bildbearbeitungs-Programm Adobe Illustrator gespeichert. Im Adobe Illustrator wurden die Bäume dann gestaltet und die Werte des Bootstrappings bzw. die „posterior probabilities“ der Knotenpunkte in die Abbildungen eingefügt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Amplifikation und Sequenzierung der einzelnen Gene

Von der 18S-rDNA wurde ein etwa 1800 bp langer Abschnitt des nukleären Genoms amplifiziert und sequenziert. Die Amplifikation der 18S-rDNA gelang nicht bei den Dorvilleiden *Ophryotrocha puerilis* und *Pusillotrocha akessoni*, ansonsten konnten von allen in Tabelle 1 aufgeführten Arten durch diverse Modifikationen der Standard-PCR Amplifikate gewonnen werden. Die Sequenzierung dieser Amplifikate war in allen Fällen erfolgreich. Dieses entspricht einer Erfolgsquote von 96%. Die Sequenz der 18S-rDNA von *Protodriloides symbioticus* ist mit der in GenBank bereits vorhandenen Sequenz (AF508125) identisch und ging deshalb nicht noch mal in die weiteren Untersuchungen ein.

Von der 28S-rDNA wurde ein etwa 2250 bp langer Abschnitt des nukleären Genoms amplifiziert und sequenziert. Insgesamt wurde versucht von 26 Arten die 28S-rDNA mit den verschiedenen Modifikationen der Standard-PCR zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren, dieses war nur bei 4 Arten, also bei 15%, erfolgreich (Tabelle 6). Eine Amplifikation von einzelnen Teilabschnitten der 28S-rDNA mit Hilfe der Hot Start-PCR mit Touchdown-Option (s. S. 21 ff.) gelang noch bei *Schistomeringos rudolphi*, *Arabella iricolor* und *Sabella crassicornis*. Allerdings konnte bei diesen Arten zum einen aus den Teilabschnitten nicht der komplette Abschnitt gebildet werden und zum anderen gelang nur mit Primern, die auch für die Amplifikation des jeweiligen Teilstückes benutzt worden waren, eine Sequenzierung, die eine einwandfreie und sichere Zuordnung der Basen ermöglichte. Mit internen Primern war sehr selten eine einwandfreie und sichere Zuordnung der Basen möglich. Somit war eine Absicherung der wenigen bestimmten Sequenzen durch den komplementären Strang bei diesen drei Arten nicht möglich. Bei den restlichen Arten war entweder kein Amplifikationsprodukt nachweisbar oder es gab multiple Amplifikate. Die Amplifikate, die nicht der in etwa erwarteten Länge entsprachen, konnte auch nicht ohne Verlust des erwarteten Amplifikates durch stringendere Bedingungen unterdrückt werden. Eine Extraktion des erwarteten Amplifikates aus dem Agarose-Gel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) und anschließender Sequenzierung führte zu nicht auswertbaren Ergebnissen.

Von der CO I wurde ein 488 bzw. 482 bp langer Abschnitt des mitochondrialen Genoms amplifiziert und sequenziert. Bei 13 von 27 Arten war sowohl die Amplifikation mit wenigstens einer der drei Modifikationen der Standard-PCR als auch die Sequenzierung dieses Abschnittes erfolgreich (Tabelle 6). Dieses entspricht einer Erfolgsquote von 48%. Bei den restlichen 14 Arten konnte entweder kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden oder die

Amplifikation führte zu multiplen Banden. Eine Suppression der multiplen Banden durch erhöhte Stringenz der Bedingungen führte wie bei der 28S-rDNA zu einem Verlust aller Amplifikationsprodukte. Ebenfalls keine auswertbaren Resultate brachten die Extraktion und anschließende Sequenzierung des erwarteten Amplifikates.

**Tabelle 6:** Ergebnis des Erfolges der Amplifikation und Sequenzierung der 28S-rDNA und CO I bei verschiedenen Polychaeten.  
n. v. = nicht versucht; + = erfolgreich; - = nicht erfolgreich

| Taxon          | Art                                | 28S-rDNA | CO I  |
|----------------|------------------------------------|----------|-------|
| Aeolosomatidae | <i>Rheomorpha neiswestonovae</i>   | -        | +     |
| Dinophilidae   | <i>Dinophilus gyrociliatus</i>     | -        | -     |
|                | <i>Trilobodrilus axi</i>           | -        | +     |
|                | <i>Trilobodrilus heideri</i>       | +        | +     |
| "Dorvilleidae" | <i>Dorvillea bermudensis</i>       | n. v.    | -     |
|                | <i>Dorvillea similis</i>           | -        | -     |
|                | <i>Ophryotrocha gracilis</i>       | -        | +     |
|                | <i>Ophryotrocha puerilis</i>       | -        | +     |
|                | <i>Parapodrilus psammophilus</i>   | -        | -     |
|                | <i>Parougia</i> sp.                | -        | -     |
|                | <i>Pettiboneia urciensis</i>       | -        | -     |
|                | <i>Protodorvillea kefersteinii</i> | +        | +     |
|                | <i>Schistomeringos rudolphi</i>    | -        | +     |
| Eunicidae      | <i>Eunice harassii</i>             | n. v.    | -     |
|                | <i>Eunice</i> sp.                  | +        | +     |
|                | <i>Eunice vittata</i>              | -        | -     |
|                | <i>Lysidice ninetta</i>            | -        | -     |
|                | <i>Marphysa bellii</i>             | -        | -     |
|                | <i>Marphysa sanguinea</i>          | -        | +     |
|                | <i>Nematonereis unicornis</i>      | -        | -     |
| Lumbrineridae  | <i>Lumbrineris funchalensis</i>    | -        | +     |
| Oeononidae     | <i>Arabella iricolor</i>           | -        | -     |
| Onuphidae      | <i>Aponuphis bilineata</i>         | -        | -     |
|                | <i>Hyalinoecia tubicola</i>        | +        | +     |
|                | <i>Onuphis similis</i>             | -        | n. v. |
| Potamodrilidae | <i>Potamodrilus fluviatilis</i>    | -        | +     |
| Sabellidae     | <i>Sabella crassicornis</i>        | -        | +     |
| Serpulidae     | <i>Spirorbis spirorbis</i>         | -        | -     |



### 3.2 Voruntersuchungen der einzelnen Variabilitätsbereiche

Das Alignment der 18S-rDNA umfasst nach der Korrektur 2438 Positionen. 902 Positionen können nicht eindeutig zugeordnet werden, so dass die Voraussetzung der Homologie nicht gegeben ist. Diese Positionen sind in den weiteren Analysen ausgeschlossen worden. Insgesamt sind 1536 Positionen (= 63,0%) in die Analysen eingegangen. Die Definition der Variabilitätsbereiche ergibt für die ersten drei Bereiche 0-20%, 20-40% und 40-60% einen etwa gleichen Anteil von 23,0-28,6% an den 1536 Positionen (Tabelle 7). Anschließend nimmt der Anteil mit steigender Variabilität ab.

Das Alignment der 28S-rDNA ist 3045 Positionen lang. 1311 Positionen erfüllen das Homologie-Kriterium nicht, da sie nicht eindeutig zugeordnet werden können. In die Analysen sind somit 1734 Positionen (= 56,9%) eingegangen. Etwa die Hälfte (46,1%) dieser 1734 Positionen zeichnet sich durch eine geringe Variabilität von 0-20% aus (Tabelle 7). Die nächsten drei Variabilitätsbereiche 20-30%, 30-50% und 50-70% umfassen etwa gleiche Anteile an Positionen von 14,2-19,7%. Der Bereich höchster Variabilität hat einen Anteil von 5,6%.

Per Definitionem sind bei der CO I alle Positionen gleich verteilt auf die drei Variabilitätsbereiche (Tabelle 7). Das Alignment der CO I umfasst 488 Positionen und entspricht somit der längsten Sequenz von *Potamodrilus fluviatilis*, alle anderen Sequenzen sind 6 Positionen kürzer. Von den weiteren Analysen sind die 59 Positionen der Primer ausgeschlossen worden. Insgesamt sind 429 Positionen in die Analysen eingegangen.

**Tabelle 7:** Variabilitätsbereiche sowie die Substitutionsraten und deren Verhältnis

| Variabilitätsbereich | Anzahl der Positionen |             | mittlere Mutationsrate [%] | Transitionsrate | Transversionsrate | Transition/Transversion-Ratenverhältnis |
|----------------------|-----------------------|-------------|----------------------------|-----------------|-------------------|---|
|                      | total                 | relativ [%] |                            |                 |                   |   |
| <b>18S-rDNA</b>      |                       |             |                            |                 |                   |   |
| 0 - 20%              | 354                   | 23,0        | 1,2                        | 0,00882         | 0,00364           | 2,42                                    |
| 20 - 40%             | 371                   | 24,2        | 5,0                        | 0,03378         | 0,01644           | 2,05                                    |
| 40 - 60%             | 439                   | 28,6        | 11,5                       | 0,07147         | 0,04393           | 1,63                                    |
| 60 - 80%             | 244                   | 15,9        | 17,8                       | 0,09602         | 0,08213           | 1,17                                    |
| 80 - 100%            | 128                   | 8,3         | 16,3                       | 0,07339         | 0,09007           | 0,81                                    |
| alle Bereiche        | 1536                  | 100         | 8,9                        | 0,05169         | 0,03768           | 1,37                                    |
| <b>28S-rDNA</b>      |                       |             |                            |                 |                   |   |
| 0 - 20%              | 800                   | 46,1        | 4,0                        | 0,02492         | 0,01474           | 1,69                                    |
| 20 - 30%             | 250                   | 14,4        | 12,9                       | 0,07951         | 0,04914           | 1,62                                    |
| 30 - 50%             | 341                   | 19,7        | 18,3                       | 0,10811         | 0,07497           | 1,44                                    |
| 50 - 70%             | 246                   | 14,2        | 27,0                       | 0,13744         | 0,13265           | 1,04                                    |
| 70 - 100%            | 97                    | 5,6         | 38,5                       | 0,16952         | 0,21521           | 0,79                                    |
| alle Bereiche        | 1734                  | 100         | 13,1                       | 0,07273         | 0,05856           | 1,24                                    |
| <b>CO I</b>          |                       |             |                            |                 |                   |   |
| 1. Position          | 143                   | 33,3        | 21,2                       | 0,1091          | 0,1031            | 1,06                                    |
| 2. Position          | 143                   | 33,3        | 10,0                       | 0,0393          | 0,0611            | 0,64                                    |
| 3. Position          | 143                   | 33,3        | 54,8                       | 0,2522          | 0,2959            | 0,85                                    |
| alle Bereiche        | 429                   | 100         | 28,7                       | 0,1335          | 0,1534            | 0,87                                    |

### 3.2.1 Substitutionsraten und deren Verhältnisse

Die allgemeine mittlere Mutationsrate der 18S-rDNA beträgt 8,9%. Die mittleren Mutationsraten der einzelnen Variabilitätsbereiche steigen deutlich mit steigender Variabilität von 1,2% auf 17,8% bzw. 16,3% an (Tabelle 7). Erst in den beiden Variabilitätsbereichen 60-80% und 80-100% ist kein starker Unterschied der Raten mehr zu bestimmen. Die Mutationsraten der stark bzw. niedrig variablen Positionen unterscheiden sich deutlich von der allgemeinen Mutationsrate. Die Mutationsrate der niedrig variablen Positionen, etwa ein Viertel aller Positionen, ist nur ca. ein Siebtel der allgemeinen Rate. Die Mutationsraten des hoch variablen Viertels von 60% bis 100% hingegen sind etwa doppelt so hoch wie die allgemeine Rate.

Die allgemeine mittlere Mutationsrate der 28S-rDNA beträgt 13,1%. Auch bei der 28S-rDNA steigen die Mutationsraten der Variabilitätsbereiche mit steigender Variabilität von 4,0% auf 38,5% deutlich an (Tabelle 7). Die Mutationsraten des Fünftels mit einer Variabilität von 50-100% sind somit das Doppelte bis Dreifache der allgemeinen Rate. Umgekehrt ist die Mutationsrate der niedrig variablen Hälfte von 0-20% nur etwa ein Drittel.

Die allgemeine mittlere Mutationsrate der CO I beträgt 28,7%. Die zweite Position im Codontriplett hat mit 10,0% die niedrigste Mutationsrate. Durch die höchste Rate mit 54,9% zeichnet sich die dritte Position aus. Die erste Position besitzt eine mittlere Rate von 21,2% (Tabelle 7). Dieses Muster der Mutationsraten ist üblich für protein-codierende Gene und ist zurückzuführen auf die Art der Degeneration des genetischen Codes (Simon *et al.* 1994). Auch bei der CO I sind die Unterschiede zwischen der niedrigsten (etwa ein Drittel) bzw. höchsten Rate (etwa das Doppelte) zur allgemeinen Mutationsrate deutlich.

In allen drei Genen können deutliche Unterschiede der mittleren Mutationsraten von großen Anteilen der Positionen (jeweils mindestens etwa 50%) zur jeweils allgemeinen Mutationsrate bestimmt werden. Diese Unterschiede zeigen sich auch bei den Transitions- und Transversionsraten. Bei der 18S-rDNA zeigen sich Unterschiede von einem Zehntel bis zum etwa Doppelten im Vergleich zu den Raten über alle Bereiche. Bei der 28S-rDNA gibt es Unterschiede von einem Viertel bis zum Vierfachen und bei der CO I von einem Drittel bis zum Doppelten (Tabelle 7 & Abb. 1). Durch die Bildung des Verhältnisses der Raten der Transition und Transversion wird dieser Unterschied abgedämpft. Der Unterschied beträgt bei der 18S-rDNA 2,42 bzw. 0,81 zu 1,37, bei der 28S-rDNA 1,69 bzw. 0,79 zu 1,24 und bei der CO I 0,64 bzw. 1,06 zu 0,87 (Tabelle 7 & Abb. 2).

Bei der 18S-rDNA steigt die Transitionsrate bis zu einem Optimum bei einer Variabilität von 60-80%, anschließend fällt sie wieder auf eine ähnliche Rate wie bei einer Variabilität von 40-60%. Die Transversionsrate ist niedriger als die Transitionsrate, außer bei einer Variabilität von 80-100%. Der Anstieg ist stetig mit steigender Variabilität und steiler als bei der

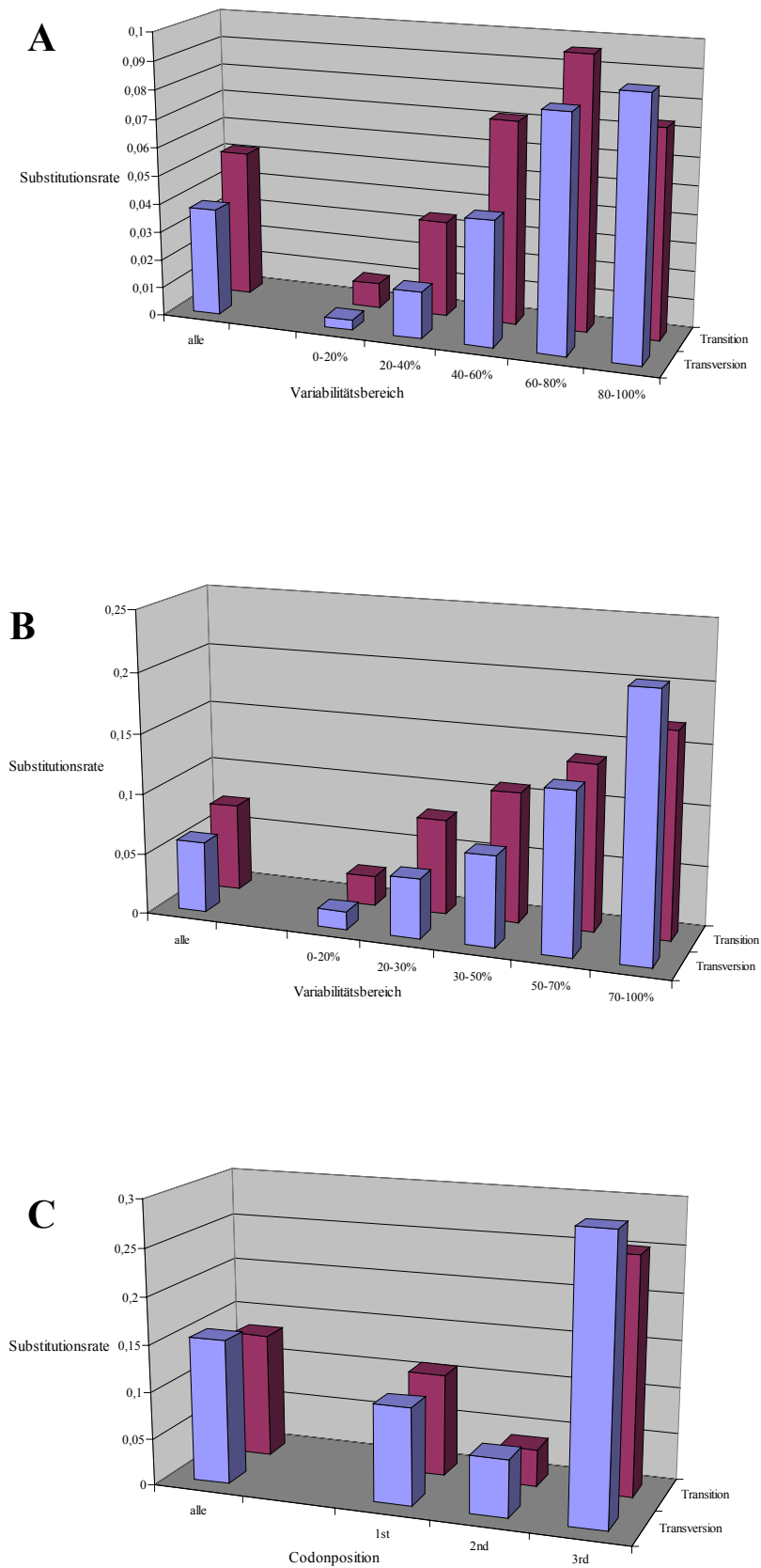
Transitionsrate (Abb. 1A). Dieses zeigt sich auch darin, dass das Verhältnis der beiden Raten stetig abnimmt (Abb. 2A). Somit ist bei einer Variabilität von 80-100% eine Transversion wahrscheinlicher als ein Transition. Im Gegensatz dazu ist bei einer Variabilität von 0-20% eine Transition wesentlich wahrscheinlicher (um das 2,5fache) als eine Transversion.

Bei der 28S-rDNA steigen beide Raten stetig mit erhöhter Variabilität. Bei der Transitionsrate ist der höchste Anstieg von einer Variabilität von 0-20% auf 20-30% zu beobachten. Anschließend ist der Anstieg relativ flach. Der Anstieg der Transversionsrate ist über die gesamten Variabilitätsbereiche deutlich steiler, so dass bei einer Variabilität von 50-70% die beiden Raten etwa gleich groß sind und bei einer höheren Variabilität die Transversionsrate größer ist (Abb. 1B). Dieses zeigt sich in dem Verhältnis der beiden Raten, welches erst kaum und dann stetig abnimmt (Abb. 2B). Damit gilt auch für die 28S-rDNA, dass bei hoher Variabilität Transversionen und bei niedriger Variabilität Transitionen wahrscheinlicher sind.

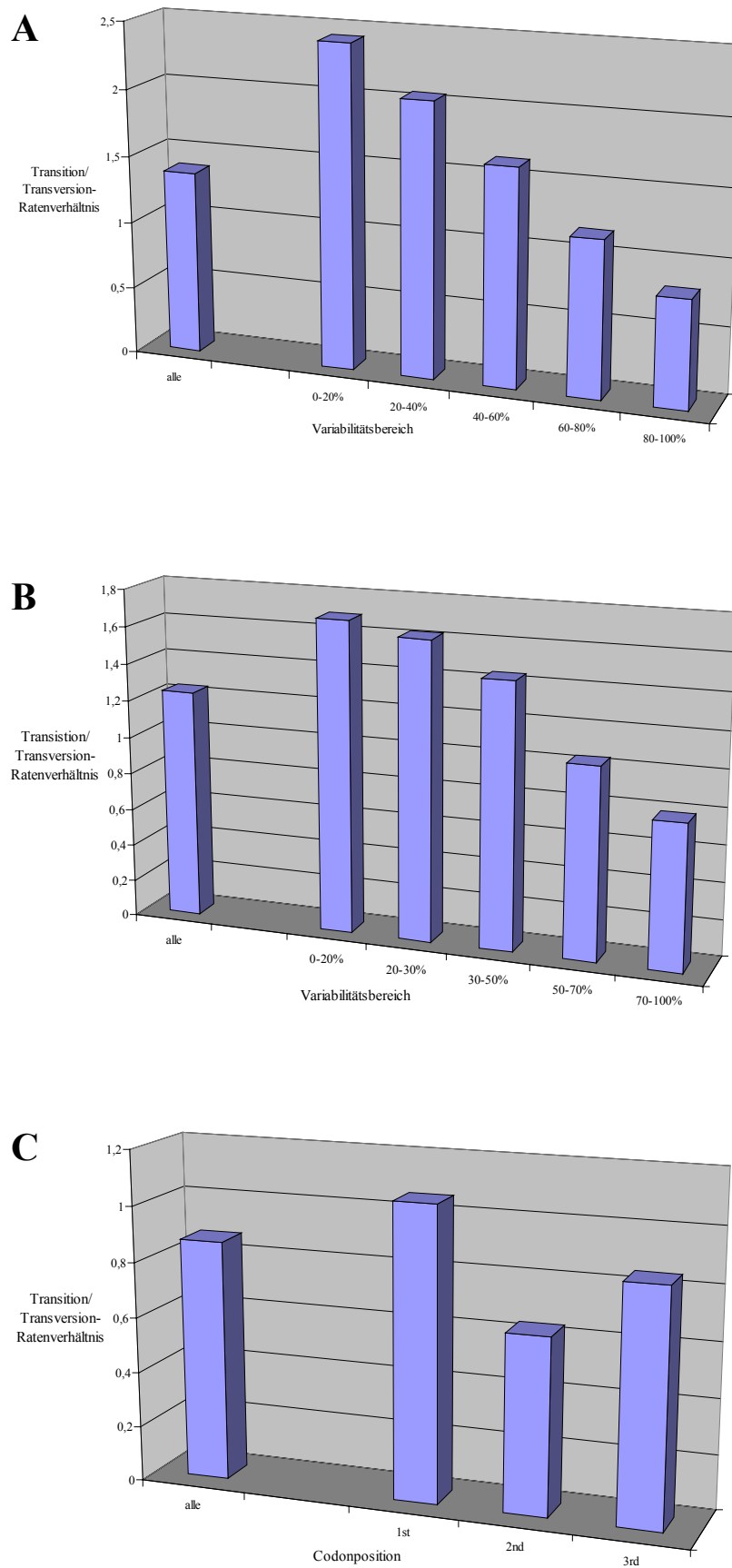
Bei der CO I sind die Raten der zweiten Positionen am niedrigsten und die der dritten am höchsten. Die Transversionen haben auf allen Positionen eine höhere oder etwa gleiche Rate wie die Transitionen (Abb. 1C). Dieses zeigt sich auch im Verhältnis der beiden Raten. Es ist kleiner oder gleich 1 (Abb. 2C). Die Transversionen sind somit in allen Bereichen wenigstens genauso wahrscheinlich wie die Transitionen. Ferner sind im Bereich der niedrigsten Variabilität, der zweiten Position, Transversionen wahrscheinlicher als Transitionen. Dieses steht im Gegensatz zu der 18S- und 28S-rDNA.

Um die Veränderungen der Transitionen und Transversionen detaillierter darstellen zu können, sind die Raten der einzelnen Substitutionen in Abbildung 3 wiedergegeben. Zur besseren Darstellung der Unterschiede der Raten sind die Raten auf die jeweils niedrigste Rate normiert.

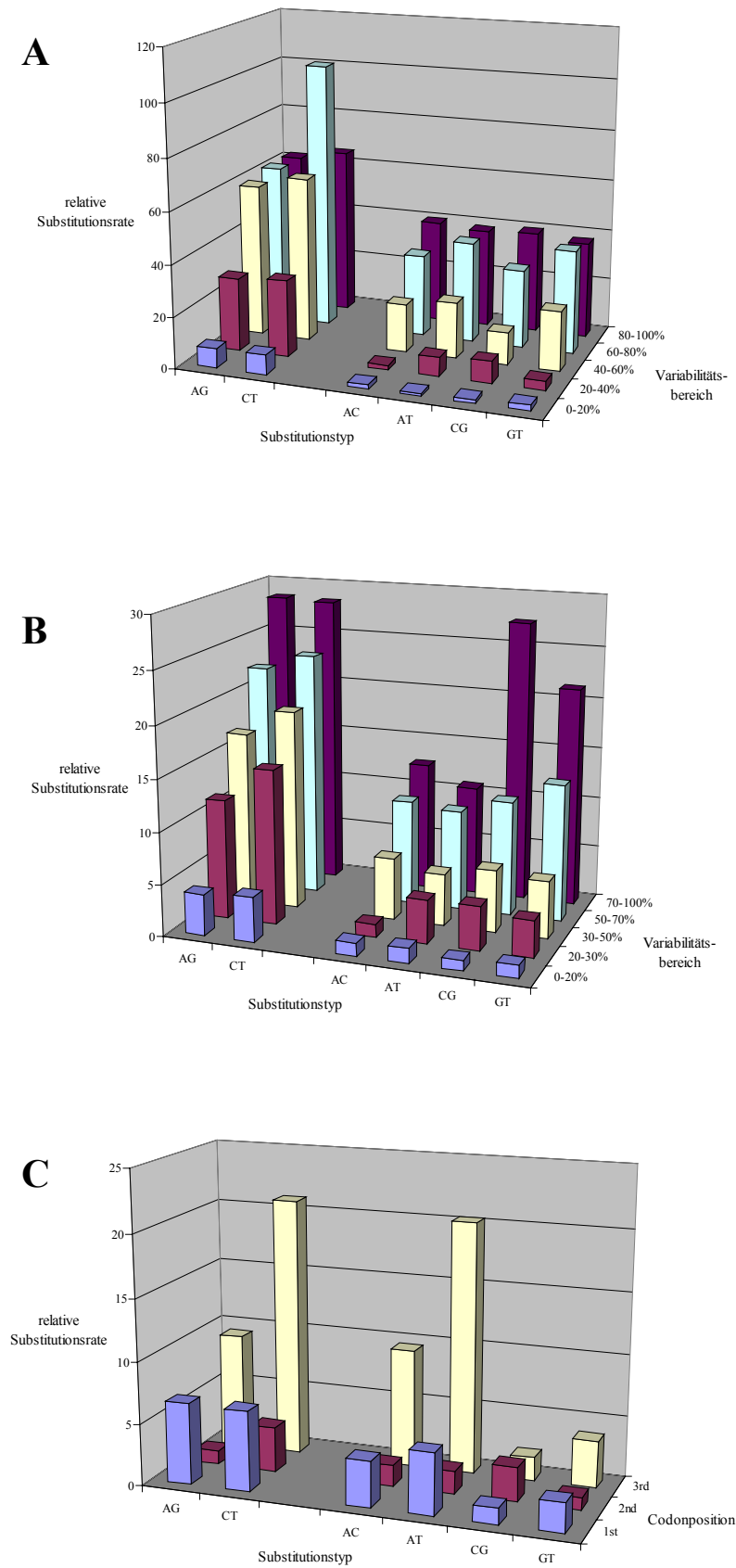
Bei der 18S-rDNA ist eine Substitution von  $C \leftrightarrow T$  bei einer Variabilität von 60-80% (die höchste Rate) etwa 100mal wahrscheinlicher als die niedrigste Rate, die Substitution von  $A \leftrightarrow T$  bei einer Variabilität von 0-20% (Abb. 3A). Im Allgemeinen sind die Unterschiede innerhalb der Transitionen  $A \leftrightarrow G$  und  $C \leftrightarrow T$  bzw. innerhalb der Transversionen  $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $C \leftrightarrow G$  und  $G \leftrightarrow T$  eines Bereiches nicht sehr stark. Die Transitionen steigen bis zu einer Variabilität von 40% stetig an, bei einer höheren Variabilität sind die Raten annähernd konstant. Eine Ausnahme ist die Substitution  $C \leftrightarrow T$  bei einer Variabilität von 60-80%, deren Rate fast doppelt so hoch ist. Auf diese erhöhte einzelne Rate ist auch das Optimum der Transitionen bei dieser Variabilität zurückzuführen (Abb. 1A). Die Transversionen steigen relativ stetig mit der steigenden Variabilität. Ab einer Variabilität von 60% nimmt die Steigung aber deutlich ab.



**Abb. 1:** Transitions- und Transversionsraten der einzelnen Variabilitätsbereiche der untersuchten Gene. **A:** 18S-rDNA; **B:** 28S-rDNA; **C:** CO I.



**Abb. 2:** Transition/Tranversion - Ratenverhältnis der einzelnen Variabilitätsbereiche der untersuchten Gene. **A:** 18S-rDNA; **B:** 28S-rDNA; **C:** CO I.



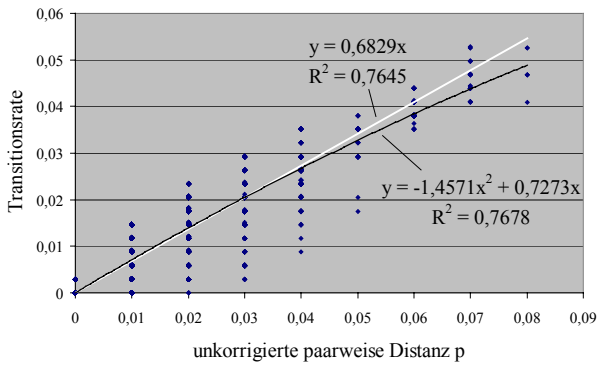
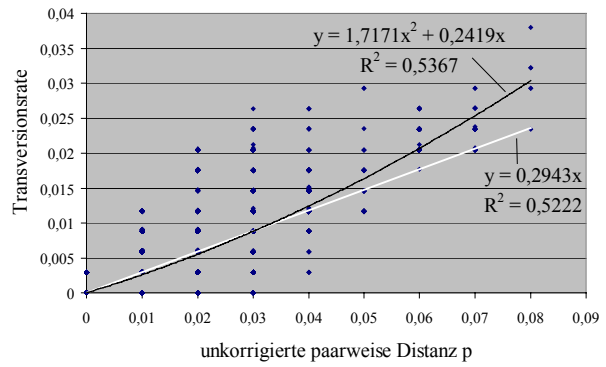
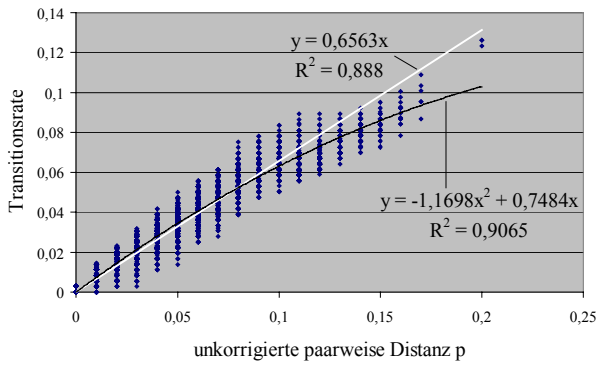
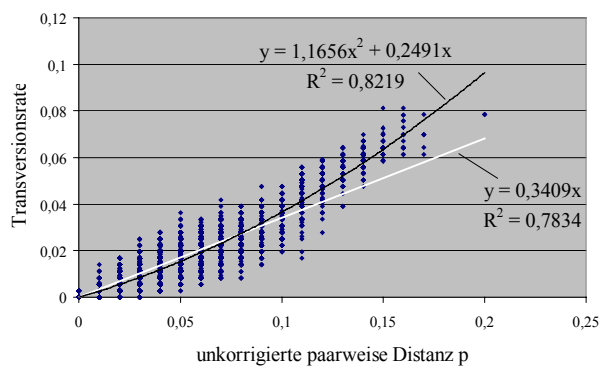
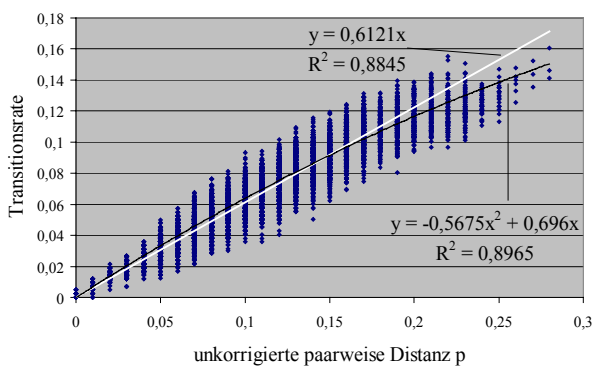
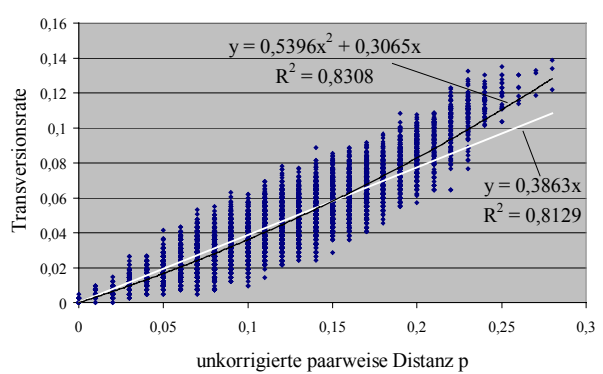
**Abb. 3:** Die relativen Substitutionsraten der einzelnen Substitutionstypen, genormt auf die jeweils niedrigste Substitutionsrate der einzelnen Variabilitätsbereiche der untersuchten Gene.  
**A:** 18S-rDNA; **B:** 28S-rDNA; **C:** CO I.

Die höchsten Raten der 28S-rDNA, die Substitutionen A↔G, C↔T und C↔G bei einer Variabilität von 70-100%, sind etwa 25 bis 30mal wahrscheinlicher als die Substitution C↔G bei einer Variabilität von 0-20% mit der niedrigsten Rate (Abb. 3B). Die Raten der Transitionen steigen stetig an und zwischen den einzelnen Raten eines Bereiches gibt es nur geringe Unterschiede. Auch die Raten der Transversionen steigen stetig an und zeigen bis zu einer Variabilität von 70% auch nur geringe Unterschiede innerhalb der Bereiche. Im Variabilitätsbereich von 70-100% ist allerdings ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Während die Transversionen mit A im Vergleich zu den vorherigen Raten nur geringfügig steigen, steigen die Raten der Transversionen mit G sehr stark an, so dass sie etwa so hoch wie die Raten der einzelnen Transitionen und doppelt so hoch wie die Raten der anderen Transversionen in diesem Bereich sind.

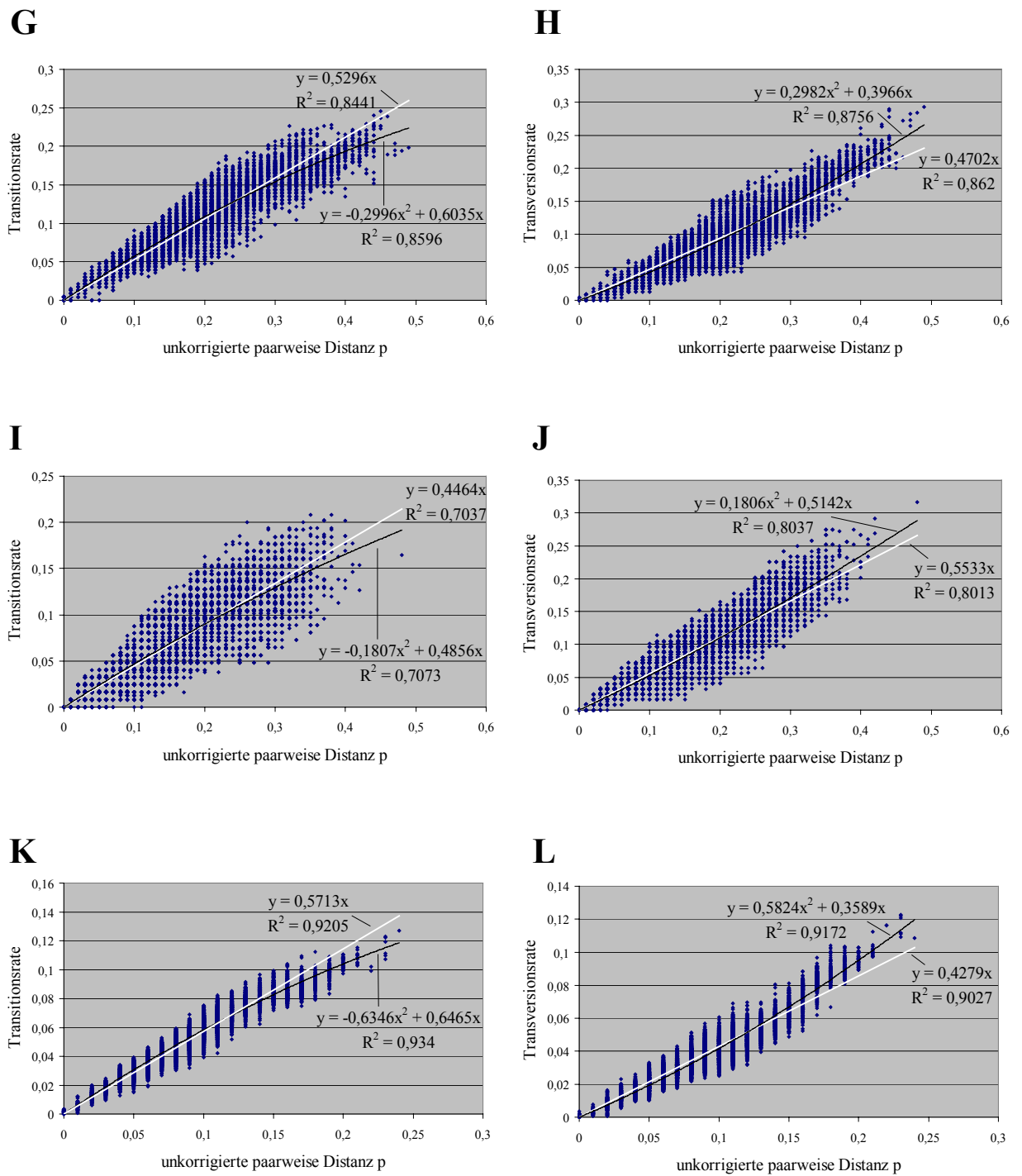
Bei der CO I sind die Raten der Substitutionen C↔T und A↔T an der dritten Position etwa 20mal wahrscheinlicher als die Substitution A↔G an der zweiten Position (Abb. 3C). Sowohl die einzelnen Transitionen als auch Transversionen haben die niedrigsten Raten an der zweiten Position und die höchsten an der dritten. Eine Ausnahme ist die Substitution C↔G, die die höchste Rate an der zweiten Position und die niedrigste an der ersten hat. Die Transition C↔T ist an der zweiten und dritten Position deutlich höher als die Transition A↔G, an der ersten Position besitzen sie annähernd gleiche Werte. Die Raten der Transversionen mit A sind an der dritten Position etwa 2,5 bis 10mal so hoch wie die Raten der Transversionen mit G, wobei die Substitutionsrate von A↔T doppelt so ist wie die von A↔C und die von G↔T doppelt so hoch wie die von C↔G. Diese Unterschiede sind auch im geringeren Maße an der ersten Position nachweisbar.

### 3.2.2 Sättigung

Die Sättigung einer Substitutionsart wurde erfasst, in dem die Rate gegen die unkorrigierte paarweise Distanz  $p$  aufgetragen wurde (Abb. 4-6). Bei der 18S-rDNA kann in keinem der Bereiche sowie in allen Bereichen zusammen eine Sättigung der Transversionsrate festgestellt werden (Abb. 4B, D, F, H, J, L). Bei der Transitionsrate ist eine leichte Sättigung bei einer Variabilität von 20 bis 80% sowie in allen Bereichen zusammen nachweisbar (Abb. 4C, E, G, K). Allerdings unterscheidet sich das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von der linearen und der polynomischen Regression nur gering ( $< 0,02$ ). Die Werte des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  beider Regressionen ( $> 0,7$ ) sind gut und zeigen an, dass beide Regressionen den Datensatz gut wieder gegeben.

**A****B****C****D****E****F**



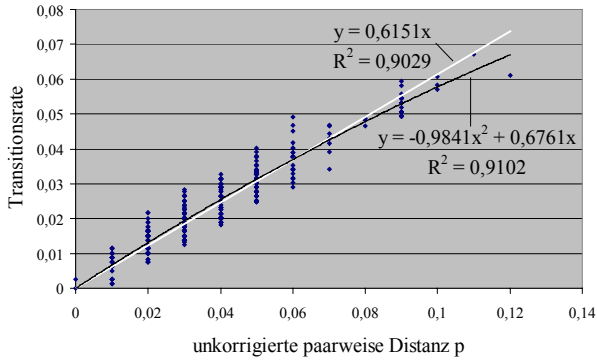
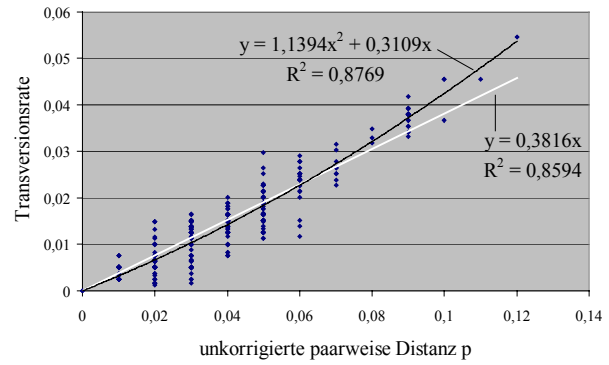
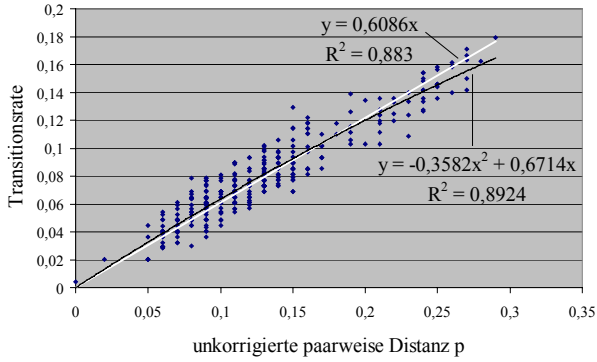
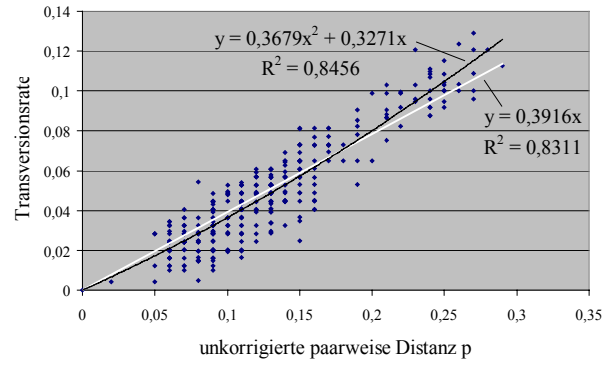
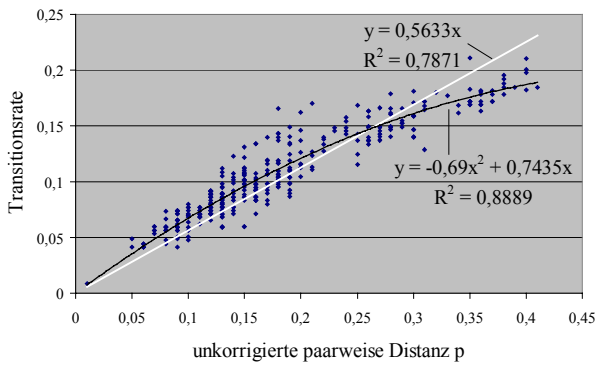
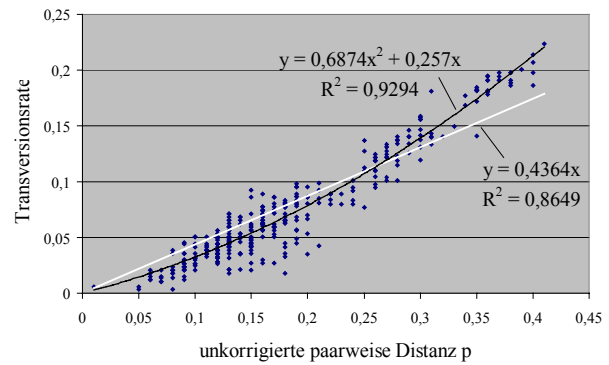


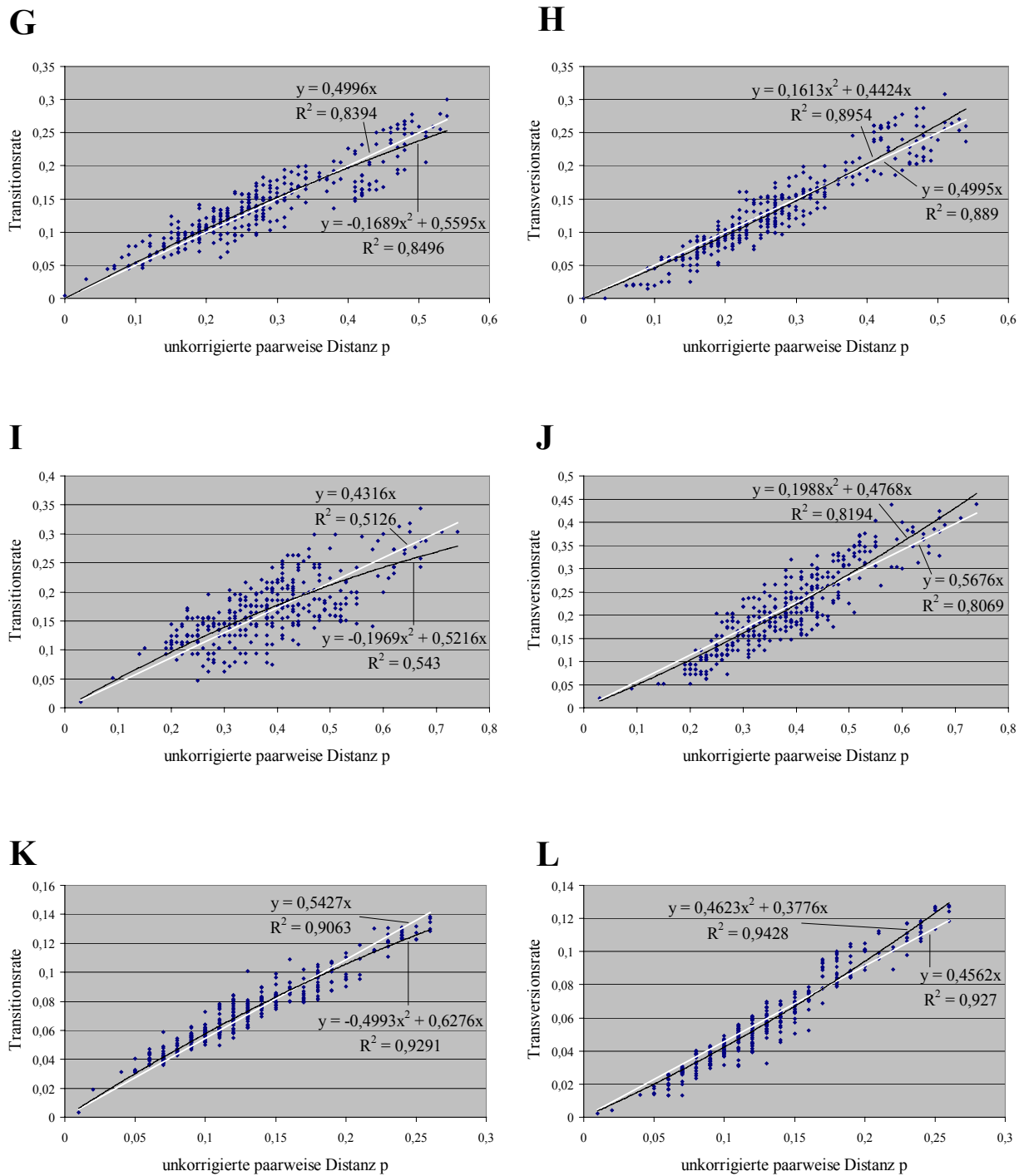
**Abb. 4:** Sättigungsdarstellung der Transitionen und Transversionen gegen die unkorrigierten paarweisen Distanzen der 18S-rDNA. Die lineare Regression ist weiß wiedergegeben, die polynomische Regression 2. Grades schwarz. Sowohl die Funktion als auch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  sind jeweils angegeben.

**A, B:** Variabilitätsbereich 0 - 20%; **C, D:** Variabilitätsbereich 20 - 40%;

**E, F:** Variabilitätsbereich 40 - 60%; **G, H:** Variabilitätsbereich 60 - 80%;

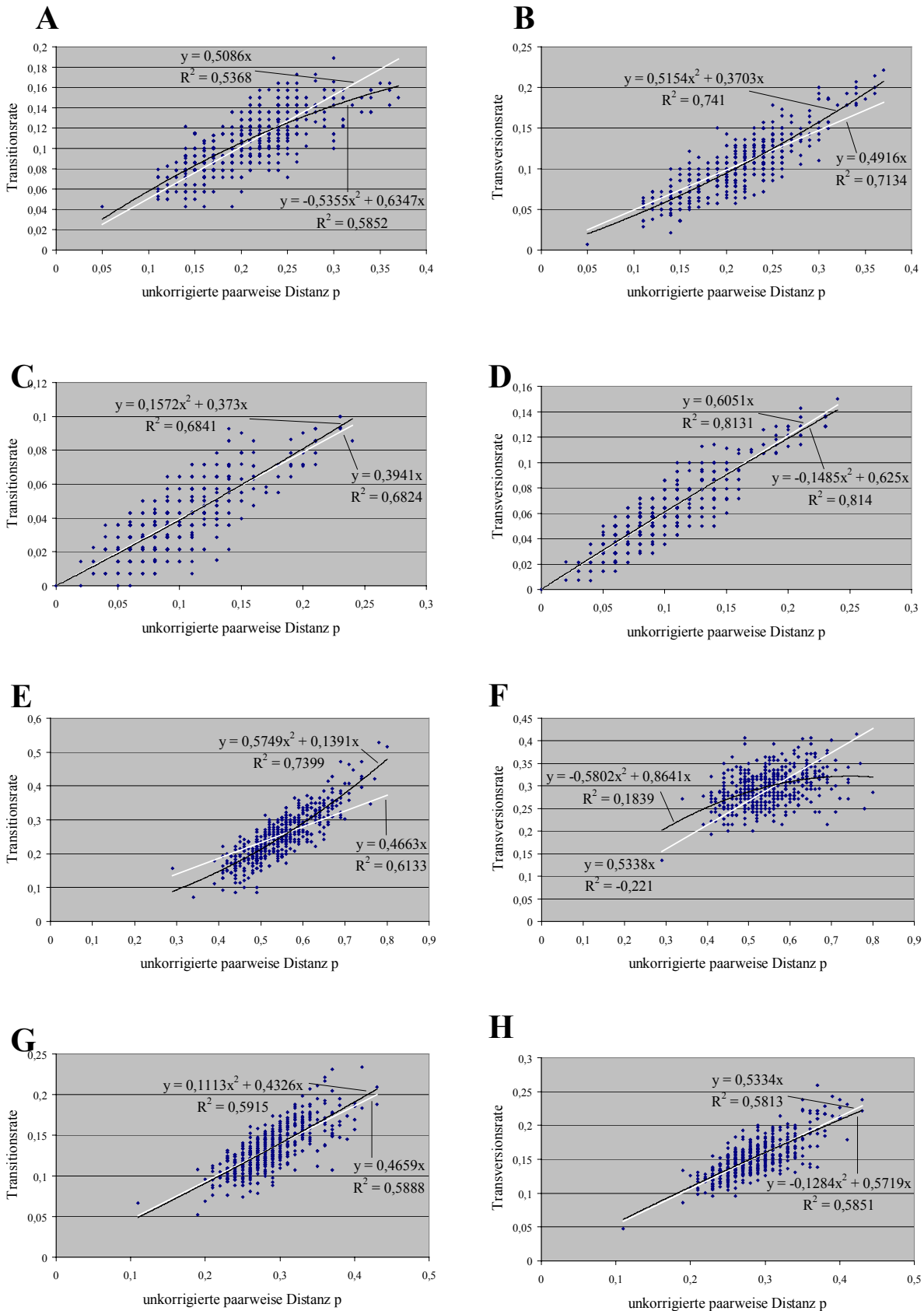
**I, J:** Variabilitätsbereich 80 - 100%; **K, L:** alle Variabilitätsbereiche.

**A****B****C****D****E****F**



**Abb. 5:** Sättigungsdarstellung der Transitionen und Transversionen gegen die unkorrigierten paarweisen Distanzen der 28S-rDNA. Die lineare Regression ist weiß wiedergegeben, die polynomische Regression 2. Grades schwarz. Sowohl die Funktion als auch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  sind jeweils angegeben.

**A, B:** Variabilitätsbereich 0 - 20%; **C, D:** Variabilitätsbereich 20 - 30%;  
**E, F:** Variabilitätsbereich 30 - 50%; **G, H:** Variabilitätsbereich 50 - 70%;  
**I, J:** Variabilitätsbereich 70 - 100%; **K, L:** alle Variabilitätsbereiche.



**Abb. 6:** Sättigungsdarstellung der Transitionen und Transversionen gegen die unkorrigierten paarweisen Distanzen von CO I. Die lineare Regression ist weiß wiedergegeben, die polynomische Regression 2. Grades schwarz. Sowohl die Funktion als auch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  sind jeweils angegeben.

**A, B:** erste Position; **C, D:** zweite Position; **E, F:** dritte Position; **G, H:** alle Positionen.

Genauso wie bei der 18S-rDNA kann bei der 28S-rDNA keine Sättigung der Transversionsrate in einem der Bereich sowie in allen Bereichen zusammen gezeigt werden (Abb. 5B, D, F, H, J, L). Eine leichte Sättigung der Transitionsrate kann in allen Bereichen zusammen und ab einer Variabilität von 70% nachgewiesen werden. Der Unterschied des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  beträgt allerdings weniger als 0,03 (Abb. 5I, K). In dem Bereich von 30-50% Variabilität ist hingegen eine etwas stärkere Sättigung der Transitionsrate, mit einem Unterschied des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  von etwa 0,1, feststellbar (Abb. 5E). In allen anderen Bereichen kann keine Sättigung der Transitionsrate bestimmt werden (Abb. 5 A, C, G). Die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  sind mit Werten über 0,5, meistens sogar über 0,75, für beide Regressionen gut.

Bei der CO I kann zum einen bei der Transitionsrate der ersten Position eine leichte Sättigung mit einem geringen Unterschied der Bestimmtheitsmaße  $R^2$  von kleiner als 0,05 festgestellt werden (Abb. 6A). Zum anderen ist bei der Transversionsrate der dritten Position eine sehr starke Sättigung nachweisbar. Der Unterschied der Bestimmtheitsmaße  $R^2$  beträgt über 0,4 (Abb. 6F). In allen anderen Bereichen sowie in allen Bereichen zusammen ist eine Sättigung sowohl der Transitions- als auch der Transversionsraten nicht gegeben (Abb 6B-E, G, H). Die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  sind mit Werten über 0,5 für beide Regressionen gut. Nur die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  der beiden Regressionen für die Transversionsraten der dritten Positionen sind mit etwa 0,2 bzw. -0,2 schlecht und zeigen an, dass keine der Regressionen die Daten gut wiedergibt.

### 3.2.3 Basenfrequenzen und deren Homogenität über die Taxa

Die Ergebnisse der Untersuchung der Basenfrequenzen für die einzelnen Variabilitätsbereiche und aller Bereiche zusammen sowie deren Homogenität über alle OTUs sind in Tabelle 8 wiedergegeben. Der GC-Gehalt der 18S-rDNA ist über die einzelnen Variabilitätsbereiche etwa 50%, nur beim Variabilitätsbereich von 80-100% ist er mit 57% leicht erhöht. Nichtsdestotrotz sind die einzelnen Basenfrequenzen zwischen den einzelnen Bereichen unterschiedlich. So variiert A mit Frequenzen von 0,1873 bis 0,3112 am stärksten. C bleibt mit Frequenzen von 0,1957 bis 0,2439 hingegen relativ konstant. Die Homogenität der Basenfrequenzen ist über alle OTUs in jedem Bereich und für alle Bereiche zusammen sehr gut gegeben ( $P = 1,0$ ).

Der GC-Gehalt bei der 28S-rDNA nimmt mit steigender Variabilität von 47% auf 63% zu. Genauso wie bei der 18S-rDNA variieren die einzelnen Basenfrequenzen zwischen den einzelnen Bereichen unterschiedlich stark. Die Variation ist bei A mit Frequenzen von 0,1789 bis 0,3000 am stärksten und bei T mit Frequenzen von 0,1634 bis 0,2292 am schwächsten ausgeprägt. Die Homogenität der Basenfrequenzen über alle OTUs ist für alle Bereiche

zusammen überhaupt nicht gegeben ( $P < 0,0001$ ). Bei einer Variabilität von 0-30% ist die Homogenität hingegen sehr gut gegeben ( $P = 1,0$ ). In den Bereichen 30-50% und 70-100% ist die Homogenität gegeben ( $P \approx 0,4$ ). Im Variabilitätsbereich von 50-70% ist die Homogenität mit  $P = 0,02$  und somit  $P < 0,05$  nicht gegeben.

Bei der CO I ist der GC-Gehalt für die einzelnen Positionen sehr unterschiedlich. Die erste Position hat einen GC-Gehalt von 46% und die zweite einen von 40%. Die dritte Position weicht mit einem GC-Gehalt von 26% davon sehr stark ab. Auch zwischen den einzelnen Positionen variieren die einzelnen Basenfrequenzen wesentlich stärker als bei der 18S- und der 28S-rDNA. Die stärkste Variation tritt bei G auf, wo die Frequenzen die Spanne von 0,0722 bis 0,2948 umfassen. Bei C ist die Variation mit Frequenzen von 0,1643 bis 0,2401 am schwächsten. Die Homogenität der Basenfrequenzen über alle OTUS für alle Bereiche zusammen sowie für die dritte Position ist mit  $P < 0,0001$  überhaupt nicht gegeben. Bei der ersten und zweiten Position ist die Homogenität mit  $P = 0,8$  bzw. 1,0 sehr gut gegeben.

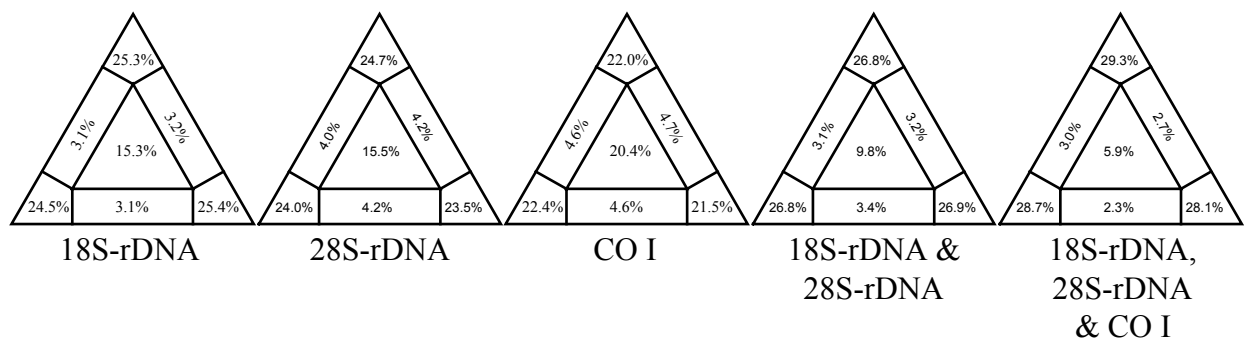
**Tabelle 8:** Basenfrequenzen und deren Homogenität über alle OTUs

| Variabilitätsbereich | Basenfrequenzen von |        |        |        | GC-Gehalt | Homogenitätstest |               |                      |
|----------------------|---------------------|--------|--------|--------|-----------|------------------|---------------|----------------------|
|                      | A                   | C      | G      | T      |           | $X^2$            | Freiheitsgrad | Wahrscheinlichkeit P |
| <b>18S-rDNA</b>      |                     |        |        |        |           |                  |               |                      |
| 0 - 20%              | 0,2543              | 0,1957 | 0,3037 | 0,2463 | 0,4994    | 9,192            | 516           | 1,00                 |
| 20 - 40%             | 0,3112              | 0,2149 | 0,2519 | 0,2220 | 0,4668    | 52,318           | 516           | 1,00                 |
| 40 - 60%             | 0,2638              | 0,2203 | 0,2700 | 0,2459 | 0,4903    | 143,830          | 516           | 1,00                 |
| 60 - 80%             | 0,2043              | 0,2439 | 0,2697 | 0,2822 | 0,5135    | 163,800          | 516           | 1,00                 |
| 80 - 100%            | 0,1873              | 0,2101 | 0,3636 | 0,2391 | 0,5737    | 1,63,588         | 516           | 1,00                 |
| alle Bereiche        | 0,2574              | 0,2161 | 0,2813 | 0,2453 | 0,4974    | 183,527          | 516           | 1,00                 |
| <b>28S-rDNA</b>      |                     |        |        |        |           |                  |               |                      |
| 0 - 20%              | 0,3000              | 0,1923 | 0,2786 | 0,2292 | 0,4709    | 7,661            | 78            | 1,00                 |
| 20 - 30%             | 0,2617              | 0,2481 | 0,3179 | 0,1724 | 0,5660    | 28,532           | 78            | 1,00                 |
| 30 - 50%             | 0,2197              | 0,2623 | 0,3367 | 0,1813 | 0,5990    | 81,444           | 78            | 0,37                 |
| 50 - 70%             | 0,1789              | 0,2592 | 0,3727 | 0,189  | 0,6318    | 104,931          | 78            | 0,02                 |
| 70 - 100%            | 0,2046              | 0,2442 | 0,3878 | 0,1634 | 0,6320    | 80,845           | 78            | 0,39                 |
| alle Bereiche        | 0,2563              | 0,2264 | 0,3150 | 0,2023 | 0,5415    | 125,370          | 78            | < 0,0001             |
| <b>CO I</b>          |                     |        |        |        |           |                  |               |                      |
| 1. Position          | 0,2763              | 0,1643 | 0,2948 | 0,2646 | 0,4591    | 81,283           | 93            | 0,80                 |
| 2. Position          | 0,1750              | 0,2401 | 0,1580 | 0,4269 | 0,3981    | 16,399           | 93            | 1,00                 |
| 3. Position          | 0,3714              | 0,1859 | 0,0722 | 0,3706 | 0,2581    | 949,740          | 93            | < 0,0001             |
| alle Bereiche        | 0,2742              | 0,1968 | 0,1750 | 0,3540 | 0,3718    | 413,966          | 93            | < 0,0001             |

### 3.2.4 Likelihood Mapping

Das phylogenetische Signal der in die phylogenetischen Analysen eingegangen Datensätze wurde angenähert bestimmt über die in Puzzle implementierte Likelihood Mapping-Analyse (Strimmer & von Haeseler 1997). Der Datensatz der 18S-rDNA unterstützt mit 75,2% eine völlig aufgelöste dichotome, mit 9,4% eine polytome und mit 15,3% eine sternförmige Baumstruktur (Abb. 7). Eine völlig aufgelöste Struktur wird mit 72,2% durch den Datensatz der 28S-rDNA unterstützt. Auf die polytome Struktur entfallen 12,4% und auf die sternförmige 15,5%. Das phylogenetische Signal besitzt somit in beiden Datensätzen einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an nicht eindeutigen Lösungen. Es sind somit für beide Datensätze in den ermittelten Stammbäumen Regionen mit geringer Unterstützung zu erwarten. Bei dem Datensatz der CO I (ohne dritte Positionen) wird dieser Anteil noch größer, da 13,9% eine polytome und 20,4% eine sternförmige Struktur unterstützen. Das phylogenetische Signal für eine dichotome Struktur beträgt nur 65,9%.

Der Anteil an nicht eindeutigen Lösungen im Datensatz kann durch die kombinierten Analysen reduziert werden. In der kombinierten Analyse von 18S- und 28S-rDNA beträgt die Unterstützung für dichotome Strukturen 80,5%. Polytome Strukturen werden mit 9,7% und sternförmige nur noch mit 9,8% unterstützt. Die Kombination aller drei Gene (bei der CO I ohne die dritten Positionen) führt mit 86,1% zu einer weiteren Verbesserung des phylogenetischen Signals. Polytome und sternförmige Strukturen werden nur noch mit 8% bzw. 5,9% unterstützt. Trotz allem bleibt auch in den kombinierten Analysen ein Anteil nicht eindeutiger Lösungen erhalten.



**Abb. 7:** Baryzentrische Dreiecke der Likelihood Mapping-Analyse des phylogenetischen Signals im Datensatz. Prozentuale Anteile, die eine völlig aufgelöste dichotome Baumstruktur (die drei Eckbereiche des Dreiecks), eine netzartige polytome Baumstruktur (die drei Seitenbereiche) bzw. die eine völlig unaufgelöste sternförmige Baumstruktur (der mittlere Bereich) unterstützen, sind angegeben. Die Berechnungen basierten auf dem Modell von Tamura & Nei (1993) mit einer  $\Gamma$ -Verteilung (4 Kategorien). Die notwendigen Parameter wurden aus dem Datensatz bestimmt.

### **3.3 Phylogenetische Analysen**

Die dritten Positionen der CO I zeichnen sich durch eine extrem hohe allgemeine Mutationsrate von 54,8% sowie sehr starken Unterschieden innerhalb der Transversionsraten, bis zum 10fachen, aus. Die dritten Positionen sind der einzige Variabilitätsbereich in dem eine starke Sättigung festgestellt wurde und die Homogenität der Basenfrequenzen über alle OTUs ist überhaupt nicht gegeben. Da diese Aspekte vor allem in der Parsimonie-Analyse nicht in adäquater Weise berücksichtigt werden können, wurden die dritten Positionen der CO I in allen phylogenetischen Analysen ausgeschlossen.

Die Homogenität der Basenfrequenzen über alle OTUs ist ebenfalls bei der 28S-rDNA im Variabilitätsbereich von 50-70% nicht gegeben. Da der Bereich sich aber ansonsten nicht stark von den anderen Bereichen der 28S-rDNA unterscheidet, wurde von einem Ausschluss dieses Bereiches in der phylogenetischen Analyse abgesehen.

Aufgrund der deutlichen Unterschiede der einzelnen Variabilitätsbereiche eines jeden Genes sowohl in den Substitutionsraten und deren Verhältnissen als auch in der Sättigung wurde eine ungewichtete, über alle Positionen gleichgewichtete Parsimonie-Analyse abgelehnt. Es wurde eine generalisierte Parsimonie-Analyse mit Gewichtungen basierend auf den Transitions- und Transversionsraten durchgeführt.

Diese Unterschiede wurden auch in den Analysen, die auf einem ML-Algorithmus beruhen, durch die Wahl des Substitutionsmodells berücksichtigt.

#### **3.3.1 18S-rDNA**

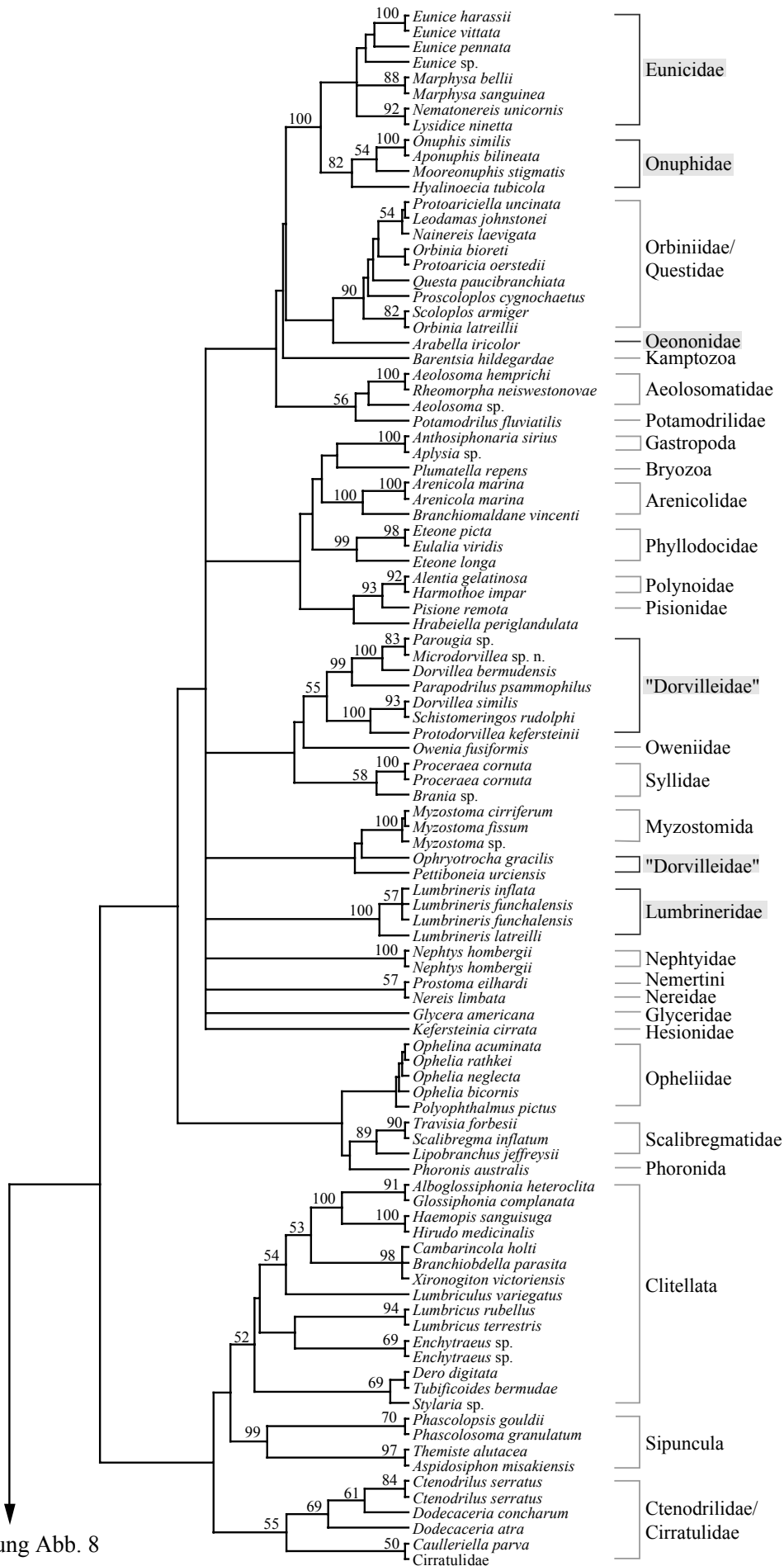
##### *3.3.1.1 Generalisierte Parsimonie*

Von den 1536 Positionen, die in die Analyse eingegangen sind, sind 537 Positionen (35,0%) konstant, 270 variable Positionen (17,6%) in der Parsimonie-Analyse nicht informativ und 729 Positionen (47,4%) informativ. Die 714 sparsamsten Bäume haben jeder eine Länge von 29908. Der Konsistenz-Index der besten Lösungen ist 0,3578 und unter Ausschluss der nicht informativen Positionen 0,2634. Der Retentionsindex ist 0,5873 und somit der Skalierte Konsistenz-Index 0,2101. Der strikte Konsensusbaum der generalisierten Parsimonie-Analyse besitzt an der Basis nur wenige dichotome und viele polytome Verzweigungspunkte und die Unterstützung der basalen Verzweigungen mit Bootstrap (= BS)-Werten unter 50 ist sehr gering (Abb. 8).

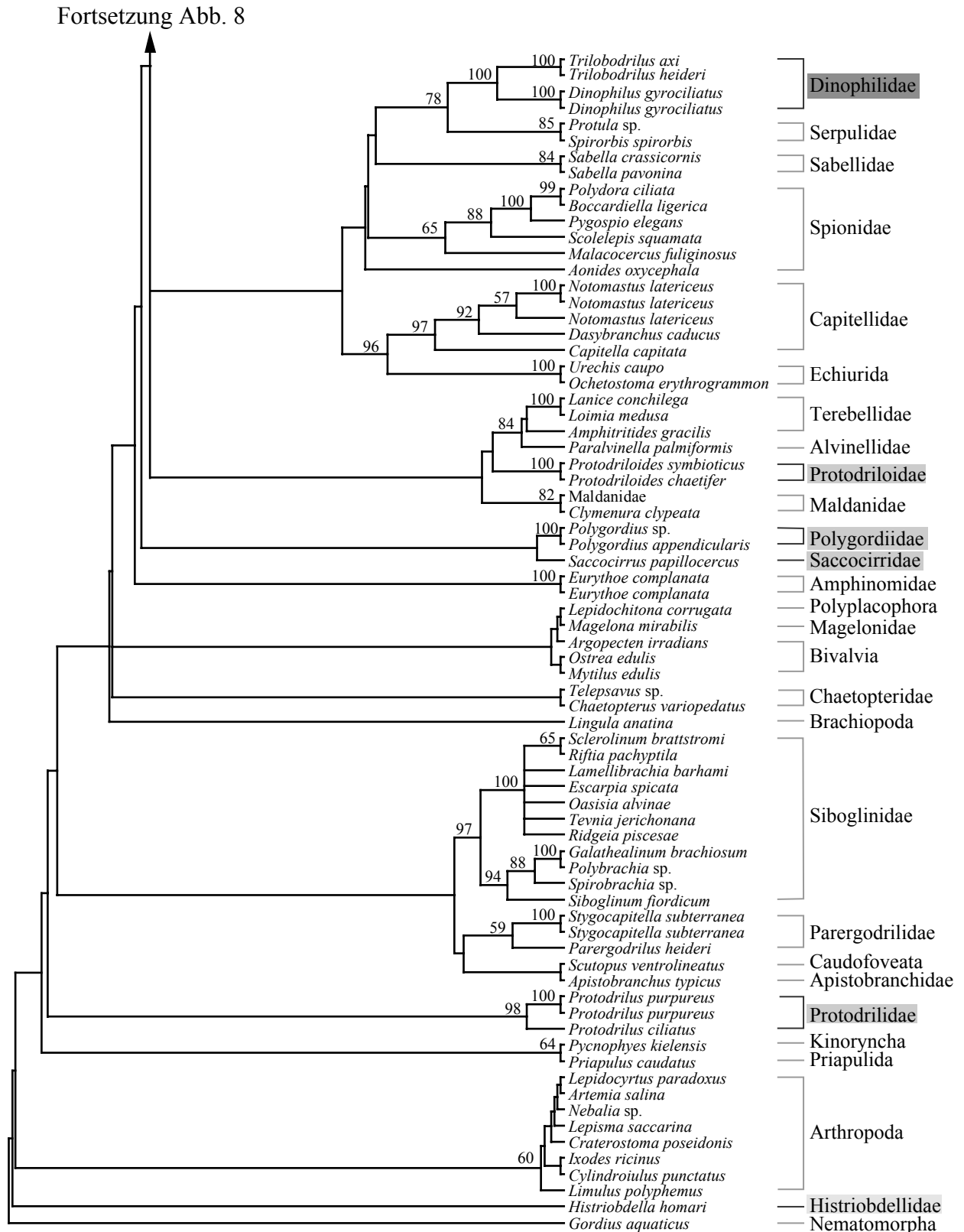


Die Monophylie der Dinophilidae sowie der Gattung *Trilobodrilus* wird mit BS-Werten von 100 unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die Serpulidae. Dieses Verwandtschaftsverhältnis wird mit einem BS-Wert von 78 gestützt. Die Schwestergruppe dieses Kladus sind die Sabellidae, allerdings mit einem BS-Wert unter 50. Eine nähere Verwandtschaft zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ zeigen die 714 Stammbäume nicht. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae erzwingt, sind die Dinophilidae nächst verwandt zu *Histriobdella homari* und den sieben Dorvilleiden *Parougia* sp., *Microdorvillea* sp. n., *Dorvillea bermudensis*, *Parapodrilus psammophilus*, *Dorvillea similis*, *Schistomeringos rudolphi* und *Protodorvillea kefersteinii*. Allerdings sind die Ergebnisse der ermittelten Stammbäume in den meisten gezwungenen Analysen wesentlich schlechter und somit unwahrscheinlicher als die der ungezwungenen Analysen (siehe jeweils die Abschnitte zu den Signifikanztests). Deswegen wurde auch auf eine graphische Darstellung der Stammbäume verzichtet.

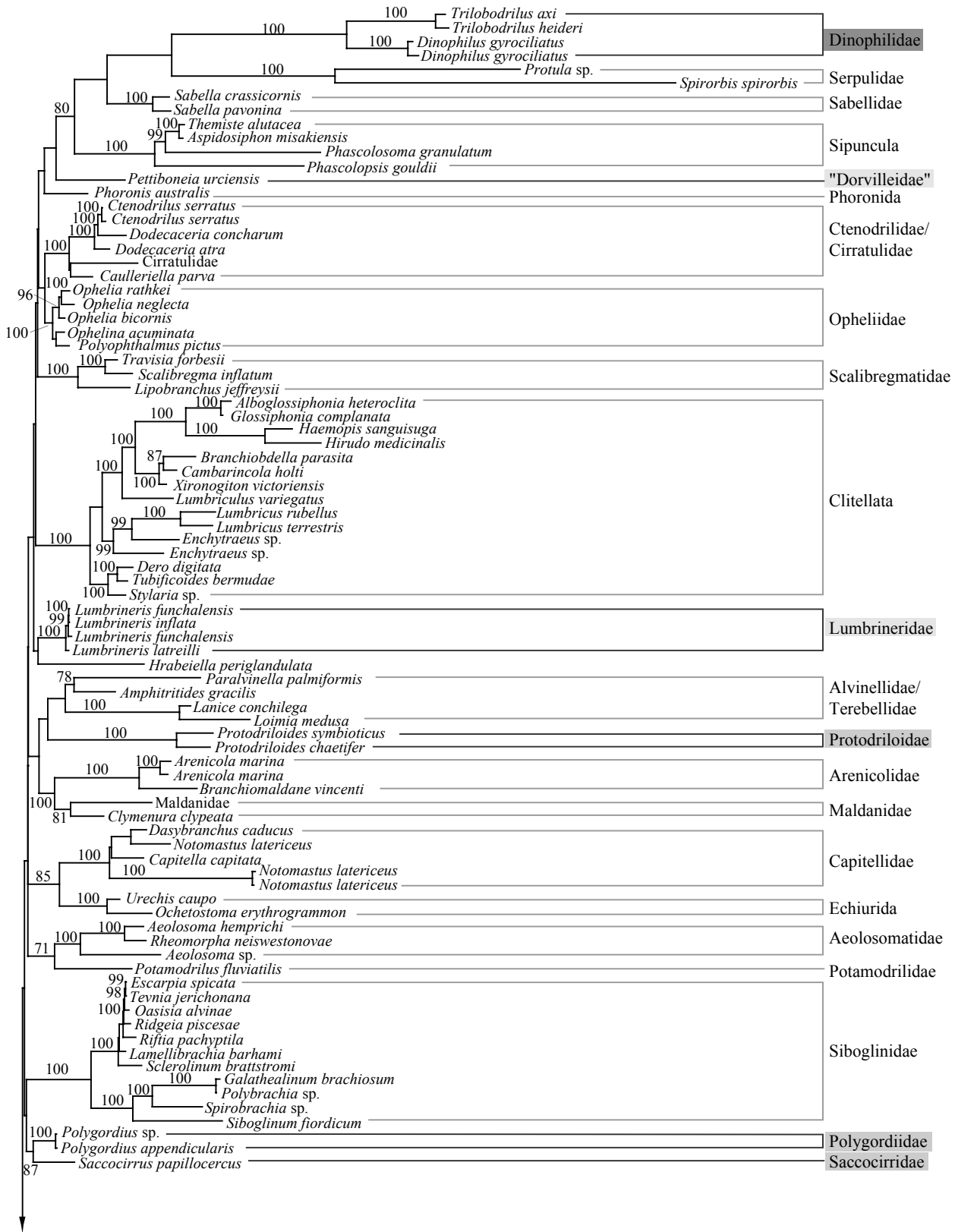
Die Monophylie der Eunicida wird durch diese Analyse nicht bestätigt. Allerdings befinden sich alle Taxa der Eunicida mit Ausnahme der Histriobdellidae in einer polytomen Gruppe, die unter anderem auch alle Taxa der Phyllodocida umfasst (Abb. 8). Jedoch umfasst dieser Kladus auch noch andere nicht zu den Phyllodocida gehörende Taxa. Eine nahe Verwandtschaft der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Eine Monophylie der Dorvilleiden wird von der Analyse nicht rekonstruiert. Es werden zwei Gruppen gefunden. Die eine Gruppe umfasst *Ophryotrocha gracilis* und *Pettiboneia urciensis* und ist paraphyletisch in Bezug auf die Myzostomida. Die andere Gruppe besteht aus den Arten *Parougia* sp., *Microdorvillea* sp. n., *Dorvillea bermudensis*, *Parapodrilus psammophilus*, *Dorvillea similis*, *Schistomeringos rudolphi* und *Protodorvillea kefersteinii*. Der BS-Wert mit 55 für diese Gruppe ist gering. Die nahe Verwandtschaft der progenetischen Art *Parapodrilus psammophilus* zu *Parougia* sp., *Microdorvillea* sp. n. und *Dorvillea bermudensis*, deren Monophylie einen BS-Wert von 100 hat, wird mit einem BS-Wert von 99 gestützt. Die Histriobdellidae nehmen in dieser Analyse eine sehr basale Position ein. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, ist die Schwestergruppe der Eunicidae und Onuphidae ein Kladus aus *Histriobdella homari*, *Ophryotrocha gracilis* und dem Oeononiden *Arabella iricolor*. Am nächsten verwandt zu dieser Gruppe ist die Gruppe der sieben Dorvilleiden um *Parapodrilus psammophilus*. Es folgen *Pettiboneia urciensis* und als basale Gruppe die Lumbrineridae.



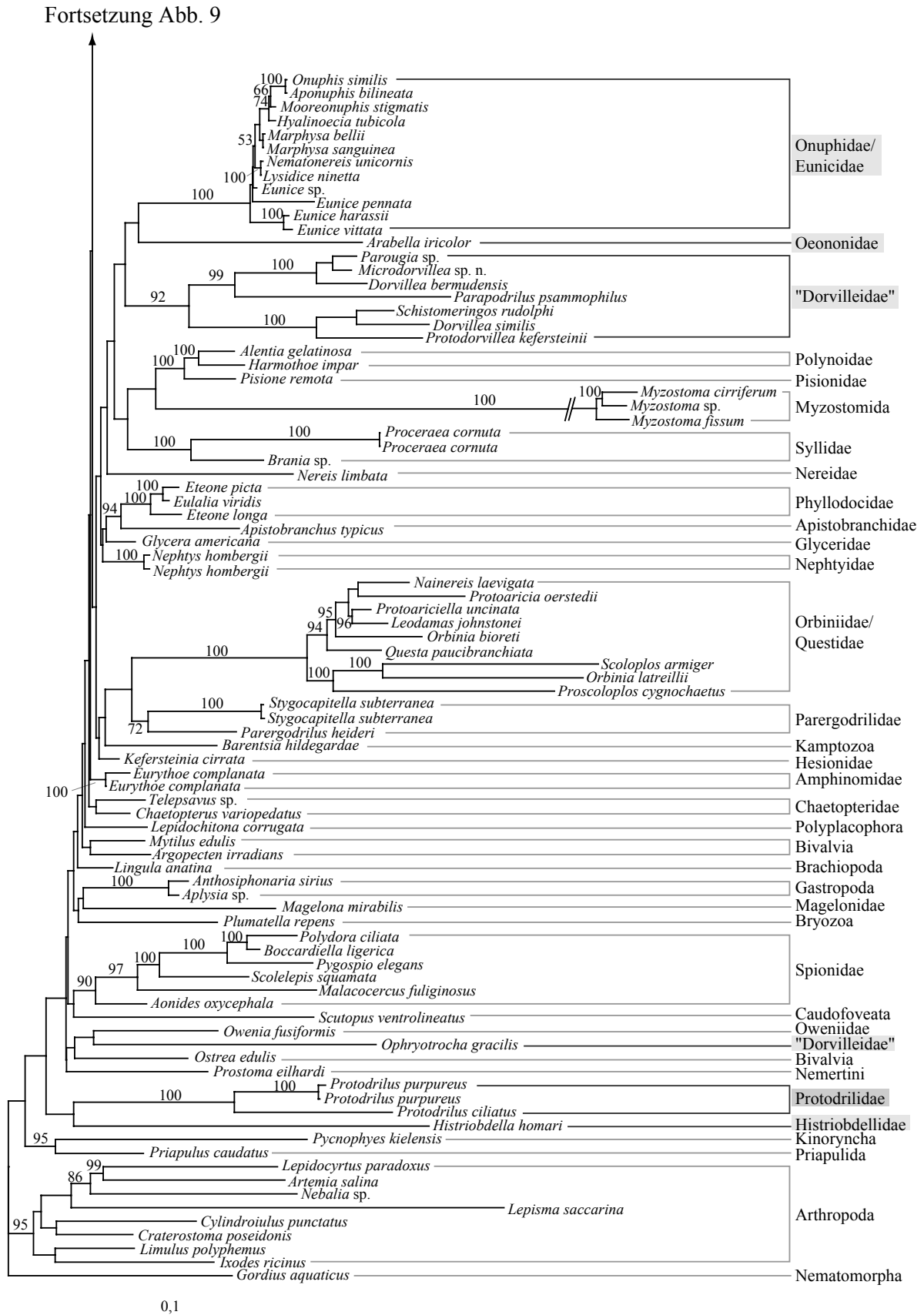
Fortsetzung Abb. 8



**Abb. 8:** Strikter Konsensusbaum von 714 sparsamsten Bäumen in der Parsimonie-Analyse der 18S-rDNA. Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Konsistenz-Index (nicht informative Charaktere ausgeschlossen) = 0,2634; Homoplasie-Index (nicht informative Charaktere ausgeschlossen) = 0,7366; Retentionsindex = 0,5873; Skalierter Konsistenz-Index = 0,2101. **Baumlänge = 29908.**



Fortsetzung Abb. 9



**Abb. 9:** Das Phylogram der Maximum Likelihood Analyse der 18S-rDNA (Substitutionsmodell: Nukleotidfrequenz von: A = 0,2572; C = 0,216; G = 0,2812; T = 0,2452; Ti/Tv-Verhältnis: 1,5639; Anteil invarianter Positionen: 0,2540; Gestaltungsparameter  $\alpha$ : 0,6759). Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die evolutionäre Distanz in Substitutionen pro Position.  $-\ln L = 34888,65028$ .

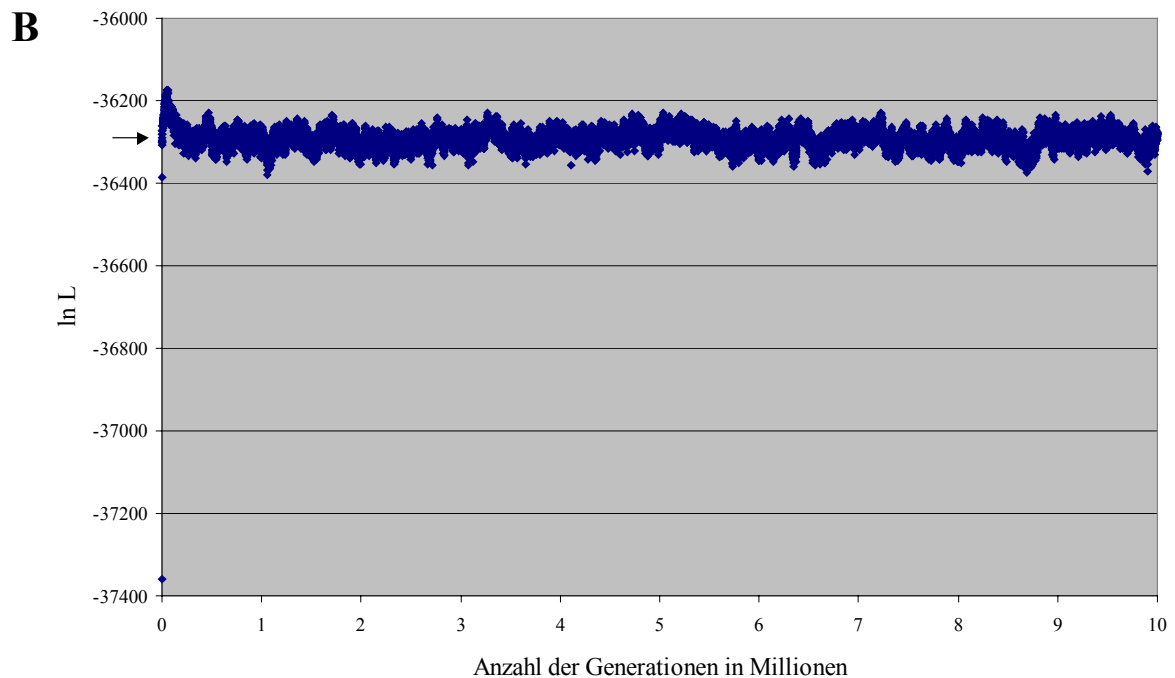
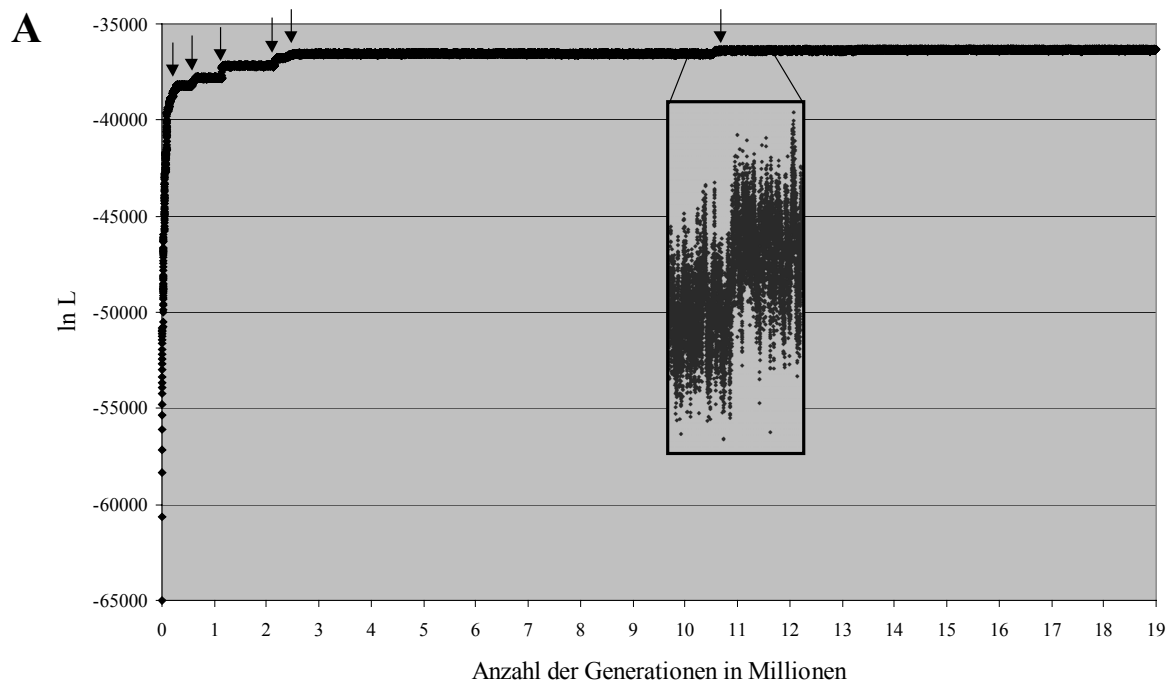
Eine Monophylie der Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ wird durch die Analyse genauso wenig unterstützt wie die Monophylie der Protodrilida. Die Monophylie der Protodrilidae, der Protodriloidae sowie der Polygordiidae wird jedoch mit BS-Werten von 100 bzw. 98 unterstützt. Überraschenderweise sind die Saccocirridae, nach morphologischen Daten ein Taxon der Protodrilida und nicht näher mit den Polygordiidae verwandt, die Schwestergruppe der Polygordiidae, allerdings mit BS-Werten unter 50.

### 3.3.1.2 Maximum Likelihood

Die beste Lösung in der ML-Analyse hat die Wahrscheinlichkeit  $-\ln L = 34888,65028$ . Das Phylogramm der ML-Analyse besitzt an der Basis nur sehr kurze Verzweigungen, dieses deutet auf eine nicht konfliktfreie Auflösung des Datensatzes hin. Die Unterstützung der basalen Verzweigungen ist mit BS-Werten unter 50 sehr gering (Abb. 9).

Die Monophylie der Dinophilidae sowie der Gattung *Trilobodrilus* wird mit BS-Werten von 100 unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind wie in der Parsimonie-Analyse die Serpulidae. Die Schwestergruppe dieses Kladus sind die Sabellidae, allerdings sind die BS-Werte dieser Verzweigungen unter 50. Die Gruppe, die diese drei Taxa sowie die Sipuncula umfasst, wird mit einem BS-Wert von 80 unterstützt. In der BS-Analyse besitzen ferner eine nahe Verwandtschaft von Dinophilidae und Sipuncula sowie eine Monophylie von Serpulidae und Sabellidae jeweils einem Wert von 93. Eine nähere Verwandtschaft zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ konnte durch die beste Lösung nicht gezeigt werden.

Die Monophylie der Eunicida wird durch diese Analyse nicht bestätigt. Die Taxa der Eunicida sind im Phylogramm weit verstreut. Jedoch wird eine nahe Verwandtschaft der Eunicidae und Onuphidae genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Eine Monophylie der Dorvilleiden wird von der Analyse ebenfalls nicht gefunden. *Ophryotrocha gracilis* hat eine basale Position im Stammbaum. *Pettiboneia urciensis* ist die Schwestergruppe der Gruppe mit den Dinophiliden (Sipuncula, Sabellidae, Serpulidae und Dinophilidae), allerdings mit einem BS-Wert unter 50. Die Monophylie der restlichen Arten, *Parougia* sp., *Microdorvillea* sp. n., *Dorvillea bermudensis*, *Parapodrilus psammophilus*, *Dorvillea similis*, *Schistomeringos rudolphi* und *Protodorvillea kefersteinii*, wird hingegen mit einem BS-Wert mit 92 gestützt. Die nahe Verwandtschaft der progenetischen Art *Parapodrilus psammophilus* zur Gruppe *Parougia* sp., *Microdorvillea* sp. n. und *Dorvillea bermudensis*, deren Monophylie einen BS-Wert von 100 hat, wird mit einem BS-Wert von 99 gestützt. Die Histriobdellidae nehmen in dieser Analyse eine sehr basale Position als Schwestergruppe der Protodrilidae ein.



**Abb. 10:** Gleichgewichtsbestimmung der Bayes'schen Untersuchung. Die Likelihood-Werte der gespeicherten Topologie jeder 500. Generation gegen die Generationen. **A)** zufällige Startbäume; **B)** die beste Topologie der ML-Analyse mit MetaPIGA als Startbaum. Beginn einer Gleichgewichtsphase durch einen Pfeil gekennzeichnet. In der Analyse basierend auf der besten Topologie (= B) ein stabiles Gleichgewicht nach 1000 Generationen (Burnin = 2).

Eine Monophylie der Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ wird durch die Analyse genauso wenig unterstützt wie die Monophylie der Protodrilida. Die Monophylie der Protodrilidae, der Protodriloidae sowie der Polygordiidae wird mit BS-Werten von 100 unterstützt. Auch in dieser Analyse sind die Saccocirridae, ein Taxon der Protodrilida, die Schwestergruppe der Polygordiidae. Dieses Verhältnis wird mit einem BS-Wert von 87 gestützt.

### 3.3.1.3 Bayes'sche Analyse

In der Bayes'schen Analyse ist es entscheidend zur Bestimmung der „posterior probabilities“ in ein stabiles Gleichgewicht zu gelangen, welches in der Nähe des absoluten Optimums ist. Vorab wurde darum mit dem Datensatz der 18S-rDNA untersucht, mit welchem Verfahren dieses am sichersten zu gewährleisten ist. Der Datensatz der 18S-rDNA wurde gewählt, da dieses Problem umso schwieriger wird je größer der Datensatz ist. Die Struktur der Wahrscheinlichkeitslandschaft wird mit steigender Zahl der Taxa immer komplexer und ausgeprägter und die Zahl von lokalen Optima, aus denen die Analyse eventuell nicht mehr herauswandert, nimmt zu.

Deswegen wurden zwei Verfahren zur Etablierung des Gleichgewichtes getestet. Im ersten Verfahren wurden 4 zufällige Bäume als Startbäume gewählt und die Analyse berechnete 20 Millionen Generationen. Die Likelihood-Werte jeder 500. Generation wurden gegen die Generationen in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 10A). Die Analyse erreichte nach etwa 2,5 Millionen Generationen ein erstes stabiles Gleichgewicht. Vorher waren schon vier kürzere Gleichgewichtsphasen erreicht worden. In diesem Gleichgewicht verharrte die Analyse etwa 8,5 Millionen Generationen. Bei etwa 11 Millionen Generationen wurde ein etwas höheres stabiles Gleichgewicht erreicht (siehe Ausschnitt Abb. 10A). Dieses Gleichgewicht blieb bis zum Ende der Analyse stabil. Die Dauer der Berechnung war etwa 440 Stunden.

Im zweiten Verfahren wurde der beste Stammbaum aus der ML-Analyse als Startbaum genommen und 10 Millionen Generationen berechnet. Ein stabiles Gleichgewicht wurde schon nach 1.000 Generationen erreicht. Dieses Gleichgewicht wurde bis zum Ende der Analyse nicht mehr verlassen (Abb. 10B). Die Dauer der Berechnung betrug etwa 220 Stunden.

Die Bäume mit der höchsten und der niedrigsten Wahrscheinlichkeit in den beiden stabilen Gleichgewichten, somit die Grenzen der Gleichgewichte, wurden bestimmt. In PAUP wurde ein Test nach Shimodaira & Hasegawa (1999) durchgeführt. Die beiden Gleichgewichte überschneiden sich nicht, da die niedrigste Wahrscheinlichkeit des Gleichgewichtes basierend auf dem zweiten Verfahren deutlich höher ist als die höchste Wahrscheinlichkeit des Gleichgewichtes basierend auf zufälligen Startbäumen (Tabelle 9). Der SH-Test bestätigt, dass



die Bäume innerhalb des Gleichgewichtes aus dem zweiten Verfahren als Lösungen im Vergleich zur besten Lösung nicht signifikant abgelehnt werden können. Ein Vergleich der besten Lösung aus dem zweiten Verfahren mit dem Gleichgewicht basierend auf dem ersten Verfahren zeigt, dass die Lösung mit der niedrigsten Wahrscheinlichkeit, also die untere Grenze des Gleichgewichtes, signifikant abgelehnt werden kann im Vergleich zur besten Lösung aus dem zweiten Verfahren, der Wert von 0,029 ist kleiner als 0,05. Ein Anteil des Gleichgewichtes aus dem ersten Verfahren ist damit signifikant schlechter als die beste Lösung des zweiten Verfahrens.

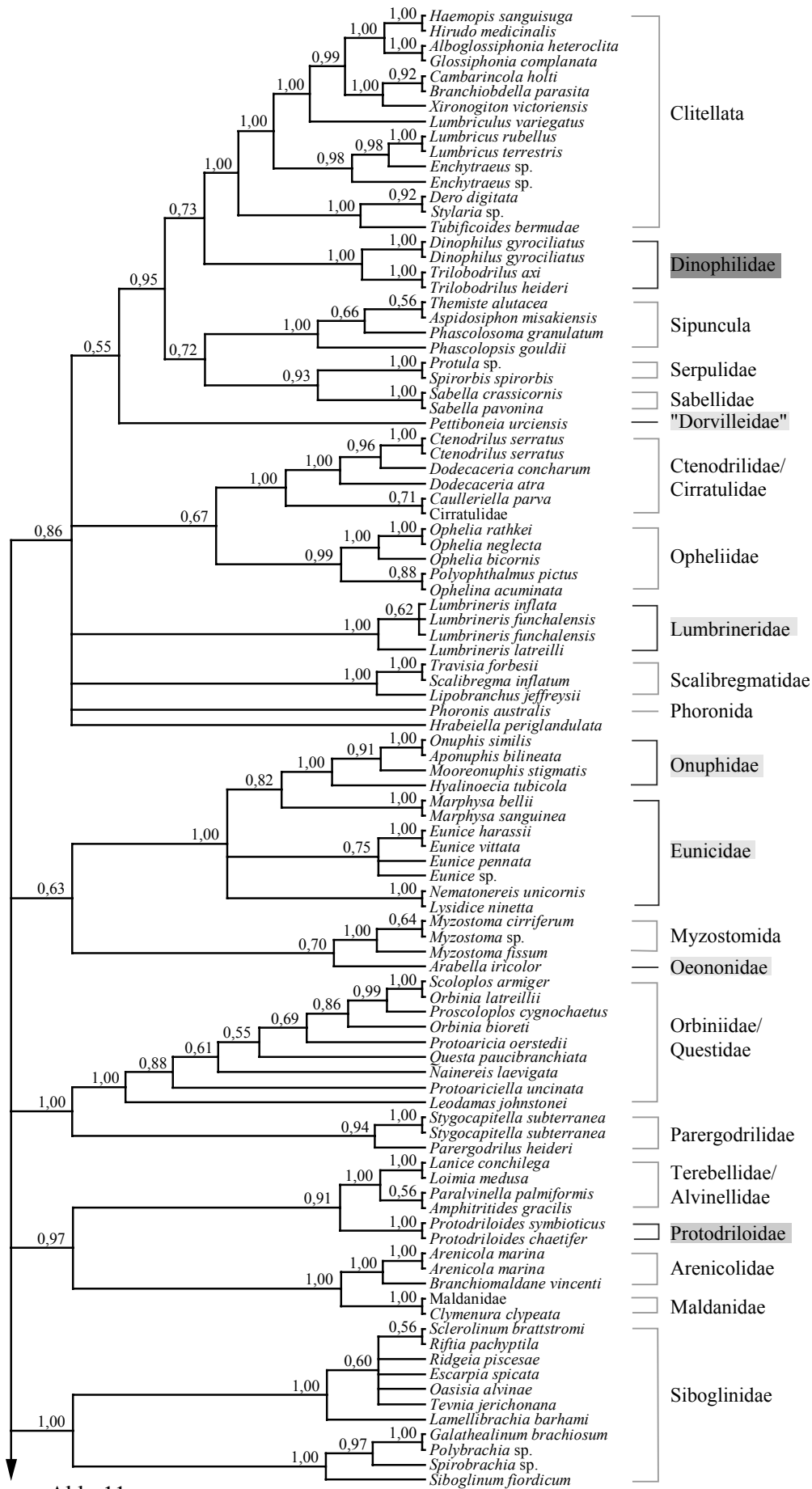
**Tabelle 9:** Nicht - parametrischer Signifikanztest des jeweils besten und schlechtesten Baumes im Gleichgewicht, sowohl mit zufälligen Bäumen als Startpunkt als auch mit dem besten Baum aus der ML-Analyse mit MetaPIGA.

| Art der Startbäume | Wahrscheinlichkeit | - ln L      | SH-Test |
|--------------------|--------------------|-------------|---------|
| aus der ML-Analyse | <b>höchste</b>     | 36011,21508 | -       |
|                    | <b>niedrigste</b>  | 36018,91147 | 0,652   |
| zufällig           | <b>höchste</b>     | 36044,24516 | 0,371   |
|                    | <b>niedrigste</b>  | 36110,35262 | 0,029   |

Der 50%-Konsensusbaum der Bayes'schen Analyse besitzt an der Basis zwei große polytome Verzweigungen, dieses zeigt noch einmalig deutlich die nicht konfliktfreie Auflösung des Datensatzes (Abb. 11).

Die Monophylie der Dinophilidae sowie der Gattung *Trilobodrilus* wird mit „posterior probabilities“ von 1,00 unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die Clitellata. Die Schwestergruppe dieses Kladus ist eine Gruppe von Sabellidae, Serpulidae und Sipuncula. Die „posterior probability“ dieser gesamten Gruppe ist 0,95. Des Weiteren wird das Schwestergruppenverhältnis von Serpulidae und Sabellidae mit einer „posterior probability“ von 0,93 unterstützt. Eine nähere Verwandtschaft zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ konnte nicht gezeigt werden.

Die Monophylie der Eunicida wird durch diese Analyse nicht bestätigt. Die Taxa der Eunicida verteilen sich in den beiden großen Polytomien. Eine nahe Verwandtschaft der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit „posterior probabilities“ von 1,00 unterstützt.



Fortsetzung Abb. 11



Eine Monophylie der Dorvilleiden wird von der Analyse nicht bestätigt. *Ophryotrocha gracilis* hat eine basale Position im Stammbaum. *Pettiboneia urciensis* ist die Schwestergruppe der Gruppe mit den Dinophiliden, allerdings mit einer geringen „posterior probability“ von 0,55. Die Monophylie der restlichen Arten, *Parougia* sp., *Microdorvillea* sp. n., *Dorvillea bermudensis*, *Parapodrilus psammophilus*, *Dorvillea similis*, *Schistomeringos rudolphi* und *Protodorvillea kefersteinii*, wird hingegen mit einer „posterior probability“ von 1,00 gestützt. Die nahe Verwandtschaft der progenetischen Art *Parapodrilus psammophilus* zu *Parougia* sp., *Microdorvillea* sp. n. und *Dorvillea bermudensis*, deren Monophylie eine „posterior probability“ von 1,00 hat, wird mit einer „posterior probability“ von 1,00 unterstützt. Die Histriobdellidae nehmen in dieser Analyse eine sehr basale Position ein.

Eine Monophylie der Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ wird durch die Analyse genauso wenig unterstützt wie die Monophylie der Protodrilida. Die Monophylie der Protodrilidae, der Protodriloidae sowie der Polygordiidae wird durch „posterior probabilities“ von 1,00 unterstützt. Die Saccocirridae sind die Schwestergruppe der Polygordiidae mit einer „posterior probability“ von 0,99.

#### 3.3.1.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen

Da verschiedene Verwandtschaftshypothesen für die Dinophilidae diskutiert werden, wurde getestet, ob bestimmte Hypothesen gegenüber anderen Hypothesen oder der besten Lösung signifikant abgelehnt werden können. Es wurden folgende Hypothesen getestet:

- A) Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,
- B) Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae und
- C) Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“.

Der Vergleich der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae ergab im KH-Test einen Wert von 0,1922 und im Tempelton-Test einen von 0,1013 (Tabelle 10). Damit wird die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae mit einer Wahrscheinlichkeit von 80,8% bzw. 89,9% zugunsten der alternativen Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae abgelehnt. Die Ablehnung ist damit zwar hoch, aber nicht signifikant.

Der Vergleich der drei Hypothesen A, B und C mit der besten Lösung zeigt, dass aufgrund sowohl des KH- als auch des Tempelton-Tests keine der Hypothesen signifikant abgelehnt werden kann (Tabelle 10). Alle Werte sind größer als 0,05 und die Wahrscheinlichkeit der Ablehnung ist somit kleiner als 95%. Allerdings sind die Ergebnisse, die eine nahe Verwandtschaft der Dinophilidae mit entweder den Eunicida oder den ehemaligen

„Archiannelida“ erzwingen, deutlich geringer als die Ergebnisse, die eine Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae favorisieren.

**Tabelle 10:** Nicht - parametrische Signifikanztests für die Unterstützung verschiedener Hypothesen durch den Datensatz der 18S-rDNA:  
**A** = Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,  
**B** = Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae,  
**C** = Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“,  
**D** = bestes Ergebnis der phylogenetischen Analyse.  
n. a. = nicht angewendet

|          | gegeneinander getestete Hypothesen |                | Parsimonie |                |
|----------|------------------------------------|----------------|------------|----------------|
|          | Baumlänge                          | Baumlänge      | KH-Test    | Tempelton-Test |
| <b>A</b> | <b>30005</b>                       | <b>B 30124</b> | 0,1922     | 0,1013         |
| <b>A</b> | <b>30005</b>                       | <b>D 29908</b> | 0,5037     | 0,7593         |
| <b>B</b> | <b>30124</b>                       | <b>D 29908</b> | 0,0735     | 0,1201         |
| <b>C</b> | <b>30049</b>                       | <b>D 29908</b> | 0,0941     | 0,0679         |

Goldman *et al.* (2000) zeigten, dass sowohl der KH-Test als auch der Tempelton-Test unpassend bei Vergleichen des besten Ergebnisses mit *a priori* Hypothesen ist. Andererseits folgerten sie, dass Werte über 0,1 in diesen beiden Tests implizieren, dass auch ein passender nicht-parametrischer Test, wie der SH-Test, einen Wert ermitteln würde, der eine *a priori* Hypothese zugunsten der besten Lösung nicht signifikant ablehnen könnte, der also größer als 0,05 ist. Bei Werten kleiner 0,1 kann eine signifikante Ablehnung nicht mehr sicher ausgeschlossen werden. In diesen Analysen wurden trotzdem bei dem Vergleich der besten Ergebnisse gegen die *a priori* Hypothese eine Grenze von 0,05 für die mögliche Signifikanz genommen, um in den Schlussfolgerungen konservativer zu sein. Bei beiden Tests muss außerdem in der Diskussion beim Vergleich der *a priori* Hypothesen mit der besten Lösung immer berücksichtigt werden, dass auch bei Werten unter 0,05 nicht mit Sicherheit auf Signifikanz geschlossen werden kann.

### 3.3.2 28S-rDNA

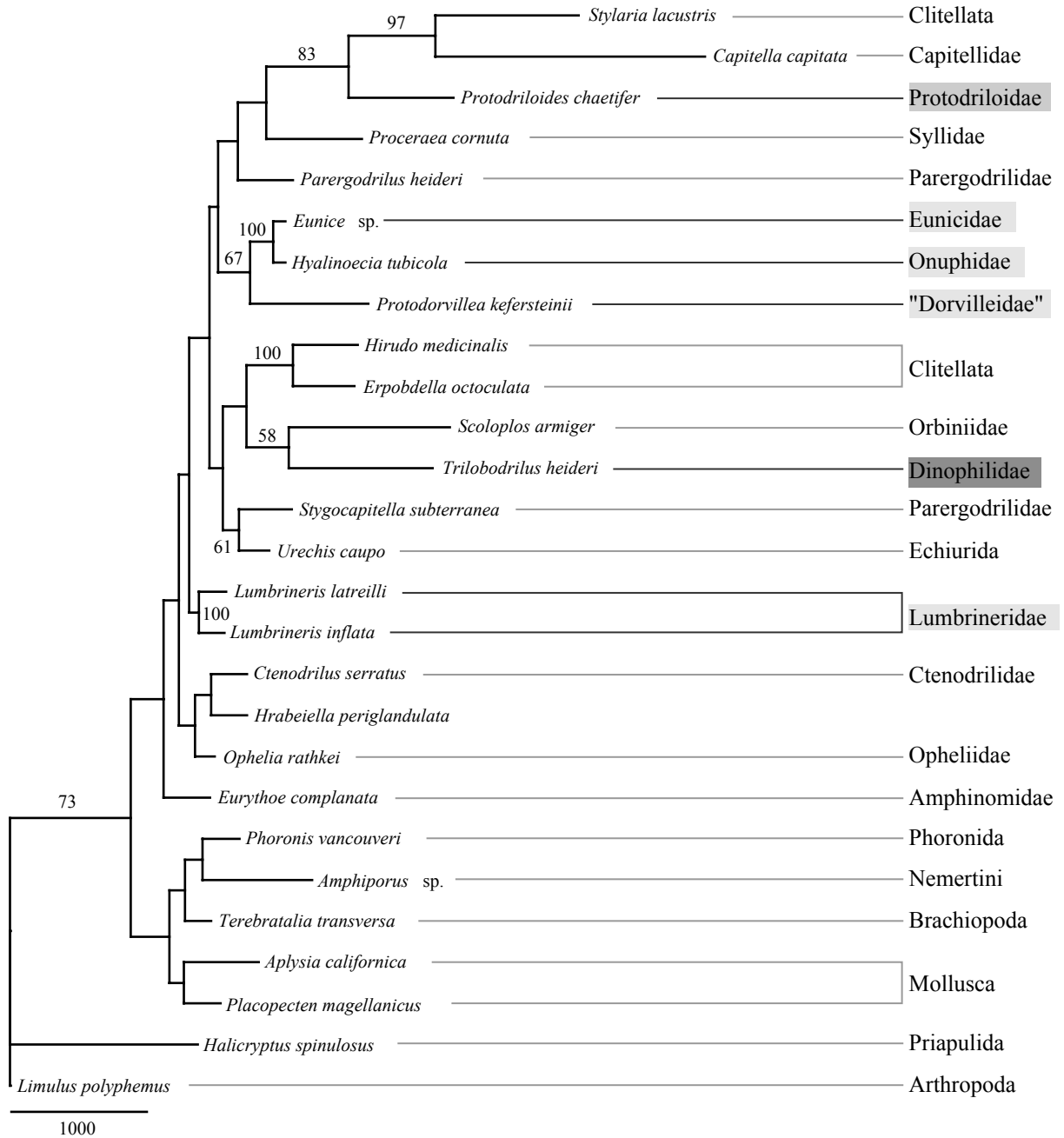
#### 3.3.2.1 Generalisierte Parsimonie

Von den 1734 Positionen, die in die Analyse eingegangen sind, sind 826 Positionen (47,6%) konstant, 300 variable Positionen (17,3%) in der Parsimonie-Analyse nicht informativ und 608 Positionen (35,1%) informativ. Der sparsamste Baum besitzt eine Länge von 18528. Der Konsistenz-Index der besten Lösungen ist 0,5247 und unter Ausschluss der nicht informativen Positionen 0,4044. Der Retentionsindex ist 0,3444 und somit der Skalierte Konsistenz-Index 0,1807.

Im Phylogramm der generalisierten Parsimonie-Analyse sind nur wenige der Verzweigungspunkte durch BS-Werte über 50 unterstützt (Abb. 12). Allerdings unterstützt der Datensatz der 28S-rDNA eine Monophylie sowohl der Annelida (inklusive der Echiurida) als auch der Mollusca. Die BS-Werte sind aber unter 50.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die Orbiniidae. Dieses Verwandtschaftsverhältnis wird mit einem BS-Wert von 58 gestützt. Die Schwestergruppe dieses Kladus sind die in dieser Analyse nicht monophyletischen Clitellata, allerdings mit einem BS-Wert unter 50. Der Clitellat *Stylaria lacustris* ist näher mit *Capitella capitata* und *Protodriloides chaetifer* verwandt, dieses wird durch BS-Werte von 97 bzw. 83 gestützt. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, sind Dinophilidae am nächsten mit *Protodorvillea kefersteinii* verwandt.

Die Monophylie der Eunicida wird durch diese Analyse nicht bestätigt. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteinii* ist in dieser Analyse nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist 67. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, wird ebenfalls eine nahe Verwandtschaft von *Protodorvillea kefersteinii* mit den Eunicidae und Onuphidae unterstützt. Die Schwestergruppe sind in der Analyse die Lumbrineridae.



**Abb. 12:** Das Phylogramm der Parsimonie-Analyse der 28S-rDNA. Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die Anzahl der Transformationsschritte an. Konsistenz-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,4044; Homoplasie-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,5956; Retentionsindex = 0,3444; Skalierter Konsistenz-Index = 0,1807. **Baumlänge = 18528.**



**Abb. 13:** Das Phylogramm der Maximum Likelihood-Analyse der 28S-rDNA. (Substitutionsmodell: Nukleotidfrequenz von: A = 0,2590; C = 0,2165; G = 0,3017; T = 0,2228; Ratenmatrix = 0,8245 1,8730 1,0367 0,7162 4,7728 1,0000; Anteil invarianter Positionen: 0,2742; Gestaltparameter  $\alpha$ : 0,6116). Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die evolutionäre Distanz in Substitutionen pro Position.  $-\ln L = 15182,04837$ .



### 3.3.2.2 Maximum Likelihood

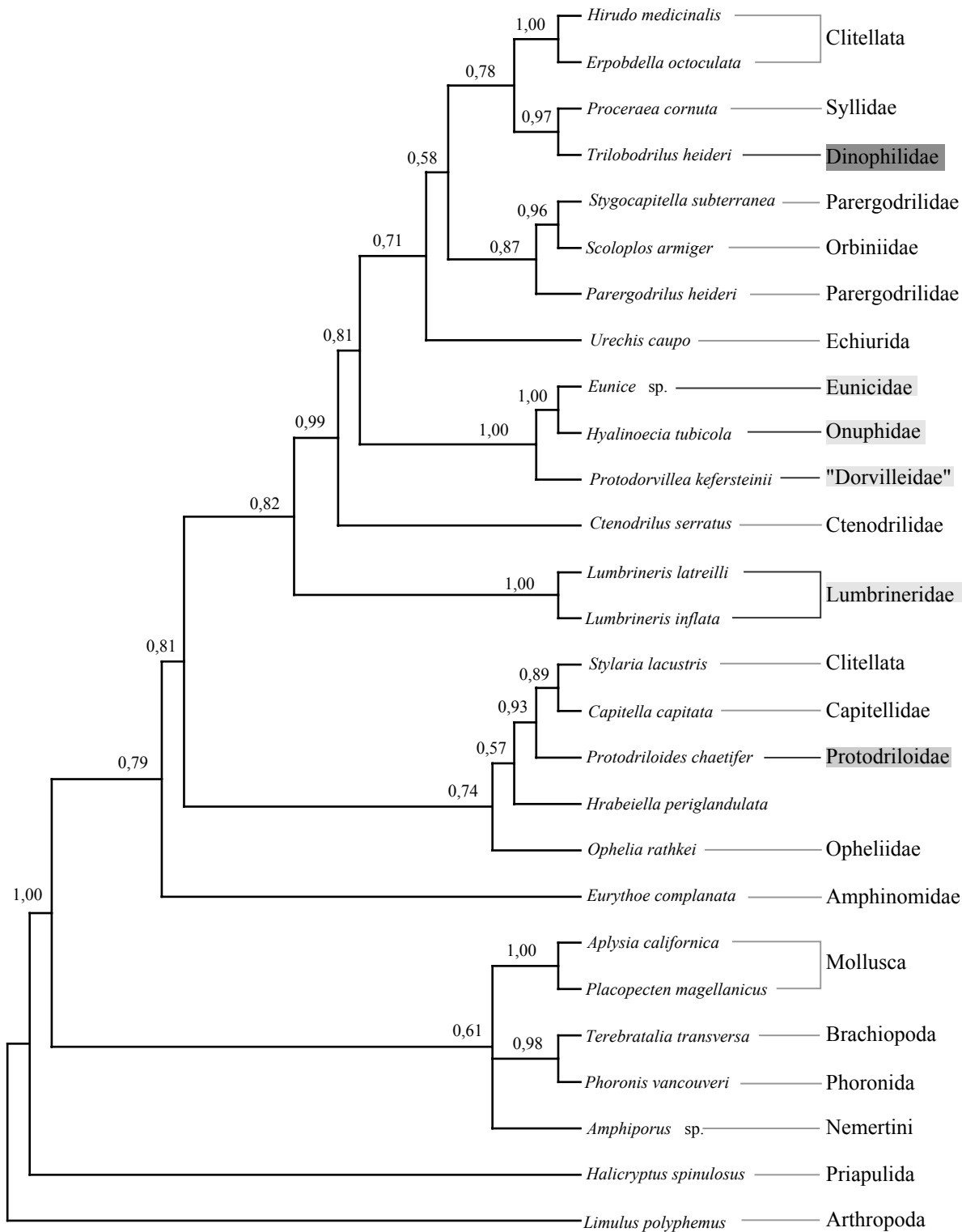
Die beste Lösung in der ML-Analyse hat die Wahrscheinlichkeit  $-\ln L = 15182,04837$ . Das Phylogramm der ML-Analyse besitzt an der Basis nur sehr kurze Verzweigungen, dieses deutet auf eine nicht konfliktfreie Auflösung des Datensatzes hin. Nur wenige Verzweigungen werden mit BS-Werten über 50 unterstützt (Abb. 13). Auch in dieser Analyse wird eine Monophylie sowohl der Annelida (inklusive der Echiurida) als auch der Mollusca unterstützt. Die BS-Werte sind aber unter 50.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die Syllidae. Die Schwestergruppe dieses Kladus sind die auch in dieser Analyse nicht monophyletischen Clitellata. Die BS-Werte dieser beiden Gruppen sind allerdings unter 50. Der Clitellat *Stylaria lacustris* ist näher mit *Capitella capitata* und *Protodriloides chaetifer* verwandt. Die Unterstützung durch die BS-Werte ist mit 67 bzw. 65 gering. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, nehmen die Dinophilidae die basale Position ein und sind die Schwestergruppe aller anderen Taxa der Eunicida.

Die Monophylie der Eunicida wird durch die ML-Analyse nicht bestätigt. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteinii* ist in dieser Analyse nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist 77. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, wird ebenfalls eine nahe Verwandtschaft von *Protodorvillea kefersteinii* mit den Eunicidae und Onuphidae unterstützt. Die Schwestergruppe sind in der Analyse die Lumbrineridae.

### 3.3.2.3 Bayes'sche Analyse

Der 50%-Konsensusbaum der Bayes'schen Analyse ist zwar sehr gut aufgelöst, die basalen Verzweigungen besitzen aber keine „posterior probabilities“ über 0,9 (Abb. 14). Auch durch die Bayes'sche Analyse wird eine Monophylie sowohl der Annelida (inklusive der Echiurida) mit einer „posterior probability“ von 0,79 als auch der Mollusca mit einer „posterior probability“ von 1,00 unterstützt.



**Abb. 14:** 50%-Konsensusbaum der 19999 Bäume im Gleichgewicht der Bayes'schen Untersuchung der 28S-rDNA (Burnin = 1). Nur „posterior probabilities“ über 0,5 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige „Archiannelida“-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die Syllidae. Dieses wird mit einer „posterior probability“ von 0,97 gestützt. Die Schwestergruppe dieses Kladus sind wiederum die nicht monophyletischen Clitellata. Die „posterior probability“ ist 0,78.

Der Clitellat *Stylaria lacustris* ist näher mit *Capitella capitata* und *Protodriloides chaetifer* verwandt. Dieses wird mit „posterior probabilities“ von 0,89 bzw. 0,93 gestützt.

Die Monophylie der Eunicida wird auch in dieser Analyse nicht rekonstruiert. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit einer „posterior probability“ von 1,00 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteinii* ist erneut nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Die „posterior probability“ für diese Gruppierung ist 1,00.

#### 3.3.2.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen

In der Parsimonie-Analyse ergibt der Vergleich der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit (= B) und ohne Dinophilidae (= A) im KH-Test einen Wert von 0,0746 und im Tempelton-Test von 0,1189 (Tabelle 11). Damit wird die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae mit einer Wahrscheinlichkeit von 92,5% bzw. 88,1% zugunsten der alternativen Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae abgelehnt. Die Ablehnung ist damit zwar hoch, aber nicht signifikant.

Der Vergleich der drei Hypothesen A, B und Monophylie der Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ (= C) mit der besten Lösung zeigt, dass aufgrund des KH-Tests keine der Hypothesen signifikant abgelehnt werden kann. Alle Werte sind größer als 0,05 und die Wahrscheinlichkeit der Ablehnung ist somit kleiner als 95%. Allerdings sind die Ergebnisse, die eine nahe Verwandtschaft der Dinophilidae mit entweder den Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ erzwingen, deutlich geringer als die Ergebnisse, die eine Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae favorisieren. Beim Tempelton-Test kann die Hypothese einer nahen Verwandtschaft der Eunicida und Dinophilidae mit einer Wahrscheinlichkeit von 95,5% signifikant abgelehnt werden. Die beiden anderen Hypothesen können nicht signifikant abgelehnt werden, da sie Werte besitzen die größer als 0,05 sind. Der Unterschied zwischen diesen beiden Hypothesen ist nicht so stark wie beim KH-Test.

In der ML-Analyse resultiert der KH-Test der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae in einem Wert von 0,280. Die Ablehnungswahrscheinlichkeit für die Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae ist somit nur 72%.

Der SH-Test zum Vergleich der besten Lösung mit den drei untersuchten Hypothesen resultiert ebenfalls in einer nicht signifikanten Ablehnung, da die Werte größer als 0,05 sind. Allerdings lässt sich wiederum ein Unterschied in der Ablehnungswahrscheinlichkeit zwischen der Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae und den beiden anderen Hypothesen feststellen.

**Tabelle 11:** Nicht - parametrische Signifikanztests für die Unterstützung verschiedener Hypothesen durch den Datensatz der 28S-rDNA:

A = Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,

B = Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae,

C = Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“,

D = bestes Ergebnis der phylogenetischen Analyse.

n. a. = nicht angewendet

| gegeneinander getestete Hypothesen |           | Parsimonie |                | gegeneinander getestete Hypothesen |        | Maximum Likelihood |            |   |            |       |       |
|------------------------------------|-----------|------------|----------------|------------------------------------|--------|--------------------|------------|---|------------|-------|-------|
| Baumlänge                          | Baumlänge | KH-Test    | Tempelton-Test | -ln L                              | -ln L  | KH-Test            | SH-Test    |   |            |       |       |
| A                                  | 18551     | B          | 18775          | 0,0746                             | 0,1189 | A                  | 15190,7994 | B | 15201,5477 | 0,280 | n. a. |
| A                                  | 18551     | D          | 18528          | 0,7718                             | 0,5777 | A                  | 15190,7994 | D | 15182,0484 | n. a. | 0,491 |
| B                                  | 18775     | D          | 18528          | 0,0745                             | 0,0446 | B                  | 15201,5477 | D | 15182,0484 | n. a. | 0,205 |
| C                                  | 18804     | D          | 18528          | 0,0611                             | 0,3415 | C                  | 15198,9445 | D | 15182,0484 | n. a. | 0,267 |

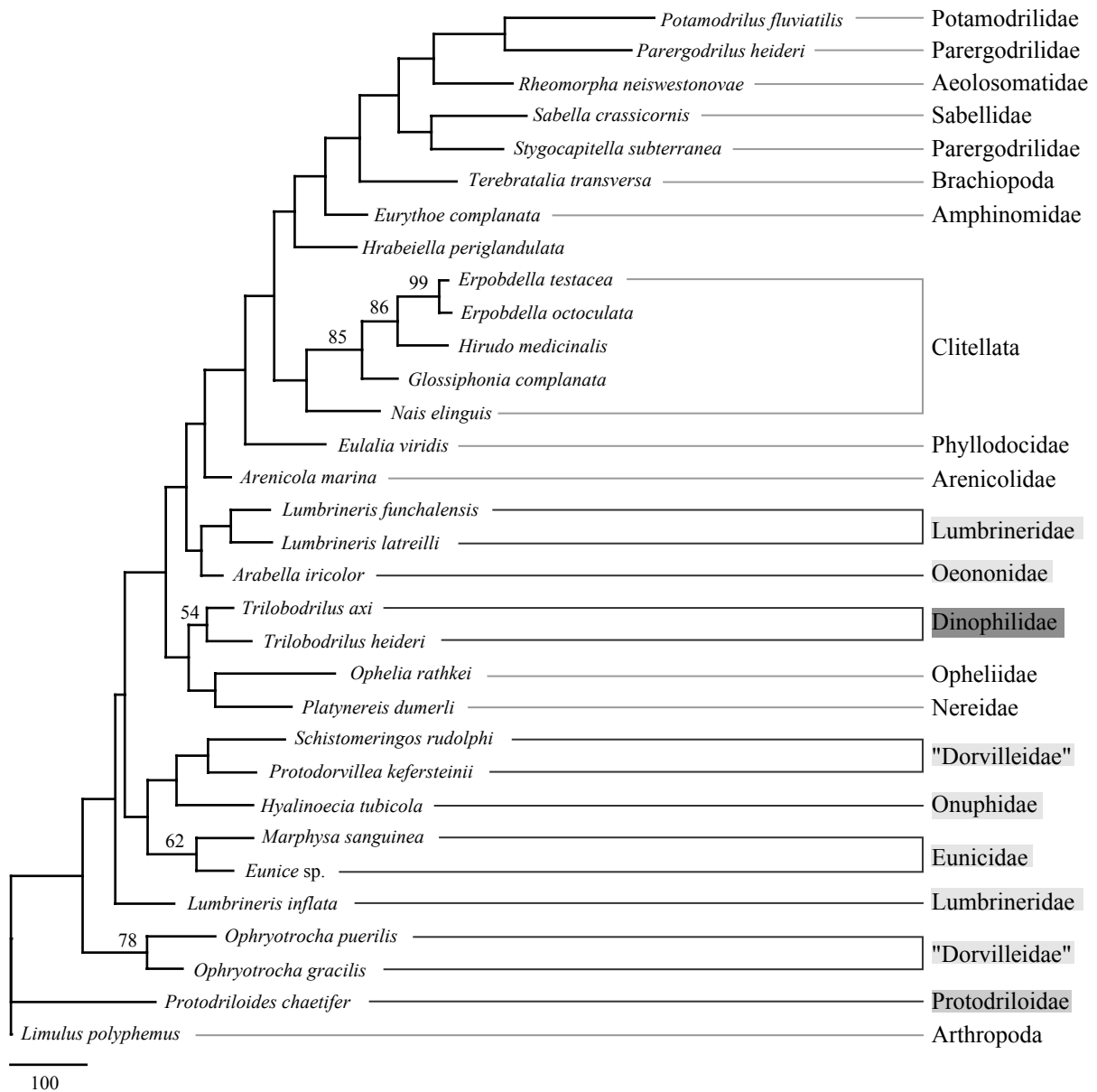
### 3.3.3 CO I

#### 3.3.3.1 Generalisierte Parsimonie

Von den 286 Positionen, die in die Analyse eingegangen sind, sind 156 Positionen (54,5%) konstant, 33 variable Positionen (11,5%) in der Parsimonie-Analyse nicht informativ und 97 Positionen (33,9%) informativ. Der sparsamste Baum hat eine Länge von 3553. Der Konsistenz-Index der besten Lösungen ist 0,3352 und unter Ausschluss der nicht informativen Positionen 0,2875. Der Retentionsindex ist 0,4159 und somit der Skalierte Konsistenz-Index 0,1394.

Im Phylogramm der generalisierten Parsimonie-Analyse sind nur sehr wenige der Verzweigungspunkte durch BS-Werte über 50 unterstützt (Abb. 15)

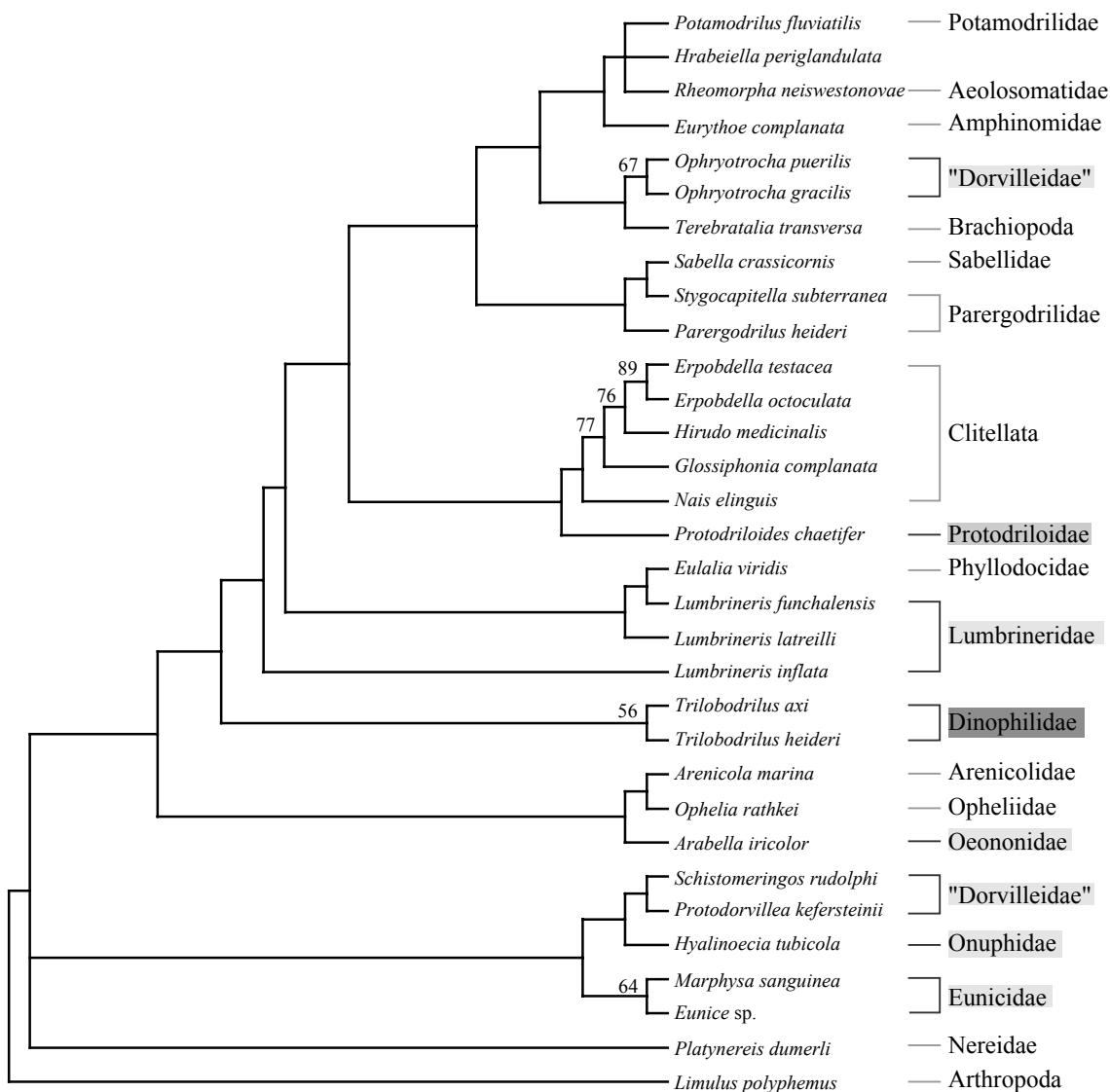
Die Monophylie der Gattung *Trilobodrilus* wird mit einem BS-Wert von 54 unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae ist eine Gruppe aus Opheliidae und Nereidae. Der BS-Wert dieses Verwandtschaftsverhältnisses ist unter 50. Diese Gruppe ist Teil der basalen paraphyletischen Eunicida. Eine nähere Verwandtschaft zu *Protodriloides chaetifer* wird nicht bestätigt. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, sind die Dinophilidae die Schwestergruppe von *Lumbrineris inflata* und den beiden Arten der *Ophryotrocha*.



**Abb. 15:** Das Phylogramm der Parsimonie-Analyse von CO I. Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die Anzahl der Transformationsschritte an. Konsistenz-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,2875; Homoplasie-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,7125; Retentionsindex = 0,4159; Skalierter Konsistenz-Index = 0,1394. **Baumlänge = 3553.**

Die Monophylie der Eunicida wird durch den Datensatz der CO I nicht bekräftigt. Allerdings nehmen sie eine basale Position ein und sind paraphyletisch in Bezug auf die anderen Annelida, ohne *Protodriloides chaetifer*, und *Terebratalia transversa*. Die Monophylie der Eunicidae wird mit einem BS-Wert von 62 unterstützt. Die Monophylie der Lumbrineridae wird durch die CO I nicht bestätigt. Vielmehr sind *Lumbrineris funchalensis* und *Lumbrineris latreilli* näher verwandt mit *Arabella iricolor*. Die BS-Werte sind unter 50. Eine Monophylie der Dorvilleiden wird auch von dieser Analyse nicht unterstützt. Die Monophylie von *Ophryotrocha gracilis* und

*Ophryotrocha puerilis* wird mit einem BS-Wert von 78 bestätigt. Die *Ophryotrocha*-Arten nehmen innerhalb der paraphyletischen Eunicida die ursprünglichste Position ein. *Schistomeringos rudolphi* und *Protodorvillea kefersteinii* sind näher mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppe ist unter 50. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, sind die beiden *Ophryotrocha*-Arten am nächsten mit *Lumbrineris inflata* verwandt. Deren Schwestergruppe ist ein Kladus aus den restlichen Arten der Lumbrineridae und dem Oeononiden *Arabella iricolor*. Die Eunicidae und Onuphidae sind am nächsten mit *Protodorvillea kefersteinii* und *Schistomeringos rudolphi* verwandt und dieses ist Schwestergruppe der anderen Eunicida.



**Abb. 16:** Strikter Konsensusbaum von 7 wahrscheinlichsten Bäumen in der Maximum Likelihood-Analyse von CO I. (Substitutionsmodell: Nukleotidfrequenz von: A = 0,2391; C = 0,1973; G = 0,2093; T = 0,3530; Ratenmatrix = 2,3910 4,4883 2,2950 2,2971 4,4828 1,0000; Anteil invarianter Positionen: 0,4361; Gestaltungsparameter  $\alpha$ : 0,6855). Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. **-ln L = 3155,05322.**

### 3.3.3.2 Maximum Likelihood

7 Stammbäume besitzen in der ML-Analyse die gleiche Wahrscheinlichkeit von  $-\ln L = 3155,05322$ . Deswegen wurde der strikte Konsensusbaum gebildet. Im strikten Konsensusbaum der ML-Analyse sind nur sehr wenige der Verzweigungspunkte durch BS-Werte über 50 unterstützt (Abb. 16).

Die Monophylie der Gattung *Trilobodrilus* wird mit einem BS-Wert von 56 unterstützt. Die Dinophilidae sind die Schwestergruppe einer großen Gruppe von Anneliden, die u. a. verschiedene Euniciden, *Protodriloides chaetifer*, *Terebratalia transversa*, Clitellaten und verschiedene andere Polychaeten umfasst. Die BS-Werte dieser Gruppierungen sind unter 50. Eine nähere Verwandtschaft zu Taxa der Eunicida oder *Protodriloides chaetifer* konnte nicht gezeigt werden. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, sind die Dinophilidae die Schwestergruppe der Lumbrineridae.

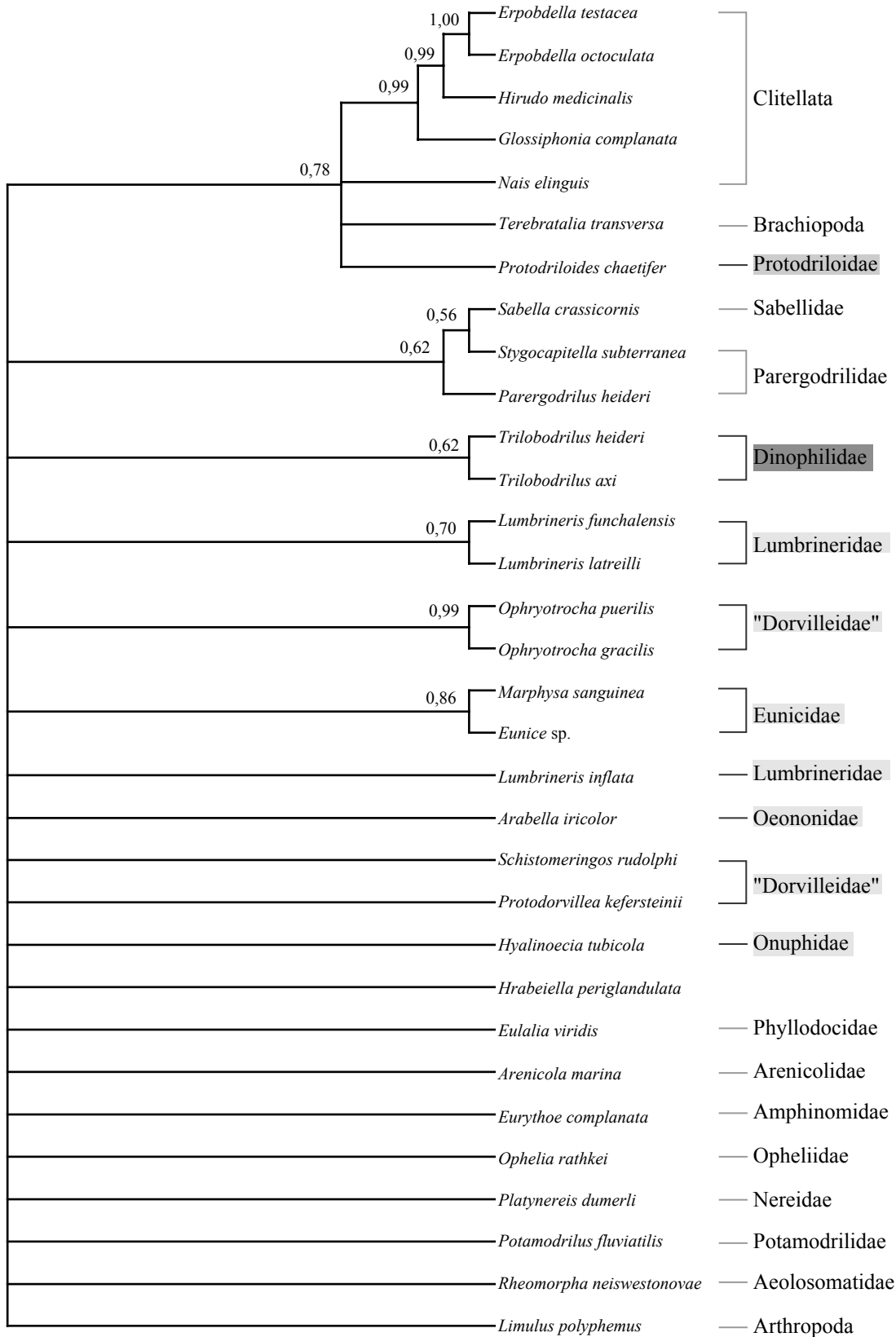
Die Monophylie der Eunicida wird in dieser Analyse nicht rekonstruiert. Sie sind weit über den Stammbaum verteilt. Die Monophylie der Eunicidae wird mit einem BS-Wert von 64 unterstützt. Die Monophylie der Lumbrineridae sowie der Dorvilleiden wird durch die CO I nicht bestätigt. Die Monophylie von *Ophryotrocha gracilis* und *Ophryotrocha puerilis* wird mit einem BS-Wert von 67 bestätigt und sie sind die Schwestergruppe der Brachiopoda (BS-Wert unter 50). *Schistomeringos rudolphi* und *Protodorvillea kefersteinii* sind näher mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppe ist unter 50. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, sind die Oeononidae die Schwestergruppe der Gruppe, die die Eunicidae, Onuphidae, *Schistomeringos rudolphi* und *Protodorvillea kefersteinii* umfasst. Es folgen die Lumbrineridae und an basaler Position die beiden *Ophryotrocha*-Arten.

### 3.3.3.3 Bayes'sche Analyse

Der 50%-Konsensusbaum der Bayes'schen Analyse besitzt an der Basis eine große polytome Verzweigung, dieses zeigt deutlich die nicht konfliktfreie Auflösung des Datensatzes (Abb. 17).

Nur sehr wenige Gruppen werden durch „posterior probabilities“ über 0,5 unterstützt.

Die Monophylie der Gattung *Trilobodrilus* wird mit einer „posterior probability“ von 0,62 unterstützt. Ansonsten sind die Dinophilidae Teil der basalen Polytomie. Eine nähere Verwandtschaft zu Taxa der Eunicida oder *Protodriloides chaetifer* konnte somit auch nicht gezeigt werden.



**Abb. 17:** 50%-Konsensusbaum der 20000 Bäume im Gleichgewicht der Bayes'schen Untersuchung der CO I (kein Burnin). Nur „posterior probabilities“ über 0,5 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt.



Die Monophylie der Eunicida wird in dieser Analyse ebenfalls nicht ermittelt. Einzig die Monophylie der Eunicidae mit einer „posterior probability“ von 0,86, die Monophylie der beiden *Ophryotrocha*-Arten mit einer „posterior probability“ von 0,99 und die nahe Verwandtschaft von *Lumbrineris funchalensis* und *Lumbrineris latreilli* mit einer „posterior probability“ von 0,70 werden unterstützt. Weitere Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Eunicida werden nicht unterstützt von dem Datensatz der CO I.

#### 3.3.3.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen

In der Parsimonie-Analyse ergibt der KH-Test einen Wert von 0,8177 und der Tempelton-Test einen von 0,8289 bei dem Vergleich, ob die Dinophilidae ein Subtaxon der Eunicida sind (Tabelle 12). Die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae wird nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 18,2% bzw. 17,1% zugunsten der alternativen Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae abgelehnt.

Der Vergleich der drei Hypothesen, Monophylie der Eunicida mit (= B) und ohne Dinophilidae (= A) bzw. Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“ (= C), mit der besten Lösung zeigt, dass aufgrund sowohl des KH- als auch des Tempelton-Tests keine der Hypothesen signifikant abgelehnt werden. Alle Werte sind größer als 0,05 und die Wahrscheinlichkeit der Ablehnung ist somit kleiner als 95%. Allerdings wird in beiden Tests das deutlich beste Ergebnis mit der geringsten Ablehnungswahrscheinlichkeit für die Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erreicht.

In der ML-Analyse resultiert der KH-Test der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae in einem Wert von 0,927. Diese Analyse ist die einzige, die die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae leicht favorisiert und die alternative Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 7,3% ablehnt.

Der SH-Test zum Vergleich der besten Lösung mit den drei untersuchten Hypothesen resultiert ebenfalls in einer nicht signifikanten Ablehnung, da die Werte größer als 0,05 sind. In dieser Analyse, wiederum als einzige, wird das deutlich beste Ergebnis mit der geringsten Ablehnungswahrscheinlichkeit für die Hypothese der Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“ erreicht.

**Tabelle 12:** Nicht - parametrische Signifikanztests für die Unterstützung verschiedener Hypothesen durch den Datensatz der CO I:

**A** = Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,  
**B** = Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae,  
**C** = Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“,  
**D** = bestes Ergebnis der phylogenetischen Analyse.  
n. a. = nicht angewendet

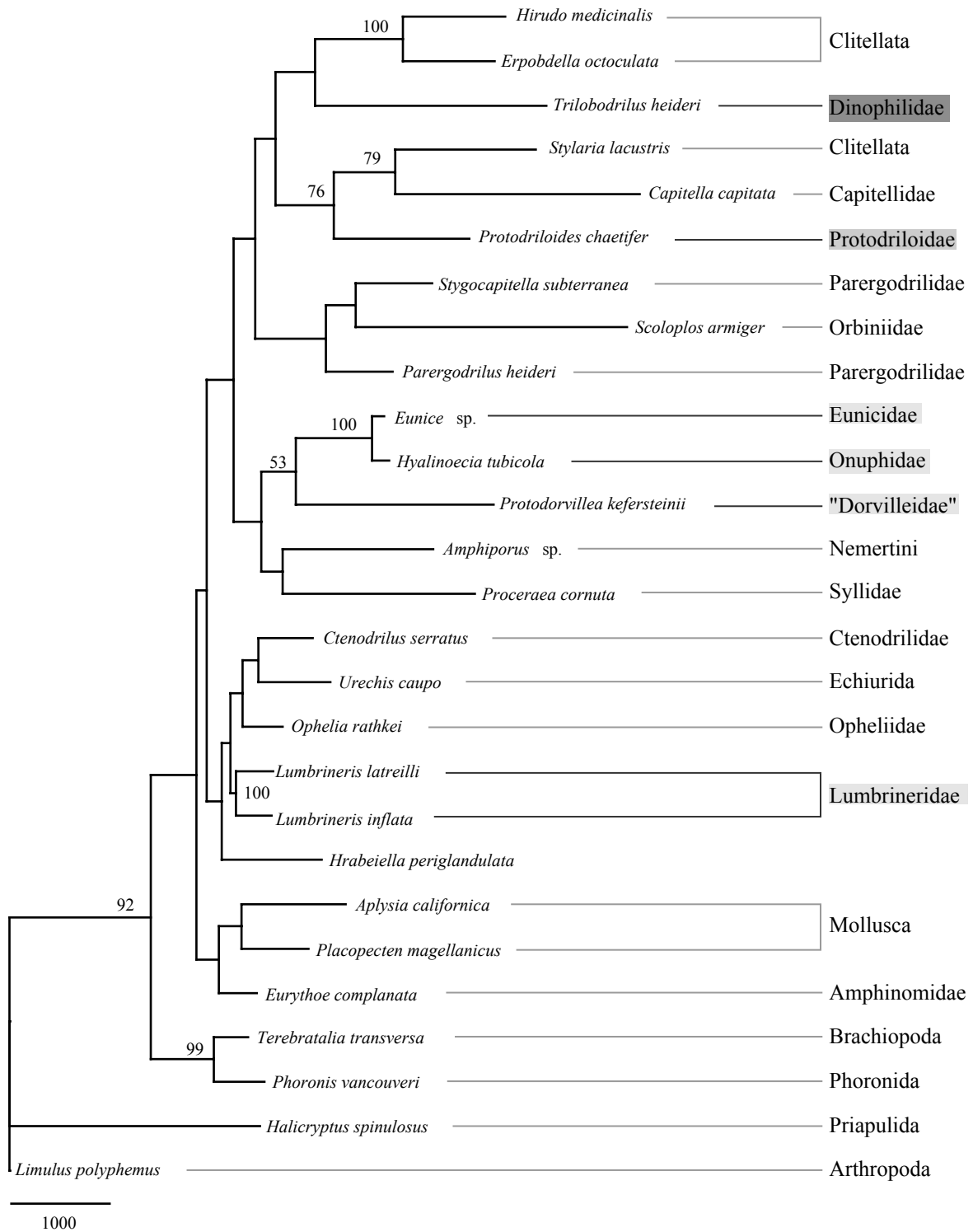
| gegeneinander getestete Hypothesen |           | Parsimonie |                | gegeneinander getestete Hypothesen |        | Maximum Likelihood |            |   |            |       |       |
|------------------------------------|-----------|------------|----------------|------------------------------------|--------|--------------------|------------|---|------------|-------|-------|
| Baumlänge                          | Baumlänge | KH-Test    | Tempelton-Test | -ln L                              | -ln L  | KH-Test            | SH-Test    |   |            |       |       |
| A                                  | 3563      | B          | 3569           | 0,8177                             | 0,8289 | A                  | 3168,37817 | B | 3167,59721 | 0,927 | n. a. |
| A                                  | 3563      | D          | 3553           | 0,6125                             | 0,6533 | A                  | 3168,37817 | D | 3155,05322 | n. a. | 0,345 |
| B                                  | 3569      | D          | 3553           | 0,4140                             | 0,4273 | B                  | 3167,59721 | D | 3155,05322 | n. a. | 0,392 |
| C                                  | 3581      | D          | 3553           | 0,3237                             | 0,2715 | C                  | 3164,25497 | D | 3155,05322 | n. a. | 0,502 |

### 3.3.4 18S- und 28S-rDNA

#### 3.3.4.1 Generalisierte Parsimonie

Von den 3270 Positionen, die in die Analyse eingegangen sind, sind 1801 Positionen (55,1%) konstant, 525 variable Positionen (16,1%) in der Parsimonie-Analyse nicht informativ und 944 Positionen (28,8%) informativ. Der sparsamste Baum besitzt eine Länge von 34899. Der Konsistenz-Index der besten Lösungen ist 0,5424 und unter Ausschluss der nicht informativen Positionen 0,4170. Der Retentionsindex ist 0,3287 und somit der Skalierte Konsistenz-Index 0,1783.

Im Phylogramm der generalisierten Parsimonie-Analyse sind nur wenige der Verzweigungspunkte durch BS-Werte über 50 unterstützt (Abb. 18). Allerdings unterstützt der kombinierte Datensatz von 18S- und 28S-rDNA eine Monophylie sowohl der Mollusca (mit einem BS-Wert unter 50) als auch von Brachiopoda und Phoronida (mit einem BS-Wert von 99). Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die in dieser Analyse nicht monophyletischen Clitellata. Der BS-Wert dieses Verwandtschaftsverhältnisses ist allerdings unter 50. Der Clitellat *Stylaria lacustris* ist näher mit *Capitella capitata* und *Protodriloides chaetifer* verwandt, dieses wird durch BS-Werte von 79 bzw. 76 gestützt. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, sind die Dinophilidae nächst verwandt zu den Eunicidae, Onuphidae und *Protodorvillea kefersteinii*.



**Abb. 18:** Das Phylogramm der Parsimonie-Analyse der 18S- und 28S-rDNA. Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die Anzahl der Transformationsschritte an. Konsistenz-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,4170; Homoplasie-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,5830; Retentionsindex = 0,3287; Skalierter Konsistenz-Index = 0,1783. **Baumlänge = 34899.**

Die Monophylie der Eunicida wird durch diese Analyse nicht bestätigt. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteinii*

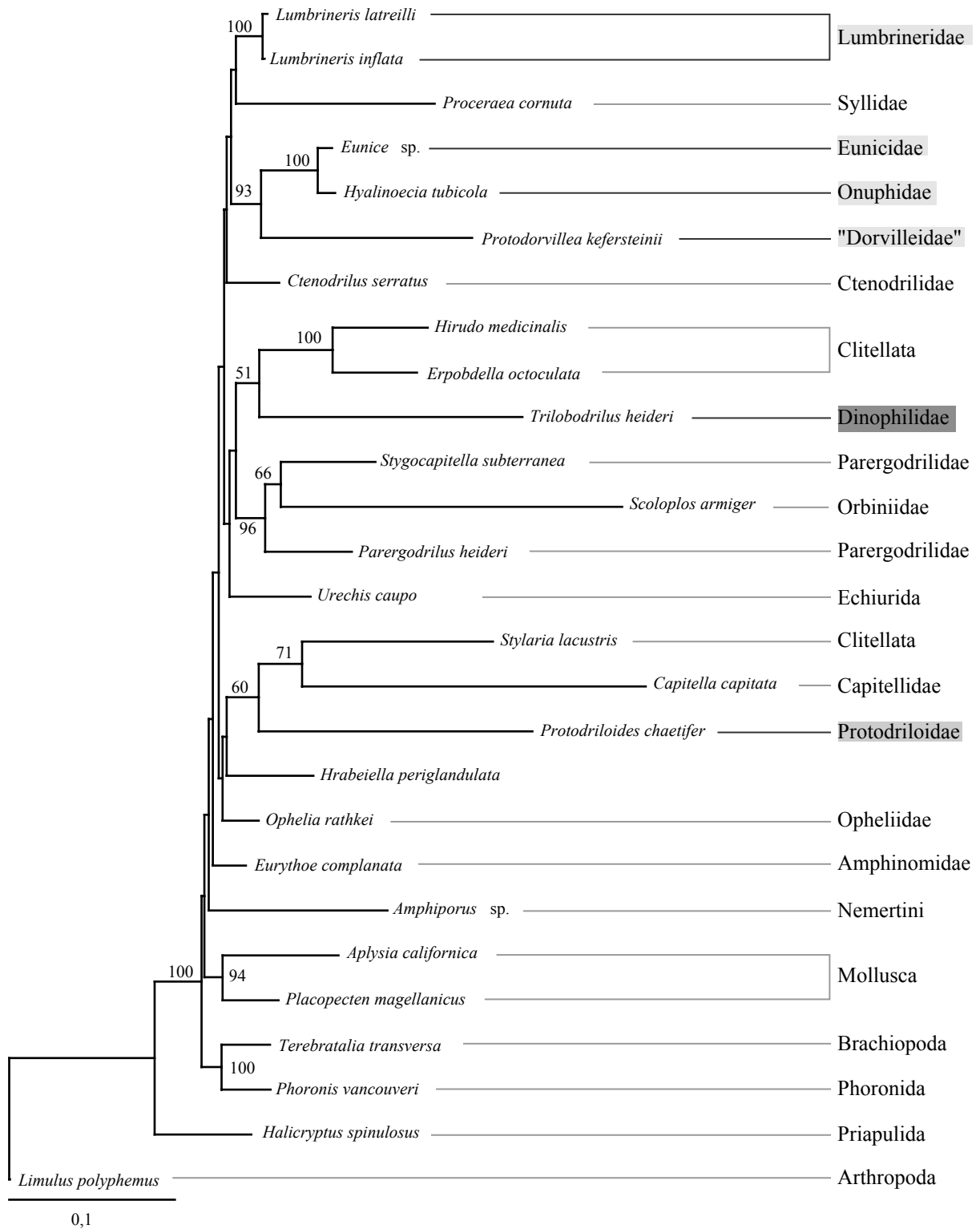
ist in dieser Analyse nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist 53. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, wird ebenfalls eine nahe Verwandtschaft von *Protodorvillea kefersteinii* mit den Eunicidae und Onuphidae unterstützt. Die Schwestergruppe sind die Lumbrineridae.

#### 3.3.4.2 Maximum Likelihood

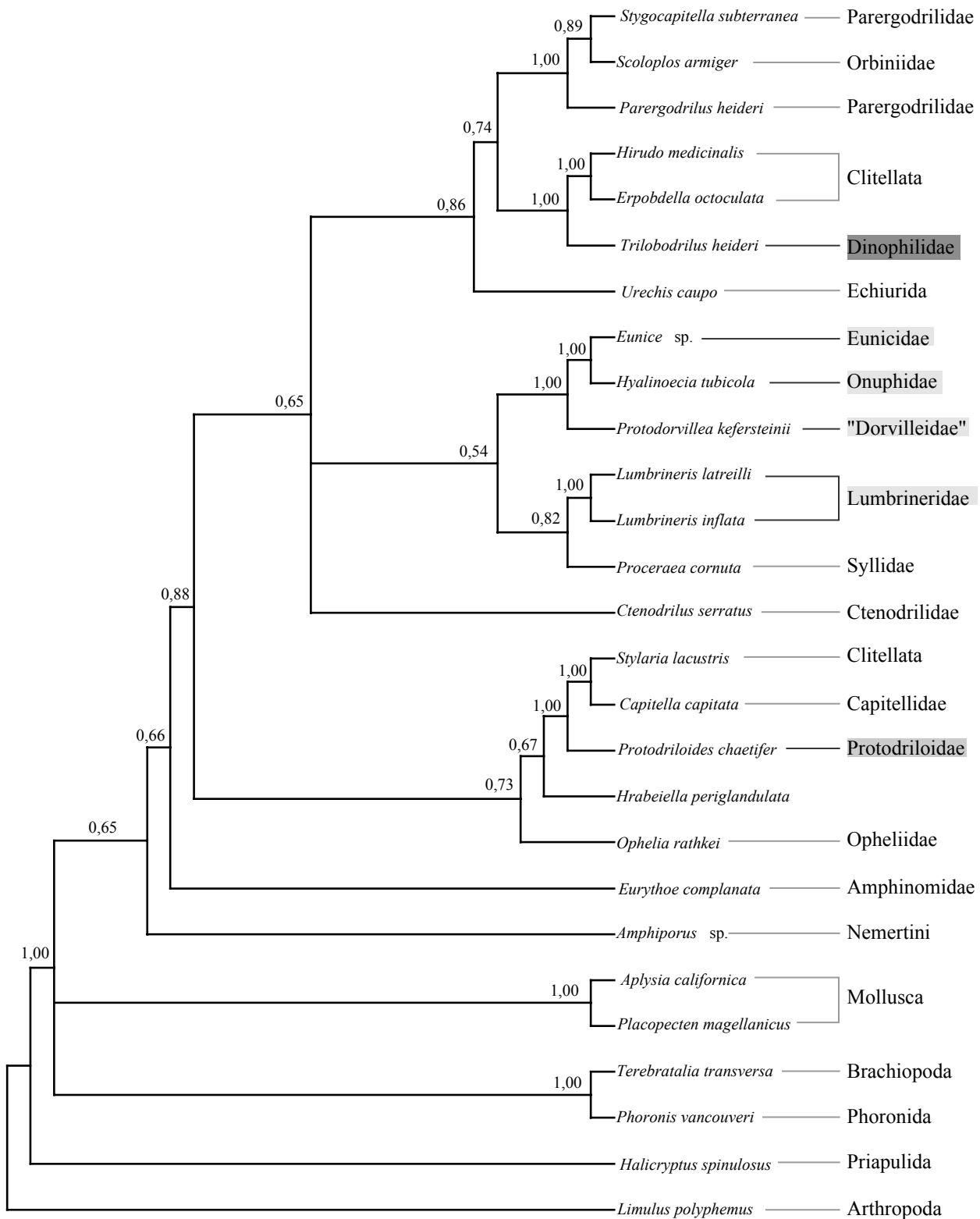
Die beste Lösung in der ML-Analyse hat die Wahrscheinlichkeit  $-\ln L = 24717,58444$ . Das Phylogramm der ML-Analyse besitzt an der Basis nur sehr kurze Verzweigungen. Nur wenige Verzweigungen werden mit BS-Werten über 50 unterstützt (Abb. 19). Die Analyse unterstützt eine Monophylie der Annelida (inklusive der Echiurida). Allerdings ist der BS-Wert unter 50. Die Monophylie der Mollusca mit einem BS-Wert von 94 sowie die nahe Verwandtschaft von Brachiopoda und Phoronida mit einem BS-Wert von 100 wird unterstützt.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die auch in dieser Analyse nicht monophyletischen Clitellata. Der BS-Wert dieser Gruppe ist mit 51 gering. Der Clitellat *Stylaria lacustris* ist näher mit *Capitella capitata* und *Protodriloides chaetifer* verwandt. Die Unterstützung durch die BS-Werte ist 71 bzw. 60. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, sind die Dinophilidae die Schwestergruppe aller anderen Taxa der Eunicida.

Die Eunicida sind in dieser ML-Analyse paraphyletisch in Bezug auf den Sylliden *Proceraea cornuta*. Der BS-Wert für diese Gruppe ist unter 50. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteinii* ist in dieser Analyse nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist 93. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, wird ebenfalls eine nahe Verwandtschaft von *Protodorvillea kefersteinii* mit den Eunicidae und Onuphidae unterstützt. Die Schwestergruppe sind die Lumbrineridae.



**Abb. 19:** Das Phylogramm der Maximum Likelihood-Analyse der 18S- und 28S-rDNA. (Substitutionsmodell: Nukleotidfrequenz von: A = 0,2565; C = 0,2247; G = 0,2929; T = 0,2259; Ratenmatrix = 0,8664 2,0124 1,0242 0,7096 4,4512 1,0000; Anteil invarianter Positionen: 0,3251; Gestaltsparemetri  $\alpha$ : 0,6154). Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die evolutionäre Distanz in Substitutionen pro Position. **-ln L = 24717,58444.**



**Abb. 20:** 50%-Konsensusbaum der 19998 Bäume im Gleichgewicht der Bayes'schen Untersuchung der 18S- und 28S-rDNA (Burnin = 2). Nur „posterior probabilities“ über 0,5 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt.

### 3.3.4.3 Bayes'sche Analyse

Der 50%-Konsensusbaum der Bayes'schen Analyse ist zwar sehr gut aufgelöst, die basalen Verzweigungen besitzen aber keine „posterior probabilities“ über 0,9 (Abb. 20). Die einzige Ausnahme ist die „posterior probability“ der nahen Verwandtschaft von Priapulida und Arthropoda mit 1,00. Auch durch die Bayes'sche Analyse wird eine Monophylie sowohl der Annelida (inklusive der Echiurida) mit einer „posterior probability“ von 0,66 als auch der Mollusca mit einer „posterior probability“ von 1,00 unterstützt. Des Weiteren wird die nahe Verwandtschaft von Brachiopoda und Phoronida mit einer „posterior probability“ von 1,00 rekonstruiert.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind die auch in dieser Analyse nicht monophyletischen Clitellata. Dieses wird mit einer „posterior probability“ von 1,00 gestützt. Der Clitellat *Stylaria lacustris* ist näher mit *Capitella capitata* und *Protodriloides chaetifer* verwandt. Dieses wird mit „posterior probabilities“ von 1,00 gestützt.

Auch in dieser Analyse sind die Eunicida paraphyletisch in Bezug auf den Sylliden *Proceraea cornuta*. Die „posterior probability“ dieser Gruppe beträgt 0,54. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit einer „posterior probability“ von 1,00 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteinii* ist erneut nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Die „posterior probability“ für diese Gruppierung ist 1,00.

### 3.3.4.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen

Da verschiedene Verwandtschaftshypothesen für die Dinophilidae diskutiert werden, wurde getestet, ob bestimmte Hypothesen gegenüber anderen Hypothesen oder der besten Lösung signifikant abgelehnt werden können. In allen Analysen wurden folgende Hypothesen getestet:

- A) Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,
- B) Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae und
- C) Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“.

In der Parsimonie-Analyse ergibt der Vergleich der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae im KH-Test einen Wert von 0,1025 und im Tempelton-Test von 0,1892 (Tabelle 13). Damit wird die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae mit einer Wahrscheinlichkeit von 89,8% bzw. 81,1% zugunsten der alternativen

Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae abgelehnt. Die Ablehnung ist damit zwar hoch, aber nicht signifikant.

Der Vergleich der drei Hypothesen mit der besten Lösung zeigt, dass aufgrund des KH-Tests und des Tempelton-Tests nur die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit den Dinophiliden signifikant abgelehnt werden kann. Die Werte sind mit 0,0345 und 0,0339 kleiner als 0,05 und die Wahrscheinlichkeit der Ablehnung ist somit größer als 95%. Die beiden anderen Hypothesen haben Werte, die größer als 0,05 sind, und können somit nicht signifikant abgelehnt werden. Allerdings sind die Ergebnisse, die eine nahe Verwandtschaft der Dinophilidae mit den ehemaligen „Archiannelida“ erzwingen, deutlich geringer als die Ergebnisse, die eine Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae favorisieren.

In der ML-Analyse resultiert der KH-Test der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae in einem Wert von 0,346. Die Ablehnungswahrscheinlichkeit für die Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae ist somit nur 65,4%.

Der SH-Test zum Vergleich der besten Lösung mit den drei untersuchten Hypothesen resultiert ebenfalls in einer nicht signifikanten Ablehnung, da die Werte größer als 0,05 sind. Allerdings lässt sich wiederum ein Unterschied in der Ablehnungswahrscheinlichkeit zwischen der Hypothese der Eunicida ohne Dinophilidae und den beiden anderen Hypothesen feststellen.

**Tabelle 13:** Nicht - parametrische Signifikanztests für die Unterstützung verschiedener Hypothesen durch den Datensatz der 18S- und 28S-rDNA:

**A** = Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,

**B** = Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae,

**C** = Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“,

**D** = bestes Ergebnis der phylogenetischen Analyse.

n. a. = nicht angewendet

| gegeneinander getestete Hypothesen |                | Parsimonie |                | gegeneinander getestete Hypothesen |                     | Maximum Likelihood |         |
|------------------------------------|----------------|------------|----------------|------------------------------------|---------------------|--------------------|---------|
| Baumlänge                          | Baumlänge      | KH-Test    | Tempelton-Test | -ln L                              | -ln L               | KH-Test            | SH-Test |
| <b>A</b> 34907                     | <b>B</b> 35151 | 0,1025     | 0,1892         | <b>A</b> 24725,1323                | <b>B</b> 24743,0513 | 0,346              | n. a.   |
| <b>A</b> 34907                     | <b>D</b> 34899 | 0,9476     | 0,4671         | <b>A</b> 24725,1323                | <b>D</b> 24717,5844 | n. a.              | 0,502   |
| <b>B</b> 35151                     | <b>D</b> 34899 | 0,0345     | 0,0339         | <b>B</b> 24743,0513                | <b>D</b> 24717,5844 | n. a.              | 0,235   |
| <b>C</b> 35114                     | <b>D</b> 34899 | 0,1491     | 0,0895         | <b>C</b> 24738,3868                | <b>D</b> 24717,5844 | n. a.              | 0,317   |



### 3.3.5 18S-rDNA, 28S-rDNA und CO I

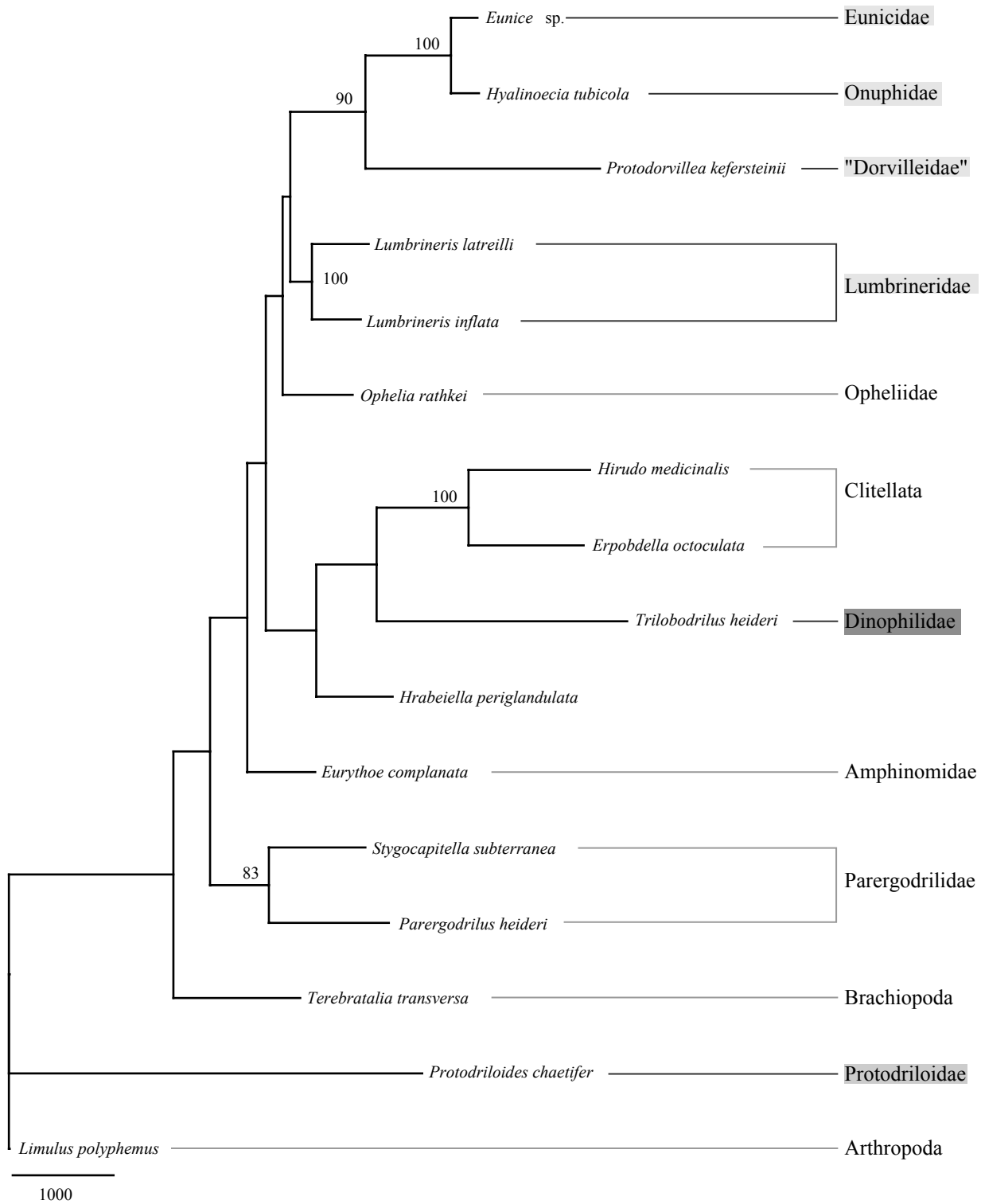
#### 3.3.5.1 Generalisierte Parsimonie

Von den 3556 Positionen, die in die Analyse eingegangen sind, sind 2348 Positionen (66,0%) konstant, 511 variable Positionen (14,4%) in der Parsimonie-Analyse nicht informativ und 697 Positionen (19,6%) informativ. Der sparsamste Baum hat eine Länge von 21912. Der Konsistenz-Index der besten Lösungen ist 0,6371 und unter Ausschluss der nicht informativen Positionen 0,5082. Der Retentionsindex ist 0,4008 und somit der Skalierte Konsistenz-Index 0,2553.

Im Phylogramm der generalisierten Parsimonie-Analyse sind nur wenige der Verzweigungspunkte durch BS-Werte über 50 unterstützt (Abb. 21). Die Monophylie der Annelida wird durch den kombinierten Datensatz aller drei Gene nicht unterstützt, da *Protodriloides chaetifer* mit *Terebratalia transversa* und *Limulus polyphemus* zusammengruppiert. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist aber unter 50.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind in dieser Analyse die Clitellata. Der BS-Wert dieses Verwandtschaftsverhältnisses ist allerdings unter 50. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, sind die Dinophilidae die Schwestergruppe von Eunicidae, Onuphidae und *Protodorvillea kefersteinii*.

Die Monophylie der Eunicida wird durch diese Analyse bestätigt. Der BS-Wert ist allerdings unter 50. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteinii* ist in dieser Analyse nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist 90.



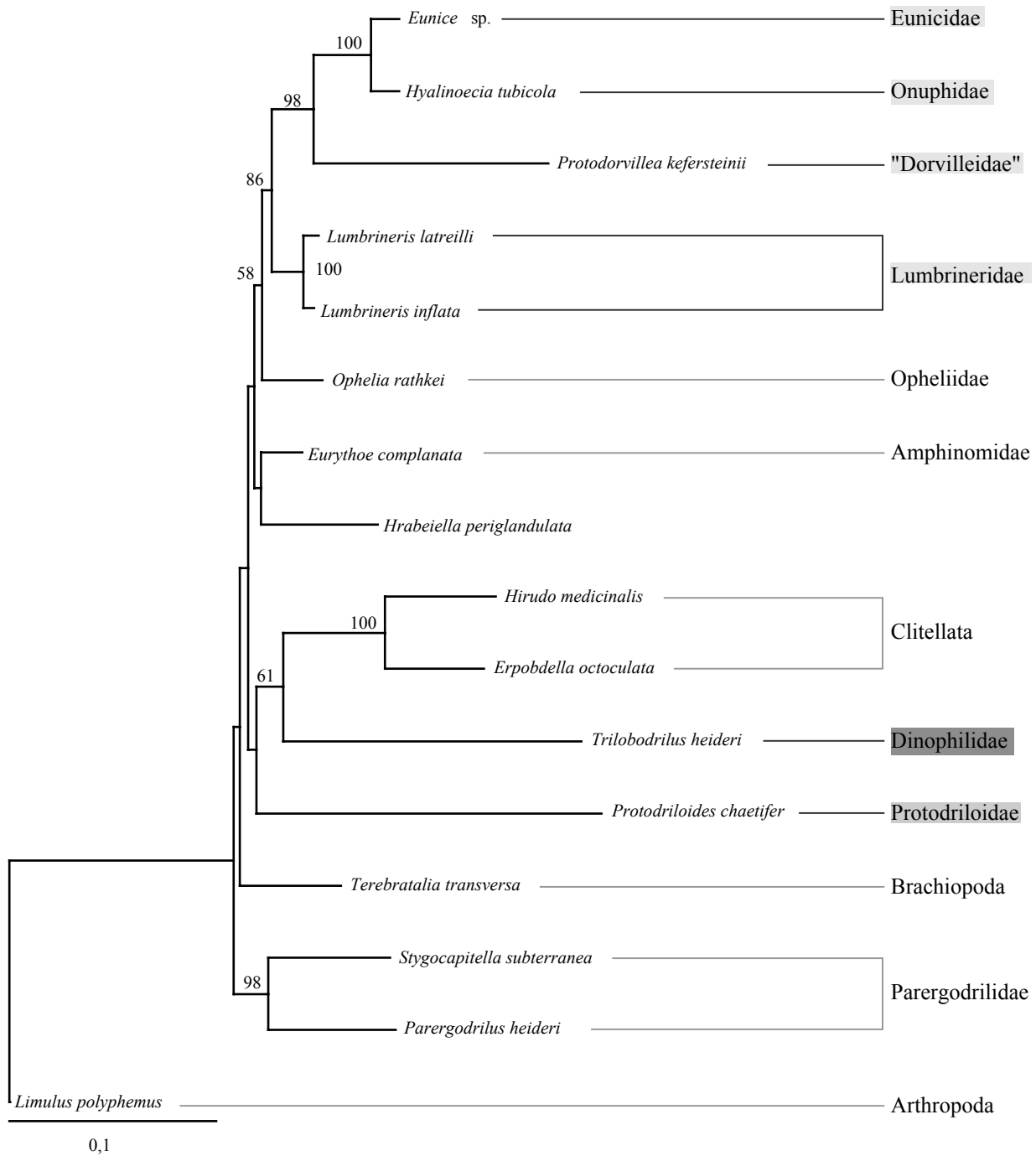
**Abb. 21:** Das Phylogramm der Parsimonie-Analyse der 18S-rDNA, 28S-rDNA und CO I. Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die Anzahl der Transformationsschritte an. Konsistenz-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,5082; Homoplasie-Index (uninformative Charaktere ausgeschlossen) = 0,4918; Retentionsindex = 0,4008; Skalierter Konsistenz-Index = 0,2553. **Baumlänge = 21912.**

### 3.3.5.2 Maximum Likelihood

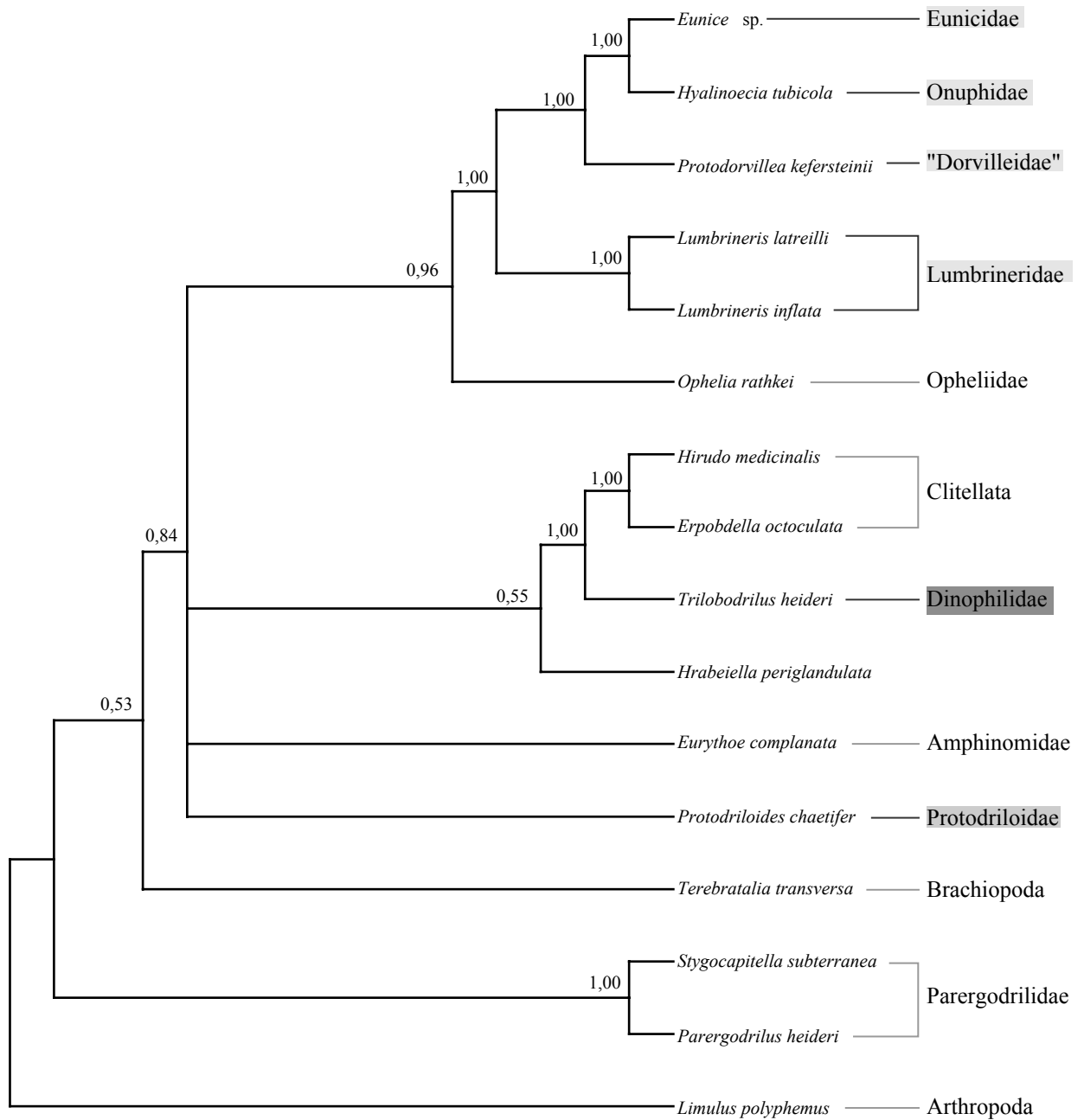
Die beste Lösung in der ML-Analyse hat die Wahrscheinlichkeit  $-\ln L = 17624,83229$ . Das Phylogramm der ML-Analyse besitzt an der Basis nur sehr kurze Verzweigungen und nur wenige Verzweigungen werden mit BS-Werten über 50 unterstützt (Abb. 22). Die Monophylie der Annelida wird durch den kombinierten Datensatz aller drei Gene nicht unterstützt, da die Parergodrilidae mit *Terebratalia transversa* und *Limulus polyphemus* zusammengruppieren. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist aber unter 50.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida kann nicht gezeigt werden. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind auch in dieser Analyse die Clitellata. Der BS-Wert dieser Gruppe ist 61. Die Schwestergruppe sind die Protodriloidae, ein Taxon der ehemaligen „Archiannelida“. Der BS-Wert ist allerdings unter 50. In der Analyse, die die Monophylie der Eunicida und Dinophilidae erzwingt, nehmen die Dinophilidae die basale Position ein und sind die Schwestergruppe der Eunicida.

Die kombinierte ML-Analyse aller drei Gene rekonstruiert ebenso wie die Parsimonie-Analyse die Monophylie der Eunicida. Der BS-Wert für diese Gruppe ist 86. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit BS-Werten von 100 unterstützt. Der Dorvilleide *Protodorvillea kefersteini* ist in dieser Analyse nahe mit den Eunicidae und Onuphidae verwandt. Der BS-Wert für diese Gruppierung ist 98.



**Abb. 22:** Das Phylogramm der Maximum Likelihood-Analyse der 18S-rDNA, 28S-rDNA und CO I. (Substitutionsmodell: Nukleotidfrequenz von: A = 0,2484; C = 0,2215; G = 0,2916; T = 0,2385; Ratenmatrix = 1,0533 2,2917 1,1609 0,7780 4,4621 1,0000; Anteil invarianter Positionen: 0,3993; Gestaltungsparameter  $\alpha$ : 0,6068). Nur BS-Werte über 50 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt. Der Maßstab zeigt die evolutionäre Distanz in Substitutionen pro Position. **-ln L = 17624,83229.**



**Abb. 23:** 50%-Konsensusbaum der 19999 Bäume im Gleichgewicht der Bayes'schen Untersuchung der 18S-rDNA, 28S-rDNA und CO I (Burnin = 1). Nur „posterior probabilities“ über 0,5 gezeigt. Eunicida-Taxa schwach grau, ehemalige "Archiannelida"-Taxa mittelgrau und Dinophilidae dunkelgrau unterlegt.

### 3.3.5.3 Bayes'sche Analyse

Der 50%-Konsensusbaum der Bayes'schen Analyse ist gut aufgelöst. Es gibt nur eine Polytomie von vier Gruppen, doch die basalen Verzweigungen besitzen keine „posterior probabilities“ über 0,9 (Abb. 23). Die Monophylie der Annelida wird durch den kombinierten Datensatz aller drei Gene nicht unterstützt, da die Parergodrilidae mit *Terebratalia transversa* und *Limulus polyphemus* zusammengruppieren. Die „posterior probability“ dieser Gruppierung ist 0,84.

Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem Taxon der Eunicida oder den ehemaligen „Archiannelida“ wird nicht unterstützt. Die Schwestergruppe der Dinophilidae sind ebenso wie in den beiden anderen Analysen die Clitellata. Dieses wird mit einer „posterior probability“ von 1,00 gestützt.

Die Monophylie der Eunicida wird durch eine „posterior probability“ von 1,00 durch die Kombination der drei Gene gestützt. Ein Schwestergruppenverhältnis der Eunicidae und Onuphidae wird genauso wie die Monophylie der Lumbrineridae mit einer „posterior probability“ von 1,00 unterstützt. Auch die nahe Verwandtschaft von *Protodorvillea kefersteinii* mit den Eunicidae und Onuphidae wird durch eine „posterior probability“ von 1,00 bestätigt.

### 3.3.5.4 Signifikanztests verschiedener Hypothesen

In der Parsimonie-Analyse ergibt der Vergleich der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit (= B) und ohne Dinophilidae (= A) im KH-Test einen Wert von 0,0378 und im Tempelton-Test von 0,0557 (Tabelle 14). Damit kann die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae durch den KH-Test signifikant abgelehnt werden. Im Tempelton-Test ist der Wert knapp größer als 0,05, so dass die Ablehnungswahrscheinlichkeit mit 94,4% zwar sehr hoch, aber nicht signifikant ist.

Da die beste Lösung mit der Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae übereinstimmt, wurden nur die beiden anderen Hypothesen, Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae (= B) und Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“ (= C), gegen die beste Lösung getestet. Dieser Vergleich ergibt für die Hypothese der Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae mit 0,0378 bzw. 0,0557 die gleichen Ergebnisse wie beim Vergleich der beiden Hypothesen. Die Hypothese der Monophylie der ehemaligen Archianneliden kann nicht signifikant abgelehnt werden, die beiden Werte sind deutlich größer als 0,05.

In der ML-Analyse resultiert der KH-Test der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae in einem Wert von 0,463. Die Ablehnungswahrscheinlichkeit für die Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae ist somit nur 53,7%.

Da auch in der ML-Analyse die beste Lösung mit der Hypothese der Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae übereinstimmt, wurde nur mit den beiden anderen Hypothesen der SH-Test gegen die beste Lösung durchgeführt. Der SH-Test ergibt Werte, die größer als 0,05 sind. Keine der beiden Hypothesen kann somit signifikant abgelehnt werden. Allerdings lässt sich ein Unterschied in der Ablehnungswahrscheinlichkeit zwischen den beiden Hypothesen feststellen.

**Tabelle 14:** Nicht - parametrische Signifikanztests für die Unterstützung verschiedener Hypothesen durch den Datensatz der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der CO I:

**A** = Monophylie der Eunicida ohne die Dinophilidae,  
**B** = Monophylie der Eunicida mit den Dinophilidae,  
**C** = Monophylie der Arten der ehemaligen „Archiannelida“,  
**D** = bestes Ergebnis der phylogenetischen Analyse.  
n. a. = nicht angewendet

|          | gegeneinander getestete Hypothesen |                | Parsimonie |                | gegeneinander getestete Hypothesen |                     | Maximum Likelihood |         |
|----------|------------------------------------|----------------|------------|----------------|------------------------------------|---------------------|--------------------|---------|
|          | Baumlänge                          | Baumlänge      | KH-Test    | Tempelton-Test | -ln L                              | -ln L               | KH-Test            | SH-Test |
| <b>A</b> | <b>21912</b>                       | <b>B 22118</b> | 0,0378     | 0,0557         | <b>A 17624,8323</b>                | <b>B 17634,1929</b> | 0,463              | n. a.   |
| <b>A</b> | <b>21912</b>                       | <b>D 21912</b> | n. a.      | n. a.          | <b>A 17624,8323</b>                | <b>D 17624,8323</b> | n. a.              | n. a.   |
| <b>B</b> | <b>22118</b>                       | <b>D 21912</b> | 0,0378     | 0,0557         | <b>B 17634,1929</b>                | <b>D 17624,8323</b> | n. a.              | 0,335   |
| <b>C</b> | <b>21966</b>                       | <b>D 21912</b> | 0,7129     | 0,6703         | <b>C 17630,4987</b>                | <b>D 17624,8323</b> | n. a.              | 0,511   |





## 4. Diskussion

### 4.1 Amplifikation und Sequenzierung der einzelnen Gene

Die Gene der 18S- sowie der 28S-rDNA sind Teil des nukleären ribosomalen RNA-Clusters. Dieser Cluster im Zellkern umfasst zwischen den beiden aufgeführten Genen noch das Gen der 5,8S-rDNA. Die Transkription der drei Gene im Zellkern erfolgt als eine Abschrift. Wobei vor der 18S-rDNA sowie hinter der 28S-rDNA Sequenzabschnitte des Genoms, die externen transkribierten Abstandshalter (= „external transcribed spacer“ oder ETS), mit abgeschrieben werden. Die drei Gene werden jeweils durch die internen transkribierten Abstandshalter (= „internal transcribed spacer“ oder ITS) von einander getrennt. Die RNA wird während des Selbstbildungsprozesses der Ribosomen so modifiziert, dass die drei rRNAs unabhängig voneinander vorliegen (Knippers 1995). Da durch die Ribosomen die Proteine der Zelle synthetisiert werden, müssen diese in großer Zahl vorhanden sein. Um genügend rRNAs bereitstellen zu können, liegt der Cluster im nukleären Genom in mehreren 100 aufeinander folgenden Kopien (= „tandem repeats“) vor (Alberts *et al.* 1990; Hillis & Dixon 1991). Dieses erleichtert die Amplifikation der Gene bei nur geringer vorhandener Gewebemenge. Allerdings könnte die erhöhte Kopienzahl auch zu einer erhöhten intra-individuellen Variabilität führen. Eine intra-individuelle Variabilität konnte bei den Sequenzen sowohl der 18S- als auch der 28S-rDNA, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, nicht festgestellt werden. Sogar zwischen den Individuen einer Art, beziehungsweise exakter innerhalb einer Population, konnten keine Unterschiede der Sequenzen gefunden werden. Nur bei der Sequenz der 18S-rDNA von *Lumbrineris funchalensis* konnte zwischen einem Individuum und drei anderen ein 0,4%iger Unterschied (7 von 1747 Positionen) festgestellt werden. Selbst bei den wesentlich variableren Sequenzabschnitten der ITS konnten nur minimale Unterschiede von weniger als 1% zwischen Individuen einer Population und keine intra-individuelle Variabilität ermittelt werden (z. B. Westheide *et al.* 2003). Dieser hohe Grad der Konservierung der Cluster innerhalb eines Individuums kann auf genetischen Mechanismen wie der Genkonversion beruhen (Alberts *et al.* 1990).

Die Cytochrome-Oxidase I (= CO I) ist ein protein-codierendes Gen des mitochondrialen Genoms. Auf der Ebene der Aminosäuren wird es im Allgemeinen als eines der am stärksten konservierten Gene dieses Genoms bei den Metazoa angesehen (Kondo *et al.* 1993; Simon *et al.* 1994; Boore & Brown 1995; Cummings *et al.* 1995). Da meistens mehrere ringförmige Genome pro Mitochondrium sowie mehrere Mitochondrien pro Zelle vorhanden sind, ist die Sequenz der

CO I ebenfalls in sehr hoher Kopienzahl im zellulären Genom vertreten. Wie bei den ribosomalen Genen erleichtert dieses die Amplifikation der Gene bei nur geringer vorhandener Gewebemenge und erhöht die Wahrscheinlichkeit einer höheren intra-individuellen Variabilität. Diese konnte bei den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen nicht nachgewiesen werden.

Trotz der hohen Anzahl an Kopien aller drei Gene im Genom, war die Erfolgsquote von Amplifikation und Sequenzierung sehr unterschiedlich zwischen den Genen. Die Sequenzen der 18S-rDNA konnten sehr erfolgreich aus dem Genom amplifiziert und sequenziert werden. Bei der 28S-rDNA, die in gleicher Kopienzahl wie die 18S-rDNA im Genom vorliegt, war die Bestimmung der Sequenz am wenigsten effektiv. Der Erfolg bei der CO I war mittelmäßig, aber deutlich höher als bei der 28S-rDNA. Entsprechende Unterschiede im Ergebnis der Bestimmung von Sequenzen unterschiedlicher Gene bei verschiedenen Arten eines Taxons sind auch bei kleineren Abschnitten der 28S-rDNA (Brown *et al.* 1999) sowie bei der CO I (pers. Mitteilungen Dr. Ralf Bastrop & Janina Jördens) festgestellt worden.

Entscheidend für den Erfolg der Amplifikation und Sequenzierung von Genen ist das Design der Primer. Die Primer sollten sich an möglichst konservative Abschnitte des Genes anlagern. Dadurch können dieselben Primer bei verschiedenen Arten benutzt werden. Die Genauigkeit mit der die Sequenzen der Primer innerhalb eines Taxons wie den Anneliden übereinstimmen, kann aber andererseits erhöht werden, wenn sie speziell auf dieses Taxon zugeschnitten werden.

Für die Bestimmung der Primer der 18S-rDNA war dieses zu Beginn der Arbeit möglich, da zu dem Zeitpunkt schon von etwa 20 Arten der verschiedensten Polychaeten Sequenzen vorlagen. Von den Genen der 28S-rDNA und CO I wurden hingegen Sequenzabschnitte verwendet, die noch nicht in phylogenetischen Analysen mit Polychaeten eingesetzt wurden, um die Eignung dieser Abschnitte in Bezug auf die Phylogenie der Polychaeten und im Speziellen der Dinophilidae zu bestimmen. Deswegen lagen nur sehr wenige Sequenzen von Polychaeten für diese beiden Abschnitte vor (siehe Sequenzen mit Zugangsnummer in Tabelle 3). Es wurden daher Primer verwendet, die entweder, im Falle der 28S-rDNA, aufgrund der Sequenzen von Vertebrata, Arthropoda und Mollusca (Hillis & Dixon 1991; pers. Mitteilung Yale Passamaneck) entwickelt wurden oder, bei der CO I, basierend auf einer Teilgruppe der Annelida entworfen wurden (Kojima *et al.* 1997). Ausgehend von den in dieser Arbeit vorgestellten Sequenzen sowie den schon vorhandenen Sequenzen kleinerer Abschnitte der 28S-rDNA von Polychaeten, sollte es nun in zukünftigen Arbeiten möglich sein, Primer für die 28S-rDNA zu entwickeln, die sich spezifischer für die Annelida eignen, um so die Erfolgsquote der versuchten Amplifikationen und Sequenzierungen zu steigern.

Bei der CO I wird das Design der Primer zusätzlich noch durch die Degeneration des genetischen Codes und die damit verbundene stark erhöhte Variabilität der dritten Position erschwert. Im Gegensatz zu den ribosomalen Genen gibt es bei protein-codierenden Genen somit keine Regionen, in denen ein kompletter Abschnitt von 20 bis 30 bp nicht variiert. Deswegen werden im Allgemeinen degenerierte Primer entworfen, die korrespondierend zur dritten Position Positionen mit variierenden Nukleotiden besitzen (siehe Tabelle 2). Dadurch ist allerdings nur eine geringe Fraktion der eingesetzten Primer absolut komplementär zu dem jeweiligen Sequenzabschnitt in einer Art oder einem Individuum. Bei zukünftigen Analysen basierend auf der CO I sollten genauso wie bei der 28S-rDNA, ausgehend von den nun vorliegenden Sequenzabschnitten für mehrere Taxa der Polychaeten, die Primer genauer entworfen werden. Es sollte aber auch in Betracht gezogen werden, für verschiedene Teilgruppen der Polychaeten verschiedene Primer zu entwerfen, so wie es schon relativ erfolgreich für die Clitellata und Siboglinidae mit zum Teil anderen Abschnitten der CO I durchgeführt wurde (Kojima *et al.* 1997; Christensen & Theisen 1998; Nylander *et al.* 1999). Dadurch könnte die Genauigkeit der degenerierten Primer für das jeweilige Taxon erhöht werden.

Allerdings hat die Amplifikation und Sequenzierung der 18S-rDNA gezeigt, dass das Design der Primer nicht allein entscheidend für den Erfolg der Bestimmung der Sequenz ist. Bei einigen Arten gelang die Amplifikation der 18S-rDNA nur mit sich überlappenden Teilstücken und/oder der sehr spezifischen HotStart-PCR mit Touchdown-Option, obwohl die Primer meistens absolut komplementär auch zu diesen Sequenzen waren. Bei der Bestimmung der Sequenz der 28S-rDNA führten diese Analyseschritte allerdings nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Auch in phylogenetischen Analysen der Mollusca waren die Amplifikation der nahezu kompletten 28S-rDNA in Teilstücken und die direkte Sequenzierung vom Amplifikat mit für Mollusca spezifischen Primern nicht sehr erfolgreich. Erst die Amplifikation über die gesamte Länge mit relativ geringen Ausbeuten des Amplifikationsproduktes und die anschließende Klonierung in einen Sequenzierungsvektor führte zu einer deutlichen Verbesserung der Ergebnisse (pers. Mitteilung Yale Passamaneck). Auch bei zukünftigen Analysen basierend auf der 28S-rDNA könnte diese Strategie die Erfolgsquote zur Bestimmung der Sequenz erhöhen.

#### **4.2 Wahl des Substitutionsmodells**

Das Grundprinzip jeder phylogenetischen Analyse sowohl bei molekularen als auch bei morphologischen Daten ist die evolutionäre Erklärung eines vorhandenen Musters an Merkmalsunterschieden (Avice 1994). Im molekularen Datensatz sind dieses die unterschiedlichen Nukleotide der einzelnen Positionen im Alignment der Sequenzen. Jede Analyse versucht, basierend auf dem jeweils zugrunde liegenden methodischen Prinzip, die Entstehung dieses Musters aus einer ursprünglichen Merkmalssequenz durch Duplikationen der Sequenzen und Transformationen von Merkmalen zu erklären. Da eine Merkmalssequenz in diesen Analysen immer mit einer operativen taxonomischen Einheit, also zum Beispiel einem Individuum, einer Population oder einer Art, verknüpft ist, kann von der evolutionären Erklärung der Merkmalsunterschiede auf die Evolution der operativen taxonomischen Einheiten extrapoliert werden (Swofford *et al.* 1996).

Die drei zurzeit am häufigsten verwendeten methodischen Prinzipien der phylogenetischen Analyse, die kladistische (auch „Parsimonie“ genannt), die wahrscheinlichkeitsbasierte sowie die distanzbasierte, setzen in dem Erklärungsprozess dichotome Verzweigungen *ad hoc* voraus und basieren, explizit oder implizit, auf einem Transformationsmodell, um die Transformationen zu erklären (Farris 1973; Felsenstein 1973; Swofford *et al.* 1996; Yang 1996a; Steel & Penny 2000; Suzuki *et al.* 2002). Ein Transformationsmodell ist unumgänglich, wenn das Muster der Merkmalsunterschiede auf evolutionärer Basis erklärt werden soll. In den Analysen basierend auf molekularen Daten handelt es sich dabei um ein Substitutionsmodell, welches die einzelnen Substitutionen bewertet. Dass der klassischen kladistischen, auch Maximum Parsimonie genannten Analyse ein Substitutionsmodell zugrunde liegt, wird von strikten Verfechtern dieses methodischen Prinzips allerdings häufig bestritten. Die expliziten Substitutionsmodelle werden als ein Schwachpunkt der beiden anderen Methoden angeführt, da angesichts einer unbegrenzt denkbaren Zahl an möglichen Modellen eine zufällige Auswahl des Modells prinzipiell nicht vermieden werden kann (z. B. Siddall & Kluge 1997; Siddall & Whiting 1999). In diesem Zusammenhang wird auch die spezifische Gewichtung von Positionen und Transformationsereignissen in der kladistischen Analyse, ein Äquivalent zu den expliziten Substitutionsmodellen in den beiden anderen Methoden, abgelehnt (Kluge 1997a & b). Dadurch würden zusätzliche *ad hoc* Annahmen zur Erklärung der Hypothese benötigt, die nach dem Sparsamkeitsprinzip (= Parsimonie) zu vermeiden sind. Allerdings bedeutet keine spezifische Gewichtung nicht, dass keine Gewichtung vorgenommen wurde. In der Maximum Parsimonie-Analyse werden die Transformationsereignisse aller Positionen gleich gewichtet. Ferner ist

dieses nicht nur eine *ad hoc* Annahme im Vergleich zu mehreren bei den spezifischen Gewichtungen, sondern es sind genauso viele, da es sich um einen Spezialfall des komplexeren Transformationsmodells handelt (Posada & Crandell 2001). Ein Unterschied besteht nur in der Anzahl der Freiheitsgrade. Die genaue Anzahl der *ad hoc* Annahmen lässt sich nicht genau bestimmen, da prinzipiell wie bei den beiden anderen Methoden auch unendliche viele Transformationsmodelle möglich sind. Dieses stellt aber kein Problem für die Analyse dar, da die Modelle die gleiche Anzahl an *ad hoc* Annahmen haben und sich nur in dem Grad ihrer Freiheit unterscheiden. Dieses macht auch deutlich, dass erkenntnistheoretisch *a priori* keine Unterscheidung zwischen den möglichen Transformationsmodellen getroffen werden kann. Die Entscheidung für ein Modell muss daher empirisch auf dem Datensatz basieren und kann sich aus praktischen Gründen nur auf die Modelle beschränken, die zurzeit berechenbar und allgemein als mögliche Transformationsmodelle akzeptiert sind (Huelsenbeck 1995; Posada & Crandall 2001). Bei der Wahl eines besonderen Modells muss dieses genau begründet werden und die Entscheidungsfindung für jeden nachvollziehbar sein.

Die Wahl des Substitutionsmodells, also in der kladistischen Analyse die Art der Gewichtung, ist keine triviale und eindeutige Angelegenheit (Wakeley 1994, 1996; Yang 1996b). Allerdings konnte für die kladistische Analyse durch den Ausschluss so genannter informativer Taxa gezeigt werden, dass bei einem stärker verrauschten Datensatz Gewichtungen nützlich sind, um die Phylogenie mit erhöhter Sicherheit wieder zu ermitteln (Milinkovitch *et al.* 1996). Gewichtungen bei molekularen Daten sind angebracht, wenn entweder ein Substitutionstyp gesättigt ist oder deutliche Unterschiede zwischen Substitutionstypen oder Sequenzbereichen bestehen. Der Ausschluss von informativen Taxa hat des Weiteren gezeigt, dass die optimalen Gewichtungen sich direkt auf den Datensatz beziehen sollten und nicht auf zufällig gewählten Gewichtungsverhältnissen (Milinkovitch *et al.* 1996). Eine vergleichende Analyse von zwei spezifischen Gewichtungen in der Parsimonie-Analyse mit der gleichgewichteten Maximum-Parsimonie-Analyse, in Bezug auf die 18S-rDNA und die Phylogenie der Polychaeten, hat gezeigt, dass der skalierte Konsistenz-Index besser ist je adäquater die Gewichtungen den zugrunde liegenden Datensatz wiedergeben (Struck *et al.* 2003). Diese Untersuchungen und die allgemeinen Überlegungen weisen eindeutig daraufhin, dass jede Art von Gewichtung vom Datensatz belegt werden muss. Häufig wird die Maximum Parsimonie-Analyse ohne Beleg durch den Datensatz durchgeführt mit der Anmerkung, dass eine Unterstützung durch den Datensatz nur für spezifische Gewichtungen erfolgen muss. So schließen zum Beispiel Rota *et al.* (2001) aus der vermuteten „explosiven Radiation“ der Annelida, dass diese spezifische Gewichtungen nicht rechtfertigen würde. Diese Rechtfertigung kann aber nie wie oben

ausgeführt *a priori*, sondern nur empirisch erfolgen. Auch für die anderen Analysen, vor allem bei einer Variation der Substitutionsraten entlang der Verzweigungen, zeigen empirische Untersuchungen, dass phylogenetische Analysen die wirkliche Phylogenie wesentlich seltener rekonstruieren, wenn nicht ein optimales Substitutionsmodell gewählt wurde (Felsenstein 1978; Huelsenbeck & Hillis 1993; Huelsenbeck 1995; Bruno & Halpern 1999; Takezaki & Gojoboro 1999; Philippe & Germot 2000).

In dieser Arbeit wurden daher vor den phylogenetischen Analysen die Datensätze genauer untersucht. In allen drei Genen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Variabilitätsbereichen sowohl bei den Substitutionsraten als auch bei den Basenfrequenzen und die Bereiche mit der niedrigsten und höchsten Variabilität weichen deutlich von den allgemeinen mittleren Substitutionsraten ab. So mutieren Positionen des niedrigsten Variabilitätsbereiches der 18S-rDNA mit einer etwa 86% geringeren Wahrscheinlichkeit als aufgrund der allgemeinen Mutationsrate zu erwarten wäre. Umgekehrt ist die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation in den beiden Bereichen der höchsten Variabilität etwa 100% höher. Diese Bereiche zeigen deutliche Unterschiede zur allgemeinen Mutationsrate und es handelt sich nicht um marginale Bereiche im Alignment, da beide Bereiche je etwa 25% und somit zusammen die Hälfte aller Positionen in der phylogenetischen Analyse umfassen. Auch bei den beiden anderen Genen weichen prozentual ähnlich viele Positionen deutlich von den mittleren Raten des gesamten Genes ab. Auch zwischen den einzelnen Substitutionsraten können diese deutlichen Unterschiede gezeigt werden. Wiederum bei der 18S-rDNA ist die höchste Rate etwa 100mal höher und somit auch 100mal wahrscheinlicher als die niedrigste Rate. Bei den Basenfrequenzen lässt sich bei der 18S-rDNA eine Schiefelage zugunsten von weder G und C noch A und T zeigen. Bei der 28S-rDNA kann mit steigender Variabilität auch eine steigende Schiefelage zugunsten des GC-Gehaltes nachgewiesen werden. Bei der CO I hingegen ist eine Schiefelage zugunsten von A und T an der zweiten und dritten Position feststellbar.

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend für alle drei Gene, dass jeweils bei der Wahl des Substitutionsmodells die Ratenheterogenität über die Positionen sowie zwischen den Substitutionen adäquat berücksichtigt werden muss. Sowohl die Ratenheterogenität über die Positionen als auch die Unterschiede zwischen den Substitutionen sind für alle drei Gene innerhalb der Metazoa schon länger bekannt (z. B. Nylander *et al.* 1999, Van de Peer *et al.* 2000; Giribet 2002). In den beiden wahrscheinlichkeitsbasierten Analysen (Maximum Likelihood und Bayes'sche Analyse) wurden von den Programmen Modeltest bzw. MrModeltest dementsprechend für die Analysen die Modelle mit den meisten Freiheitsgraden, das Substitutionsmodell nach Hasegawa *et al.* (1985) bzw. das „general time reversible“-Modell

jeweils mit einer  $\Gamma$ -Verteilung und einem Anteil invarianter Positionen, als optimal ermittelt. In der Parsimonie-Analyse wurde ein generalisierter Ansatz mit Gewichtungen basierend auf den Transitions- und Transversionsraten in den verschiedenen Variabilitätsbereichen gewählt (Swofford *et al.* 1996). Die Wahl eines einfacheren Modells, wie zum einen nach Jukes & Cantor (1969) und zum anderen die Maximum Parsimonie mit einer Homogenität der Raten über alle Positionen, würde die Wahrscheinlichkeit für fehlgeleitete Ergebnisse erhöhen (Struck *et al.* 2002b). Die Wahrscheinlichkeit für Homoplasien ist positiv proportional zu der Substitutionsrate, da die möglichen Merkmalszustände für jede Position auf vier begrenzt sind. Die falsche Annahme einer Ratenhomogenität in Falle einer zu bevorzugenden Heterogenität führt mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zu Gruppen, die vor allem auf homoplastischen Merkmalen beruhen. Das konkurrierende Signal in konservativeren Bereichen würde überlagert, da diese Mutationsereignisse wesentlich unwahrscheinlicher, zum Teil um das 100fache, und somit seltener sind. Aber gerade bei molekularen Daten ist der gemeinsame Ursprung des gleichen Musters aufgrund der geringeren Häufigkeit wesentlich gesicherter.

Sehr häufig wird bei protein-codierenden Genen wie der CO I anstelle der Nukleotidsequenz die übersetzte Sequenz der Aminosäuren verwendet, da diese meistens konservativer ist (z. B. Nylander *et al.* 1999). In den kombinierten Analysen wäre somit aber nur die gleichgewichtete Maximum Parsimonie-Analyse möglich gewesen. Es gibt keine Möglichkeit plausible und aus dem Datensatz abgeleitete Gewichtungsschemata zu entwerfen. Diese müssten die Unterschiede zum einen innerhalb und zwischen den ribosomalen Genen auf der Ebene der Nukleotidsequenz und zum anderen zu den Veränderungen auf der Ebene der Aminosäuresequenz der CO I adäquat berücksichtigen. Deswegen wurde auch bei der CO I in dieser Arbeit nur die Nukleotidsequenz verwendet. Durch die unterschiedlichen Gewichtungen der Positionen wurde außerdem die Variation auf der Ebene der Aminosäuren angenähert in die Analyse miteinbezogen, da diese Gewichtungen größtenteils auf die Degeneration des genetischen Codes und somit auf die Translation in die Aminosäuresequenz zurückführbar sind (Simon *et al.* 1994). Des Weiteren sind wahrscheinlichkeitsbasierte Analysen zurzeit nicht möglich, da die Programme ein für den gesamten Datensatz allgemein gültiges Substitutionsmodell, basierend entweder auf Nukleotid- oder auf Aminosäurenveränderungen, benötigen.

### **4.3 Vergleich der einzelnen Gene sowie deren Kombination**

Die drei in dieser Untersuchung verwendeten Gene der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der CO I zeichnen sich durch Bereiche unterschiedlichster Variabilität aus (Nylander *et al.* 1999; Van de Peer *et al.* 2000; Giribet 2002). Die Untersuchungen vor den phylogenetischen Analysen der einzelnen Gene geben dieses ebenfalls sehr deutlich wieder. So ist die allgemeine Mutationsrate der dritten Positionen der CO I mit 54,8% wesentlich höher als die der zweiten mit 10,0%. Auch bei den beiden anderen Genen zeigen sich diese deutlichen Unterschiede mit 17,8% zu 1,2% bzw. 38,5% zu 4,0%. Diese Variabilität ermöglicht die phylogenetische Analyse sowohl von eher rezenten als auch relativ alten Speziationseignissen. Da die Dinophilidae durch Fossilien nicht belegt sind und somit der Zeitpunkt ihrer Entstehung nicht abgeschätzt werden kann, ist dieses für die Fragestellung vorteilhaft. Der Vorteil ist auch gegeben, wenn die Dinophilidae ein Taxon der Eunicida sind, da fast alle „Familien“ der Eunicida oder deren direkte Vorfahren durch Fossilienfunde seit Beginn des frühen Ordoviziums (vor ca. 500 Mio. Jahren) belegt sind (Kielan-Jaworowska 1966; Kozur 1970; Wolf 1980; Orensanz 1990). Die phylogenetische Evolution der Dinophilidae kann daher in jedem Fall sowohl ein eher rezentes als auch ein relativ altes Ereignis sein.

Die Datensätze der 18S- und der 28S-rDNA sind sich im Allgemeinen nicht nur in der unterschiedlichen Variabilität sehr ähnlich. Auch in der Entwicklung der einzelnen Substitutionsraten und somit auch der Transitions- und Transversionsraten und deren Sättigung über die verschiedenen Variabilitätsbereiche gleichen sie sich. So können in beiden Genen nur leichte Sättigungen der Transitionen sowie in den niedrig variablen Bereichen höhere Transitions- wie Transversionsraten gezeigt werden. Dieses entspricht der allgemeinen Beobachtung, dass Transversionen seltener sind als Transitionen (Simon *et al.* 1994; Milinkovitch *et al.* 1996; Swofford *et al.* 1996; Siddall & Whiting, 1999). Diese Ähnlichkeit kann zum einen auf der gemeinsamen Evolution der beiden Gene im ribosomalen Cluster durch Genkonversion (Alberts *et al.* 1990) und zum anderen auf der vergleichbaren strukturellen Funktion der beiden Gene im Ribosom (Knippers 1995) beruhen. Allerdings ist die 28S-rDNA variabler als die 18S-rDNA. Der Anteil an Positionen im Alignment, die nicht sicher homologisiert werden können, ist bei der 28S-rDNA mit 43,1% größer als bei der 18S-rDNA mit 37%, obwohl in den Datensatz der 18S-rDNA mehr als sechsmal so viele OTUs eingegangen sind. Die Substitutionsraten der 28S-rDNA und somit auch die anderen Raten sind durchweg höher als bei der 18S-rDNA. Dieses mündet aber nicht in einer stärkeren Sättigung, wie im Allgemeinen angenommen wird (Friedlander *et al.* 1994; Meyer 1994; Allard & Carpenter 1996;



Aguinaldo *et al* 1997). Die Methode, die Sättigung über die allgemeine Mutationsrate zu bestimmen, führt somit zu falschen Einschätzungen der Sättigung (Yang 1998).

Nichtsdestotrotz bedingt die erhöhte Variabilität ein geringeres phylogenetisches Signal der 28S-rDNA mit 72,2% gegenüber der 18S-rDNA mit 75,2%. Im Datensatz der 28S-rDNA ist der Anteil, der polytome Strukturen unterstützt, erhöht. Der Unterschied im phylogenetischen Signal lässt sich auch nach den phylogenetischen Analysen deutlich machen. So werden in den BS-Analysen der 28S-rDNA in der Parsimonie-Analyse nur 16,7% bzw. in der ML-Analyse 12,5% der internen Verzweigungen mit signifikanten Werten gestützt. Bei der 18S-rDNA sind es mit 23,5% bzw. 49,4% zum Teil deutlich mehr. Dasselbe gilt für die signifikanten „posterior probabilities“ mit 41,7% der internen Verzweigungen bei der 28S-rDNA und 52,4% bei der 18S-rDNA. Dieser Unterschied ist unter anderem durch die erhöhte Variabilität der 28S-rDNA bedingt. Da aber in beiden Analysen vor allem mehr terminal liegende interne Verzweigungen und nicht basale signifikant unterstützt werden, ist der deutliche Unterschied auch auf das breitere Spektrum der Taxa der Annelida, mit meistens mehreren Arten aus relativ nah verwandten Gruppen, im Datensatz der 18S-rDNA zurückzuführen. Die phylogenetischen Analysen der 18S-rDNA wie der 28S-rDNA unterstützen also einerseits höhere taxonomische Einheiten wie „Familien“ sowie wie deren interne Phylogenie gut.

Andererseits sind die Beziehungen zwischen eben diesen höheren taxonomischen Einheiten nicht signifikant bestimmt worden. Diese Ergebnisse sind kongruent mit molekular-phylogenetischen Analysen der Annelida basierend sowohl auf der 18S-rDNA (siehe McHugh 2000 sowie Eeckhaut *et al.* 2000; Martin 2000; Van de Peer *et al.* 2000; Rota *et al.* 2001; Struck *et al.* 2002 a & b; Bleidorn *et al.* 2003) als auch der 28S-rDNA (Féral *et al.* 1994; Christensen & Theisen 1998; Brown *et al.* 1999; Rousset *et al.* 2003). Dieses wird auf eine „explosive Radiation“ der Annelida im Kambrium zurückgeführt (McHugh 2000, Giribet 2002, Struck *et al.* 2002b). Eine solche Radiation würde zu sehr schnell aufeinander folgenden Speziationen führen. So entstehen nur wenige Positionen in den einzelnen Genen, die die kurze gemeinsame Zeitspanne zweier Taxa unterstützen. Gleichzeitig ist die nachfolgende Zeitspanne mit etwa 500 Millionen Jahren sehr lang, so dass eine hohe Wahrscheinlichkeit für homoplastische Mutationen besteht, die das Signal verwaschen (Philippe *et al.* 1994; Regier & Shultz 1998).

Der Datensatz der CO I hingegen zeigt deutliche Unterschiede zu den beiden ribosomalen Genen. Die CO I ist wesentlich variabler und das Muster der Substitutionsraten über die Positionen komplexer. Während bei den beiden anderen Genen die Raten der einzelnen Transversionen niedriger sind als die der einzelnen Transitionen innerhalb eines Variabilitätsbereiches, besitzen die Transversionen A↔C und A↔T ähnliche Raten wie die

beiden Transitionen. Die beiden Transversionen  $G \leftrightarrow C$  und  $G \leftrightarrow T$  sind im Allgemeinen hingegen deutlich geringer. Dieses bedingt auch, dass die allgemeinen Transitionsraten kleiner oder gleich den allgemeinen Transversionsraten sind. Die Transversionen sind damit nicht, wie sonst üblich (Simon *et al.* 1994; Milinkovitch *et al.* 1996; Swofford *et al.* 1996; Siddall & Whiting, 1999), seltener als Transitionen, auch nicht auf der wenig variablen zweiten Position. Neben diesen sehr offensichtlichen Unterschieden gibt es zwischen den einzelnen Substitutionsraten noch weitere überraschende Differenzen, wie zum Beispiel die höchste Rate der Transversion  $C \leftrightarrow G$  an der zweiten Position. Dieses komplexe Muster der Substitutionsraten bedingt anscheinend auch, dass an der dritten Position die Transversionen und nicht die Transitionen gesättigt sind. Die Entstehung dieses Musters kann nur zum Teil auf die Degeneration des genetischen Codes zurückgeführt werden. Die Translation des genetischen Codes im Ribosom übt unterschiedlich starke Zwänge auf die relative Häufigkeit von Mutationen an den unterschiedlichen Positionen aus. Die meisten der möglichen Nukleotide der ersten und alle Nukleotide der zweiten Position bestimmen zusammen die Aminosäure, die in die wachsende Peptidkette eingebaut wird. Die Nukleotide der dritten sowie einige der ersten Position sind weniger strikt festgelegt. Substitutionen an diesen Positionen werden auch als still bezeichnet, da sie keinen Aminosäure-Austausch verursachen. Diese Positionen evolvieren meist mit einer deutlich höheren Rate (Simon *et al.* 1994). Ebenso Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer Mutation an einer bestimmten Position im Gen nimmt indirekt der jeweilige Typ der Aminosäure. Mutationen, die zum Beispiel den Einbau einer hydrophilen Aminosäure anstelle einer hydrophoben bewirken, sind meistens unwahrscheinlicher als Mutationen, die beispielsweise den Austausch zweier hydrophober Aminosäuren bedeuten. Die Häufigkeit einer Substitution kann auch davon abhängen, ob eine bestimmte tRNA für eine Aminosäure in der Zelle häufiger hergestellt und genutzt wird als die alternativen. Damit ist auch das korrespondierende Codon häufiger im Genom vertreten.

Auf die deutlich erhöhte Variabilität der CO I im Vergleich zu den beiden anderen Genen ist auch das deutlich niedrigere phylogenetische Signal mit 65,9% zurückführbar. Bei der CO I hat sich sowohl der Anteil, der polytome Strukturen unterstützt, als auch der, der sternförmige unterstützt, stark erhöht. In der phylogenetischen Analyse der CO I sind in der Parsimonie-Analyse nur 3,4% bzw. in der ML-Analyse 0% der internen Verzweigungen durch signifikante BS-Werte und nur 13,8% durch signifikante „posterior probabilities“ unterstützt. Die Ergebnisse sind damit deutlich schlechter als sowohl bei der 18S-rDNA als auch bei der 28S-rDNA. Damit ergibt sich für die „Polychaeta“ dieselbe Schlussfolgerung wie für die Clitellata, die taxonomischen Beziehungen können basierend nur auf den Sequenzen der CO I nicht aufgelöst

werden (Nylander *et al.* 1999). Selbst die Monophylie von Taxa wie den Lumbrineridae, die in den anderen Analysen und morphologisch sehr gut unterstützt sind, wird durch den Datensatz der CO I nicht unterstützt. Die Sequenz der CO I scheint somit für die Ermittlung der Phylogenie der Annelida und auch für die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung ungeeignet.

Innerhalb der Annelida führt allerdings die CO I in kombinierten Analysen zu einer Verbesserung der vorherigen Ergebnisse (Christensen & Theisen 1998; Apakupakul *et al.* 1999). Dieses kann ebenfalls für die 28S-rDNA in Kombination sowohl mit anderen Genen (Christensen & Theisen 1998; Brown *et al.* 1999) als auch mit morphologischen Daten (Rousset *et al.* 2003) nachgewiesen werden. Auch in dieser Arbeit bedingen die beiden Gene in den kombinierten Analysen eine Verbesserung der Ergebnisse. Das phylogenetische Signal steigt bei der Kombination der beiden ribosomalen Gene auf 80,5% und durch die Erweiterung um die CO I auf 86,1%. Genauso wächst der Anteil an internen Verzweigungen, die durch signifikante BS-Werte oder „posterior probabilities“ gestützt werden, deutlich an, von 16,7% in der Parsimonie-Analyse bzw. 25% in der ML-Analyse auf 23,1% bzw. 38,5% bei den BS-Werten und von 45,8% auf 61,5% bei den „posterior probabilities“. Damit ist im Bereich von 16 bis 32 OTUs ein Anstieg des prozentualen Anteils der signifikanten Werte mit steigender Zahl der Merkmale zu beobachten. Da Homoplasien nicht hierarchisch, sondern zufällig sind (Giribet 2002), sollte mit steigender Zahl der Merkmale der Grad der homoplastischen Positionen im Datensatz konstant bleiben. Die Zahl der unterstützenden Positionen, die hierarchisch sind, sollte hingegen ansteigen, so dass mit steigender Zahl der Merkmale der Unterschied zwischen phylogenetischem Signal und homoplastischem Rauschen immer größer wird (Cummings *et al.* 1995; Nixon & Carpenter 1996). Dieses scheint somit für den Bereich von 16 bis 32 OTUs in diesen Analysen gegeben. Die meisten basalen Verzweigungen der Phylogenien werden aber auch in diesen Analysen wie in den Analysen, die auf den einzelnen Genen basieren, nicht durch signifikante Werte gestützt.

Der Unterschied der Werte aus den Analysen, die nur auf der 18S-rDNA basieren, zur kombinierten Analyse aller drei Gene ist allerdings nur gering und der Anteil an signifikant unterstützenden internen Zweigen ist bei den BS-Werten in der kombinierten Analyse geringer. Im Vergleich zu den anderen Analysen ist bei der 18S-rDNA die Anzahl der OTUs mit 173 wesentlich höher. Eine Verbesserung der Auflösung der Phylogenie kann nicht nur durch zusätzliche Merkmale sondern auch durch zusätzliche Taxa erreicht werden (Lecointre *et al.* 1993; Milinkovitch *et al.* 1996; Graybeal 1998; Pollock *et al.* 2002; Zwickl & Hillis 2002). Dieses wird vor allem entscheidend, wenn sich Probleme in der Rekonstruktion der Phylogenie aufgrund der sogenannten „long branch attraction“ oder „Felsenstein zone“ ergeben (Graybeal

1998; Siddall & Whiting 1999). In der „Felsenstein zone“ gruppieren Taxa aufgrund ihrer wesentlich höheren Substitutionsraten im Vergleich zu den anderen Taxa mit niedrigen Substitutionsraten zusammen und nicht weil sie ein wirkliches Monophylum repräsentieren (Felsenstein 1978; Hendy & Penny 1989, Huelsenbeck 1997; Siddall & Whiting 1999). Besonders anfällig ist dafür die Parsimonie-Analyse, da sie extrem unterschiedliche Substitutionsraten zwischen den Taxa nicht kompensieren kann. Die anderen Methoden können diese Unterschiede besser kompensieren, allerdings können auch sie Probleme bei der Rekonstruktion in einem solchen Fall bekommen (siehe Swofford *et al.* 2001). In der Analyse basierend auf der 28S-rDNA ist eine solche „long branch attraction“ in allen Analysen gegeben. In diesen Analysen gruppieren *Protodriloides chaetifer*, *Capitella capitata* und *Stylaria lacustris* zusammen, zum Teil sogar mit signifikanten Werten. Diese Gruppierung ist kein wirkliches Monophylum, sondern ein artifizierlicher Zusammenschluss. *Stylaria lacustris* ist eindeutig ein Clitellat, deren Monophylie sowohl morphologisch (z. B. Purschke *et al.* 1993; Rouse & Fauchald 1997; Westheide 1997; Ferraguti & Erséus 1999; Westheide *et al.* 1999) als auch durch andere molekulare Marker wie der 18S-rDNA (siehe McHugh 2000, Martin 2000, Struck *et al.* 2002a & b) eindeutig belegt ist. *Stylaria lacustris* wird innerhalb der „Oligochaeta“ in die Naididae eingeordnet. Die Naididae sind sowohl aufgrund morphologischer (Erséus 1987, 1990; Ferraguti *et al.* 1999) als auch molekularer Daten (Christensen & Theisen 1998; Martin 2000) wahrscheinlich ein Subtaxon der Tubificida. Durch die Analysen der 18S-rDNA wird dieses auch in dieser Arbeit unterstützt. Auch durch die Kombination mit der 18S-rDNA und somit der Erhöhung der Anzahl der Merkmale kann diese artifizierliche Gruppierung der drei Arten nicht aufgelöst werden. Nur durch die Inkorporation zusätzlicher Taxa, die die langen Zweige unterbrechen, ist es eventuell möglich dieses Artefakt aufzulösen (Milinkovitch *et al.* 1996; Graybeal 1998).

#### **4.4 Unterschied zwischen den Bootstrap- und den „posterior probability“-Werten**

Sowohl bei der Methode des Bootstrapping als auch bei den „posterior probabilities“ wird die Unsicherheit in der phylogenetischen Analyse bestimmt und angenommen, dass die ermittelten Werte ein Maß für die Wahrscheinlichkeit sind, mit der eine Gruppe in der berechneten Phylogenie eine wirklich monophyletische Gruppe wiedergibt (Felsenstein 1985; Hillis & Bull 1993; Rannala & Young 1996; Huelsenbeck *et al.* 2002). In beiden Analysen gilt eine Unterstützung von 95% als signifikant. Die jeweilige Gruppe ist damit basierend auf dem untersuchten Datensatz ein Monophylum. Wenn beide Methoden parallel auf denselben

Datensatz angewandt werden, kann in bisher allen Veröffentlichungen beobachtet werden, dass die BS-Werte, zum Teil deutlich, geringer sind als die jeweils korrespondierenden „posterior probabilities“ (z. B. Buckley *et al.* 2002; Leaché & Reeder 2002; Whittingham *et al.* 2002; Wilcox *et al.* 2002; Bleidorn *et al.* 2003). Dieses resultiert auch immer in einem deutlich höheren Anteil an Gruppen, die durch die „posterior probabilities“ signifikant unterstützt werden. Auch in dieser Untersuchung sind die „posterior probabilities“ höher als die BS-Werte und der Anteil der Gruppen, die jeweils signifikant gestützt werden, steigt an. So sind bei der Analyse der 28S-rDNA in der Parsimonie- bzw. ML-Analyse nur 4 bzw. 3 Gruppen durch BS-Werte größer als 95% gekennzeichnet, in der Bayes'schen Analyse hingegen sind es 10 Gruppen. Der Grund für diese eindeutige Schieflage ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt (Huelsenbeck *et al.* 2002; Suzuki *et al.* 2002).

Damit die Proben in der Bayes'schen Analyse, also die Stammbäume, entsprechend der Verteilung der „posterior probabilities“ gezogen werden, muss die MCMC-Analyse im stabilen optimalen Gleichgewicht konvergieren (Huelsenbeck *et al.* 2002). Bei einer sehr ausgeprägten Wahrscheinlichkeitslandschaft mit vielen lokalen Optima wird die Wahrscheinlichkeit größer, dass die Proben nicht aus dem stabilen optimalen, sondern aus einem suboptimalen Gleichgewicht gezogen werden. Dieses führt zu einer falschen Wiedergabe der Verteilung der „posterior probabilities“. Gleichzeitig muss aber gewährleistet werden, dass bei mehreren gleichwertigen Optima in der Verteilung das stabile optimale Gleichgewicht entsprechend gemischt ist und nicht nur von einem Optimum gebildet wird. Um beides zu gewährleisten sollte im Allgemeinen eine MCMCMC-Analyse mit wenigstens vier langen Ketten und zufälligen Startbäumen durchgeführt werden, damit die Ketten in verschiedenen Regionen der Wahrscheinlichkeitslandschaft beginnen (Huelsenbeck *et al.* 2002). Zurzeit ist es noch nicht möglich festzustellen, ob das Gleichgewicht dem jeweiligen Datensatz entsprechend durchmischt ist oder nicht. Ein Indikator ist nur ein häufigerer Wechsel des höchsten Likelihood-Wertes zwischen den Ketten, also der Übergang einer „erhitzten“ Kette zur einer „kalten“ und umgekehrt.

In dieser Arbeit wurde anhand der Bayes'schen Analyse der 18S-rDNA verglichen, ob der beste Stammbaum der ML-Analyse im Vergleich zu zufälligen Startbäumen eine sicherere und schnellere Etablierung des stabilen optimalen Gleichgewichtes ermöglicht. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass durch die Wahl der zufälligen Stammbäume das stabile optimale Gleichgewicht nach 20 Millionen Generationen noch nicht erreicht wurde. Das erhaltene Gleichgewicht ist in einigen Teilen sogar signifikant schlechter als das stabile optimale Gleichgewicht, welches mit Hilfe der Phylogenie aus der ML-Analyse etabliert wurde. Mit der

Strategie, die beste Phylogenie der ML-Analyse als Startbaum für alle vier Ketten zu verwenden, wird somit das stabile optimale Gleichgewicht schneller und mit höherer Wahrscheinlichkeit erreicht. Dieses Verfahren wurde daher in allen Analysen angewendet.

Allerdings wird die Wahrscheinlichkeit für eine gute Durchmischung des Gleichgewichtes durch den gemeinsamen Startpunkt der vier Ketten reduziert. Um trotzdem eine gute Durchmischung des Gleichgewichtes zu gewährleisten, wurden in jeder Analyse 10 Millionen Generationen und somit 40 Millionen Stammbäume berechnet. Dieses sind weit mehr Generationen als normalerweise in Analysen mit 16 bis 32 OTUs berechnet werden [zum Beispiel 1 Million Generationen bei 23 OTUs in Wilcox *et al.* (2002)]. In allen Analysen war außerdem ein häufiger Wechsel des höchsten Likelihood-Wertes zwischen den Ketten gegeben.

Der Vergleich der beiden Strategien bei der Wahl der Startbäume in der Analyse der 18S-rDNA zeigt, dass es wenigstens in Datensätze mit sehr vielen Taxa sinnvoller sein könnte, falls möglich, die beste Phylogenie der ML-Analyse als Startbaum zu verwenden. Wenn die Wahrscheinlichkeit für eine gute Durchmischung des Gleichgewichtes nicht reduziert werden soll, könnte dieses Verfahren zu mindest als ein Test genutzt werden, um abzuschätzen, ob das etablierte Gleichgewicht mit zufälligen Startbäumen schon das stabile optimale Gleichgewicht ist oder es noch ein besseres gibt. Dazu würden schon wenige Generationen, von etwa 50.000 bis 100.000, reichen, da in allen durchgeführten Bayes'schen Analysen das Gleichgewicht schon nach etwa 1.000 Generationen erreicht wurde.

Der Unterschied der „posterior probabilities“ und BS-Werte ist in dieser Untersuchung, wie in den anderen Analysen auch, sehr wahrscheinlich nicht auf ein suboptimales Gleichgewicht oder eine schlechte Durchmischung zurückzuführen (Buckley *et al.* 2002; Leaché & Reeder 2002; Whittingham *et al.* 2002; Wilcox *et al.* 2002; Bleidorn *et al.* 2003). Von der Berechnung der BS-Werte ist bekannt, dass ihre Genauigkeit von der Anzahl der durchgeführten Wiederholungen abhängt (Hedges 1992). In den Berechnungen der BS-Werte wurden 100, 250 bzw. 1.000 Wiederholungen durchgeführt. Die Standardabweichung besitzt daher bei BS-Werten von 50% ein Maximum von  $\pm 5\%$  bei 100, von  $\pm 3,2\%$  bei 250 bzw. von  $\pm 1,6\%$  bei 1.000 Wiederholungen und ein Minimum von  $\pm 0\%$  bei BS-Werten von 0% und 100%. Bei dem Signifikanzwert von 95% beträgt die Standardabweichung  $\pm 2,2\%$  bei 100,  $\pm 1,4\%$  bei 250 bzw.  $\pm 0,7\%$  bei 1.000 Wiederholungen. Die Standardabweichungen sind somit zu klein, um die Unterschiede zwischen den „posterior probabilities“ und BS-Werten erklären zu können. Die Varianz der „posterior probabilities“ ist noch wenig untersucht, aber wahrscheinlich wird die Berechnung sehr viel schwieriger als bei der Berechnung der BS-Werte (Huelsenbeck *et al.* 2002).

Unter vielen Bedingungen können die BS-Werte als ein eher konservatives Maß für die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Gruppe in der berechneten Phylogenie eine wirklich monophyletische Gruppe wiedergibt, angenommen werden (Zharkikh & Li 1992a & b; Hillis & Bull 1993). In der BS-Analyse ist der berechnete Wert der Unterstützung also eher niedriger als die wirkliche Wahrscheinlichkeit. Allerdings verändert sich „die Magnitude der Schiefelage von Zweig zu Zweig und Studie zu Studie“ (Hillis & Bull 1993), so dass nicht prinzipiell geschlossen werden kann, dass etwa ab einem BS-Wert von 70% eine Gruppe eigentlich signifikant unterstützt wird. Eine Korrektur der BS-Werte ist möglich, allerdings sind die Berechnungen extrem rechenintensiv und zeitaufwendig (Rodrigo 1993; Zharkikh & Li 1995; Efron *et al.* 1996; Sanderson & Wojciechowski 2000).

Ob es sich bei der Bestimmung der „posterior probabilities“ um eine genauere Bestimmung der wirklichen Wahrscheinlichkeit (Wilcox *et al.* 2002) oder um ein zu liberales und unterstützungsfreudiges Maß (Suzuki *et al.* 2002) im Vergleich zu den BS-Werten handelt, ist aufgrund der beiden bis jetzt durchgeführten Simulationsstudien umstritten. In der Simulationsstudie von Suzuki *et al.* (2002) werden verschiedene Datensätze von vier OTUs untersucht, die keine der drei möglichen Topologien signifikant unterstützen. Bei solchen widersprüchlichen Datensätzen kommt es zu sehr vielen falsch-positiven, also signifikanten, Unterstützungen einer der drei Topologien durch die „posterior probabilities“. In den BS-Analysen ist der Anteil an falsch-positiven Unterstützungen unter 5%. In der Analyse von Wilcox *et al.* (2002) wird die beste, voll aufgelöste Phylogenie von 23 OTUs einer ML-Analyse als Modelbaum der Simulation verwendet. Sowohl die Simulationen der Sequenzevolution als auch die anschließenden Analysen erfolgten mit demselben Substitutionsmodell. Da auch in dieser hier vorgestellten Arbeit die Datensätze eher widersprüchlich als eindeutig sind, ist davon auszugehen, dass die „posterior probabilities“ eher als ein zu liberales Maß zu bewerten sind. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die BS-Werte eher zu konservativ sind. Die wirkliche Wahrscheinlichkeit für die Monophylie einer Gruppe basierend auf dem jeweils vorliegenden Datensatz liegt vermutlich zwischen diesen beiden Werten.

#### **4.5 Systematische Stellung der Dinophilidae innerhalb der Annelida**

Durch die Daten der 18S-rDNA wird die Monophylie der Dinophilidae signifikant in allen Analysen gestützt. Auch in der Analyse, auf der CO I basierend, wird die nahe Verwandtschaft der beiden Arten von *Trilobodrilus* in allen Analysen als beste Lösung berechnet, allerdings sind die unterstützenden BS-Werte bzw. die „posterior probability“ gering. Dieses ist aber eher darauf zurückzuführen, dass die Sequenz der CO I im Allgemeinen für die Ermittlung der Phylogenie der Annelida nicht geeignet zu sein scheint. In den anderen Analysen ist immer nur ein Vertreter der Dinophilidae mit eingegangen. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die molekularen Daten genauso wie die morphologischen Daten, das ventrale Pharynx-Organ, das unpaare Kopulationsorgan und die Ultrastruktur der Spermatozoen, die Monophylie der Dinophilidae eindeutig stützen (Jägersten 1944; Westheide & Schmidt 1974; Franzén 1977; Scharnofske 1984, 1986; Purschke 1985a; Struck *et al* 2002a). Auch ist der progenerische Ursprung der Dinophilidae aufgrund von Untersuchungen am Nervensystem, ein Organsystem welches als besonders konservativ gilt, gut begründet (Müller & Westheide 2002).

In Bezug auf die systematische Stellung der Dinophilidae ist in den letzten 50 Jahren basierend auf morphologischen Daten nur die Zugehörigkeit zu entweder einem Taxon, welches die verbliebenen Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ umfasst (siehe Hermans 1969 & Mettam 1985), oder den Eunicida (Sveshnikov 1958; Åkesson 1977; Westheide 1982, 1984, 1985, 1987; Westheide & Riser 1983; Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994) diskutiert worden. Durch die auf molekularen Daten basierenden Analysen in dieser Arbeit wird jedoch keine der beiden Hypothesen unterstützt. Eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu Taxa der Eunicida kann nur in der besten Lösung der Parsimonie-Analyse, die auf der CO I basieren, festgestellt werden. In dieser Analyse sind die Dinophilidae, zusammen mit den Opheliidae und Nereidae, Teil der in Bezug auf die meisten anderen Annelida paraphyletischen Eunicida. Auch bei den Signifikanztests der beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida, mit und ohne Dinophilidae, wird die nahe Verwandtschaft von Dinophilidae und Eunicida mit hohen Wahrscheinlichkeiten von 80% bis über 95% in den Parsimonie- und mit moderaten von 54% bis 72% in den ML-Analysen abgelehnt. In der Parsimonie-Analyse mit allen drei Genen ist die Ablehnung mit über 95% signifikant. Auch im Vergleich zur besten Lösung ergibt sich mit Wahrscheinlichkeiten von 80% bis 88% in den Parsimonie- und von 74% bis 80% in den ML-Analysen ein hoher Grad der Ablehnung. Einzig in den Analysen, basierend auf der CO I, sind die Wahrscheinlichkeiten wesentlich geringer und in der ML-Analyse wird die Monophylie der Eunicida mit Dinophilidae gegenüber der Monophylie ohne sie mit einer 7%igen



Wahrscheinlichkeit favorisiert. Diese Ergebnisse sind aber eher auf die schlechte Auflösung der Analysen der CO I im Allgemeinen zurückzuführen. Ähnliche Resultate ergeben sich auch bei den Signifikanztests, die das jeweils beste Ergebnis gegen die Hypothese der Monophylie der Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ vergleichen. In 10 von insgesamt 14 Tests ist die Ablehnungswahrscheinlichkeit für die nahe Verwandtschaft der Dinophilidae und Eunicida zugunsten der besten Ergebnisse sogar größer als die der Monophylie der Taxa der ehemaligen „Archiannelida“. Die letztere Hypothese ist damit aufgrund der vorliegenden molekularen Daten etwas wahrscheinlicher als die erste. In den ermittelten Stammbäumen wird nur in der ML-Analyse aller drei Gene eine nähere, in Bezug auf die Clitellata paraphyletische Verwandtschaft der ehemaligen Taxa der „Archiannelida“ gestützt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hier vorgestellten molekularen Analysen basierend auf drei Genen keine der beiden vermuteten Verwandtschaftshypothesen der Dinophilidae unterstützen. Die Signifikanztests zeigen, dass beide Hypothesen mit hoher Wahrscheinlichkeit, allerdings im Moment noch nicht durchgängig signifikant, abgelehnt werden können.

Wie in den morphologischen Untersuchungen sind auch in den molekular-phylogenetischen Analysen die „Archiannelida“ polyphyletisch (Westheide 1985; Purschke 1985a & b, 1987; Purschke & Jouin 1988; Purschke & Tzetlin 1996). Hermans (1969) fasst die verbliebenen Taxa der „Archiannelida“, die Dinophilidae, Nerillidae, Protodrilida und Polygordiidae, als Monophylum innerhalb der Polychaeten zusammen. Die Gruppe soll sich durch eine Anpassung an den interstiellen Lebensraum und ein autapomorphes ventrales Pharynx-Organ auszeichnen. Genauere Untersuchungen der Pharynx-Organen der verschiedenen Taxa ließen eine Homologisierung nicht zu, so dass die „Archiannelida“ durch keine Autapomorphie gestützt werden (Rieger & Rieger 1975; Jouin 1978; Kristensen & Niilonen 1982; Purschke 1985a & b; Purschke & Jouin 1988; Purschke & Tzetlin 1996).

Die Einordnung der Dinophilidae in die Eunicida basiert vor allem auf der Ähnlichkeit vieler ihrer Strukturen mit denen der polytrochen Larven der Eunicida, vor allem der „Dorvilleidae“ (Sveshnikov 1958; Åkesson 1977; Westheide 1982, 1984, 1985, 1987; Westheide & Riser 1983; Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994). Allerdings sind sich die larvalen und juvenilen Strukturen unterschiedlichster Polychaeten-Gruppen meistens sehr viel ähnlicher als die Strukturen der aus ihnen hervorgehenden adulten Tiere, wie zum Beispiel beim Nervensystem gezeigt wurde (Westheide 1982; Müller & Westheide 2002). So kann eine parallele Evolution ähnlicher larvaler und juveniler Merkmale und somit eine progenetische Entstehung der verschiedenen Arten in unterschiedlichen Gruppen nicht ausgeschlossen werden (Westheide 1987). Neben dem Verlust der Palpen und Notoacacula (Westheide 1982) identifizierten Westheide & Riser (1983),

allerdings „nur zögerlich“ („only hesitantly“), einen medianen unpaaren caudalen Anhang am Pygidium als einzige Synapomorphie von *Trilobodrilus*, *Dinophilus*, *Apodotrocha*, *Parapodrilus* und *Ophryotrocha*, wobei dieses Merkmal bei *Trilobodrilus* und einigen Arten von *Ophryotrocha* wieder reduziert ist. Es handelt sich somit nicht um eine eindeutige Autapomorphie. In der kladistischen Analyse von Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994) ist es dann auch eines der schwächsten Merkmale, für dessen Erklärung in jeder der verschiedenen Analysen die meisten Schritte benötigt werden, da es noch bei verschiedenen anderen Arten der „Dorvilleidae“ auftritt. Mediane unpaare Anhänge am Pygidium sind zwar nicht häufig innerhalb der Polychaeten, doch treten sie in völlig verschiedenen Taxa wie den Amphinomidae, Nephtyidae, Paraonidae, Polygordiidae und Sabellidae (*Chone filiformis* & *Jasmineira caudata*) auf (Rouse & Pleijel 2001). Eine häufigere konvergente Entstehung innerhalb der Polychaeten kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Auch ist eine Homologisierung der ventralen Pharynx-Organen der Dinophilidae und der Eunicida, im Speziellen der „Dorvilleidae“, nicht möglich (Purschke 1985a, 1987, 2002; Purschke & Tzetlin 1996). Die Dinophilidae besitzen ein Organ, das nur aus einem Bulbusmuskel besteht. Die „Dorvilleidae“ haben ein ventrales Pharynx-Organ aus Bulbusmuskel, Sagittalmuskel und einem Kieferapparat. Dieser Pharynx ähnelt stärker dem ventralen Pharynx-Organ mit Bulbusmuskel, Sagittalmuskel und einem Zungenorgan, wie es zum Beispiel bei den Orbiniidae auftritt (Purschke 1985b, 2002; Purschke & Tzetlin 1996). Hinzu kommen tiefgreifende Unterschiede in der Struktur der Bulbusmuskeln.

Untersuchungen der Muskulatur und des Nervensystems zeigen, dass bei den Dinophilidae die beiden distinkten Ringe nach dem Prostomium ein peristomiales Segment darstellen (Eibye-Jacobsen 1994; Müller & Westheide 2002). Dieses ist auch generell bei den meisten Eunicida zu beobachten (Åkesson 1967; Rouse & Pleijel 2001). Aber auch Arten der Orbiniidae, im Besonderen die Microrbiniinae, zeichnen sich durch zwei borstenlose „Segmente“ nach dem Prostomium aus. Allerdings ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob es sich um ein Peristomium mit zwei Ringen, ähnlich wie bei den Dinophilidae und Eunicida, oder um ein Peristomium und einem ersten borstenlosen Segment handelt (siehe Rouse & Pleijel 2001). Die Entstehung der beiden „Segmente“ und im Speziellen des ersten Ganglienpaares bei *Scoloplos armiger* (Orbiniidae) ähnelt sehr der bei Dorvilleiden und eventuell Dinophiliden (siehe für eine detaillierte Diskussion Müller 1999 sowie Anderson 1959, 1961). Eine konvergente Entstehung dieses Merkmals in Zusammenhang mit den in den verschiedenen Taxa ähnlichen, aber nicht homologen ventralen Pharynx-Organen kann somit nicht endgültig ausgeschlossen werden.

Die phylogenetische Einordnung der Dinophilidae innerhalb der „Dorvilleidae“ erfolgte ansonsten vor allem basierend auf dem Verlust von Merkmalen wie Parapodien, Antennen und Kiefern (Westheide 1982, 1985; Westheide & Riser 1983; Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994). Dieses zeigt sich am deutlichsten in der kladistischen Analyse morphologischer Daten der „Dorvilleidae“ und Dinophilidae von Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994), in der die vermuteten progenetischen Arten der Dorvilleiden einander Schritt für Schritt folgen und so eine verwandtschaftliche Reihe mit graduell steigender juveniler Organisation, ähnlich einer morphologischen Reihe, bilden. Den Abschluss dieser Reihe bilden die Arten der Dinophilidae, die somit ein hoch abgeleitetes Taxon innerhalb der „Dorvilleidae“ sind. Die Synapomorphien in dieser Untersuchung, die die jeweiligen progenetischen Arten vereinigen, repräsentieren vor allem Reduktionen von Merkmalen. Die phylogenetische Analyse von Negativmerkmalen ist aber prinzipiell sehr kritisch zu bewerten und schwierig (Purschke *et al.* 2000). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die von Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994) aufgezeigte steigende progenetische Organisation eher eine morphologische Reihe repräsentiert als das die Phylogenie der Taxa bestimmt wurde. Merkmale in adulten Tieren, die Merkmalen von larvalen oder juvenilen Stadien entsprechen, sind in kladistischen Analysen schwierig zu handhaben, da zum einen Merkmale von solchen Stadien eine allgemeine strukturelle Ähnlichkeit selbst zwischen Taxa aufweisen, die als Adulte extrem unterschiedlich sind (Westheide 1982, 1987). Zum anderen ist eine adäquate Kodierung schwierig, da in nicht-progenetischen größeren Arten diese Merkmale durchaus in larvalen oder juvenilen Stadien auftreten können, wie zum Beispiel das Fehlen von Kieferelementen oder der spezielle Aufbau des Nervensystems (Müller & Westheide 2002). Eine entsprechende Kodierung wurde allerdings in der Analyse von Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994) nicht durchgeführt. Dieses führt in kladistischen Analysen unweigerlich zu einem Kladus von Taxa mit vermuteter progenetischer Evolution, unabhängig von der Evolution dieser Merkmale. Auch kann aus der kladistischen Analyse nicht auf eine nahe Verwandtschaft von „Dorvilleidae“ und Dinophilidae geschlossen werden, da diese *a priori* durch die Auswahl von Gattungen nur aus diesen beiden Taxa vorausgesetzt wurde.

Åkesson (1977) gelang die reziproke Infektion von einzelligen parasitären *Grellia*-Arten bei verschiedenen Arten der Dorvilleiden und *Dinophilus gyrocolatus*. Der Parasit *Grellia dinophili* von *Dinophilus gyrocolatus* induzierte bei *Ophryotrocha notoglandulata* eine sehr schwache Infektion. Eine Übertragung auf andere Polychaeten, auch auf andere Dorvilleiden-Arten (*Schistomeringos coeca*, *Dorvillea* sp., verschiedene *Ophryotrocha*-Arten), gelang nicht. Umgekehrt konnte mit dem Parasiten *Grellia ophryotrochae*, der für alle *Ophryotrocha*-Arten infektiös war, eine mittlere Infektion bei *Dinophilus gyrocolatus* sowie eine schwache Infektion

bei *Schistomerinogs coeca* und *Dorvillea* sp. ausgelöst werden. Eine Übertragung auf die vier anderen Polychaeten (*Nerilla* sp., *Nereis diversicolor*, *Polydora ciliata* und *Pholoe minuta*) gelang nicht. Eine weiterer Parasit (*Grellia* sp.) löste nur bei den *Ophryotrocha*-Arten eine Infektion aus. Die reziproke Infektion ist in der Gegenseitigkeit somit sehr unterschiedlich. Eine wirklich sichere Infektion von anderen Gattungen als der Wirtsgattung gelang nur mit *Grellia ophryotrochae*. Nichtsdestotrotz ist es der bisher stärkste Hinweis auf eine nahe Verwandtschaft von Dinophilidae und „Dorvilleidae“. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die reziproke Infektion, vor allem von *Grellia ophryotrochae*, eher auf den gleichen Lebensraum zurückzuführen ist als auf eine gemeinsame Abstammung. Alle Arten, die von *Grellia ophryotrochae* infiziert wurden, sind sehr wahrscheinlich Mitglieder des interstitiellen Lebensraumes, alle Arten, die nicht infiziert wurden, leben nicht im Interstitium. Bei *Dinophilus gyrociliatus* muss allerdings angemerkt werden, dass nicht eindeutig geklärt ist, ob sie das Sandlückensystem besiedelt (Purschke pers. Mitteilung).

Eine eindeutige und sichere Einordnung der Dinophilidae in die Eunicida ist somit aufgrund sowohl der morphologischen als auch der molekularen Daten zurzeit nicht gegeben. Leider kann aufgrund der molekularen Daten aber auch kein anderes Taxon der „Polychaeta“ als eindeutige Schwestergruppe der Dinophilidae identifiziert werden. In der Analyse der 18S-rDNA, die auf den meisten Taxa der Polychaeten basiert, sind die Dinophilidae in allen Analysen näher mit den Serpulidae und Sabellidae verwandt. Allerdings wird dieses Verwandtschaftsverhältnis in keiner Analyse mit signifikanten Werten gestützt. Durch die „posterior probabilities“ wird eine Gruppe von Dinophilidae, Serpulidae, Sabellidae, Sipuncula und Clitellata signifikant gestützt. In den Analysen der CO I, in denen auch eine Art der Sabellidae vertreten war, sind die Dinophilidae und Sabellidae in keiner Analyse näher verwandt. Allerdings ist die Auflösung dieser Analysen, wie schon erwähnt, sehr schlecht. In allen anderen Analysen, die keine Art der Sabellidae und Serpulidae mehr umfassten, sind die Dinophilidae mit den Clitellata oder wenigstens einer Teilgruppe der Clitellata näher verwandt. Diese Verwandtschaft wird aber wiederum nur durch „posterior probabilities“ signifikant gestützt. Da die „posterior probabilities“ aber in ihrer Unterstützung sehr wahrscheinlich zu liberal sind (Suzuki *et al.* 2002), kann die systematische Einordnung der Dinophilidae nicht eindeutig geklärt werden.

Dieses könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass die Datensätze die wirkliche Schwestergruppe der Dinophilidae innerhalb der Polychaeten nicht umfassten, auch nicht in dem großen Datensatz der 18S-rDNA, obwohl dieser mehr als die Hälfte der „Familien“ der Polychaeten mit wenigstens einer Art berücksichtigt hat. Da außerdem nur in den Analysen aller drei Gene die Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae durch die besten Ergebnisse

unterstützt wird und die „Dorvilleidae“ innerhalb der Eunicida nicht monophyletisch sind (siehe 4.7 Phylogenie der Eunicida), kann eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae mit einem Taxon der Eunicida oder einer Art der „Dorvilleidae“, für die keine Sequenzdaten verfügbar waren, nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Deswegen sollten zukünftige Untersuchungen eine noch größere Zahl an Taxa umfassen, im Besonderen bei den Genen der 28S-rDNA und der CO I. Dabei sollten nach Möglichkeit sowohl alle Taxa der Eunicida mit mehreren Arten und alle Gattungen der „Dorvilleidae“ als auch jeweils mehrere Arten aller anderen Taxa der „Polychaeta“ in die Analysen eingehen, um sicherzustellen, dass die potentielle Schwestergruppe der Dinophilidae in den Analysen auch berücksichtigt ist.

Die zweite Möglichkeit der nicht eindeutigen systematischen Einordnung der Dinophilidae ist, dass die Stammlinie der Dinophilidae schon während der vermuteten „explosiven Radiation“ der Taxa der Annelida im Kambrium (McHugh 2000, Giribet 2002, Struck *et al.* 2002b) evolvierte und die Dinophilidae die einzige rezente Gruppe dieser Linie darstellen. In diesem Falle dürfte die Analyse basierend auf nur einem Gen selbst bei einer umfassenden Zahl an Taxa problematisch sein. Daher sollten kombinierte Analysen mehrerer Gene mit einer ähnlich umfangreichen Anzahl an Taxa durchgeführt werden, um eine bessere Auflösung der Phylogenie zu erreichen (siehe 4.3 Vergleich der einzelnen Gene sowie deren Kombination und Giribet 2002).

Bei der Verwendung morphologischer Daten sollten sich die Untersuchungen nicht nur auf Taxa der Eunicida beschränken, sondern auch andere Taxa der „Polychaeta“ berücksichtigen. Als Erfolg versprechende Merkmale für eine Suche nach Synapomorphien der Dinophilidae mit anderen Taxa könnten sich das ventrale Pharynx-Organ, das unpaare Kopulationsorgan und die Ultrastruktur der Spermatozoa, die momentanen Autapomorphien der Dinophilidae, erweisen (Jägersten 1944; Westheide & Schmidt 1974; Franzén 1977; Scharnofske 1984, 1986; Purschke 1985a). Insbesondere sollten hier Untersuchungen an juvenilen Stadien der Sabellidae und Serpulidae miteinbezogen werden, um die Hinweise aus den Analysen der 18S-rDNA zu überprüfen.

Da weder die molekularen noch die morphologischen Daten zurzeit eine eindeutige systematische Einordnung der Dinophilidae innerhalb der „Polychaeta“ erlauben, sollten die Dinophilidae wieder als eigenständiges Taxon innerhalb der „Polychaeta“ geführt und keinem anderen Taxon zugeordnet werden. Daher sollten sie auch nicht in kladistischen Analysen, wie in der von Rouse & Fauchald (1997), zur Phylogenie der „Polychaeta“ *a priori* den „Dorvilleidae“ zugeordnet, sondern als eigenständiges Taxon miteinbezogen werden.

#### 4.6 Progenetische Evolution innerhalb der „Dorvilleidae“

*Parapodrilus psammophilus* ähnelt äußerlich ebenfalls den Larven der Eunicida, im Speziellen der „Dorvilleidae“, und somit auch den Dinophilidae. Im Gegensatz zu den Dinophilidae zeichnet sich *Parapodrilus psammophilus* durch unirame, in wenigen Fällen subbirame Parapodien mit einfachen Borsten an den ersten vier Rumpsegmenten und keinem besonderen muskulösen Pharynx-Organ aus. Auch der charakteristische Kieferapparat fehlt. *Parapodrilus psammophilus* besitzt wie *Dinophilus* einen unpaaren medianen Anhang am Pygidium (Westheide 1965). Neben der oberflächlichen Ähnlichkeit wurde *Parapodrilus* vor allem aufgrund des unpaaren Anhangs mit den Dinophilidae und *Ophryotrocha*, und später noch mit *Apodotrocha*, zusammengefasst und somit als näher verwandt mit den „Dorvilleidae“ angesehen (Hartmann-Schröder 1971; Åkesson 1977; Westheide & Riser 1983; Westheide 1985). In der kladistischen Analyse von Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994) war *Parapodrilus* Teil einer Gruppe, die noch die Dinophilidae, *Apodotrocha* und *Apharyngtus* umfasste. Das gemeinsame Merkmal dieser Gruppe war der Verlust des muskulösen ventralen Pharynx-Organs mit Kieferelementen, der typisch für die Dorvilleiden ist. Eine nähere Verwandtschaft zu *Ophryotrocha* konnte nicht ermittelt werden. Die Einordnung von *Parapodrilus* in die „Dorvilleidae“ sowie der gemeinsame Ursprung mit den Dinophilidae ist allerdings morphologisch nicht eindeutig belegt (für detaillierte Diskussion zu den beiden Merkmalen sowie der Analyse von Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994) in Bezug auf progenetische Arten siehe 4.5 Systematische Stellung der Dinophilidae innerhalb der Annelida).

Die Analysen der 18S-rDNA in dieser Arbeit widersprechen eindeutig einer nahen Verwandtschaft von *Parapodrilus psammophilus* sowohl zu den Dinophilidae als auch zu *Ophryotrocha gracilis* und unterstützen somit eine unabhängige Evolution von *Parapodrilus* und Dinophilidae, die schon vorher nicht ausgeschlossen wurde (Westheide 1985, 1987; Orensanz 1990). Ferner werden Untersuchungen bestätigt, die ebenfalls auf der 18S-rDNA basierten, allerdings mit einer wesentlich kleineren Anzahl an Taxa (Struck *et al.* 2002a). Der gemeinsame Ursprung von Dinophilidae und *Parapodrilus psammophilus* wurde in diesen Untersuchungen signifikant abgelehnt. Dadurch wird erneut gezeigt, dass der unpaare mediane caudale Anhang am Pygidium nur ein sehr schwaches Merkmal ist, welches eine Gruppe nicht eindeutig unterstützt (Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994).

Allerdings belegen die molekularen Daten eindeutig, dass *Parapodrilus psammophilus* eine Art der „Dorvilleidae“ ist. *Parapodrilus psammophilus* ist in allen Analysen der 18S-rDNA mit signifikanter Unterstützung die Schwesterart der Dorvilleiden *Parougia* sp., *Dorvillea bermudensis* und *Microdorvillea* sp. n., deren Monophylie wiederum durch signifikante Werte

bestätigt wird. Die Schwestergruppe dieser vier Dorvilleiden sind in allen Analysen drei weitere Dorvilleiden-Arten. Dieselben Ergebnisse werden auch in den Analysen ermittelt, die eine Monophylie der Eunicida voraussetzen. Diese nahe Verwandtschaft von *Parapodrilus* mit großen kiefertragenden Dorvilleiden ist ein sehr guter Beleg für die vermutete progenetische Evolution dieser Art (Westheide & Riser 1983; Westheide 1985, 1987). Da auch der progenetische Ursprung der Dinophilidae morphologisch gut unterstützt wird (Müller & Westheide 2002), wird selbst bei einer möglichen Verwandtschaft von Dinophilidae und „Dorvilleidae“ die Vorstellung einer mehrfach unabhängigen progenetischen Evolution (Westheide 1982, 1985; Westheide & Riser 1983; Orensanz 1990) gegenüber eines einmaligen progenetischen Ursprungs aller Arten mit larvalen und juvenilen Merkmalen (Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994) eindeutig favorisiert.

Die progenetische Evolution einer Art bedeutet nicht zwingend, dass alle morphologischen Merkmale progenetischen Ursprungs sein müssen (Gould 1977). Bei *Parapodrilus psammophilus* ist unklar, ob der Verlust des muskulösen Pharynx-Organs und des Kieferapparates nur auf die Progenese zurückgeführt werden kann. Der Kieferapparat der Eunicida entwickelt sich schon sehr früh in der Ontogenie und ist meistens auch nicht wesentlich später funktionstüchtig (Richards 1967). Bei Arten von *Ophryotrocha* entwickelt er sich schon in späten Stadien der polytrochen Larven. Bei anderen Arten der Eunicida, z. B. *Lumbrineris* sp., ist der späteste Zeitpunkt der Entwicklung in Stadien mit fünf borstentragenden Segmenten. Bei *Schistomeringos rudolphi* entwickelt sich der Kieferapparat im Stadium mit einem borstentragenden Segment und ist ab dem nächsten Stadium mit einem zusätzlichen Borstensegment funktionstüchtig. Da *Schistomeringos rudolphi* von allen bisher in dieser Hinsicht untersuchten Arten in den hier vorgestellten Analysen am nächsten verwandt ist mit *Parapodrilus psammophilus*, könnte es sein, dass der Verlust eher nicht auf die Progenese zurückzuführen ist.

Eine weitere Gattung, die sich in die morphologische Reihe mit zunehmenden juvenilen Merkmalen einordnen lässt, ist *Microdorvillea* mit nur wenigen juvenilen Merkmalen (Westheide 1987; Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994). Dieses sind der Besitz von einfachen Antennen und Parapodien, eine begrenzte Anzahl an Segmenten sowie ein einfacher Kieferapparat ohne Maxillenträger, mit weniger als acht freien oberen Dentikeln und keinen unteren basalen Platten. Eine Evolution über die Reduktion von einzelnen Merkmalen kann aber nicht ausgeschlossen werden. Es wurde eine nahe Verwandtschaft sowohl zu *Protodorvillea*, *Coralliotrocha* und *Eliberidens* (Hilbig & Blake 1991) als auch aufgrund der morphologischen Reihe zunehmender juveniler Merkmale zu *Arenotrocha*, *Petrocha* und *Pusillotrocha*

(Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994) diskutiert. Die erste Hypothese wird in Bezug auf *Protodorvillea* eindeutig abgelehnt, da *Microdorvillea* sp. n. signifikant in allen Analysen der 18S-rDNA mit *Dorvillea bermudensis* und *Parougia* sp. und nicht mit *Protodorvillea kefersteinii* verwandt ist. Die letzte Hypothese lässt sich mit den vorliegenden Datensätzen weder bestätigen noch ablehnen. Allerdings wird eine phylogenetische Reihe von vermuteten progenetischen Arten entsprechend der morphologischen Serie (Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994) von den Analysen der 18S-rDNA nicht gestützt, da *Parapodrilus psammophilus* in der sieben Dorvilleiden umfassenden Gruppe vor *Microdorvillea* sp. n. evolviert und somit eine zunehmende Progenese nicht festgestellt werden kann.

Die auf molekularen Daten basierenden Untersuchungen zur Systematisierung der vermutlich progenetischen Arten von *Dinophilus*, *Trilobodrilus*, *Parapodrilus* und *Microdorvillea* haben gezeigt, dass ihre Einordnung aufgrund morphologischer Daten nicht eindeutig ist und die gemeinsamen Merkmale sehr wahrscheinlich wenigstens zweimal unabhängig von einander durch Progenese entstanden sind. Unklar ist, ob *Microdorvillea* überhaupt durch Progenese evolvierte. Auch aufgrund morphologischer Daten ist eine mehrfache, wenigstens zweimalige, unabhängige progenetische Evolution innerhalb der „Dorvilleidae“ schon diskutiert worden (Westheide 1982, 1985, 1987; Westheide & Riser 1983). Zukünftige Arbeiten, molekulare Daten und weitere progenetische Arten betreffend, könnten zeigen, ob es noch häufiger zu unabhängigen progenetischen Evolutionen innerhalb der Polychaeten, im Besonderen innerhalb der Eunicida, gekommen ist. So bleibt die systematische Einordnung der Arten von *Apodotocha* und *Apharyngtus* weiterhin ungeklärt. Sie besitzen starke Ähnlichkeiten mit den Dinophilidae (Westheide 1971; Westheide & Riser 1983) und sind mit diesen eventuell näher verwandt. Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das fehlende muskulöse Pharynx-Organ eine Synapomorphie mit dem kieferlosen Dorvilleiden *Parapodrilus* ist. Eine unabhängige progenetische Evolution beider Taxa sowohl innerhalb der Eunicida als auch innerhalb anderer Gruppen der Polychaeten ist ebenfalls möglich. Auch ist die systematische Einordnung der vermuteten progenetischen Arten mit einem muskulösen Pharynx-Organ und reduzierten Kieferelementen, wie *Ikisopodus*, *Pusillotrocha* und *Neotenotrocha*, innerhalb der Eunicida unklar. So wird für *Ikisopodus* eine nähere Verwandtschaft sowohl zu *Protodorvillea*, *Dorvillea* und *Schistomeringos* (Westheide 1982) als auch zu *Meiodorvillea*, *Gymnodorvillea*, *Arenotrocha*, *Pusillotrocha* und *Pseudophryotrocha* (Hilbig & Blake 1991) sowie zu *Neotenotrocha*, *Parapodrilus*, *Apodotocha*, *Apharyngtus*, *Trilobodrilus* und *Dinophilus* (Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994) postuliert.



#### **4.7 Phylogenie der Eunicida**

Auf der Basis der molekularen Daten kann die Monophylie der jeweiligen Taxa der Eunicida nur durch die Analysen der drei Gene, in der Bayes'schen Analyse mit einem signifikanten Wert, bestätigt werden. In der Kombination der beiden ribosomalen Gene sind die Taxa der Eunicida paraphyletisch in Bezug auf die Syllidae und somit wird auch in diesen Analysen eine nähere Verwandtschaft unterstützt. In den Analysen der einzelnen Gene sind sie nicht monophyletisch und vor allem in der Analyse der 18S-rDNA gruppieren sie weit von einander entfernt. Des Weiteren kann in keiner der Analysen eine der vermuteten Verwandtschaftshypothesen der Taxa der Eunicida unterstützt werden (Orensanz 1990; Rouse & Fauchald 1997). Die Monophylie der Eunicida ist aufgrund des muskulösen ventralen Pharynx-Organs mit einem auffallenden Kieferapparat aus kutikulären mandibularen und maxillaren Elementen (Purschke 1987) eine der am besten begründeten unter den höheren taxonomischen Einheiten der Polychaeten und eine Paraphylie oder Polyphylie der Eunicida ist somit sehr unwahrscheinlich (Orensanz 1990; Rouse & Fauchald 1997).

Dieser Widerspruch zu den meisten Ergebnissen der molekularen Analysen, vor allem der Analysen basierend auf den einzelnen Genen, könnte auf die oft postulierte „explosive Radiation“ der meisten Taxa der Annelida im Kambrium zurückgeführt werden (McHugh 2000, Giribet 2002, Struck *et al.* 2002b). Eine solche Radiation wird in den Fossilfunden der Taxa der Eunicida reflektiert (Kielan-Jaworowska 1966; Kozur 1970; Mierzejewski & Mierzejewski 1975; Wolf 1980; Orensanz 1990). Fossilien der meisten Taxa der Eunicida oder von deren direkten Vorfahren sind schon seit dem frühen Ordovizium nachweisbar. Einzig Fossilien der Eunicidae und Onuphidae sind nicht früher als im Mittleren Karbon zu finden (Orensanz 1990). Die Fossilien sowie die morphologischen Daten, besonders der hochgradig übereinstimmende Kieferapparat, lassen auf eine sehr enge Verwandtschaft dieser beiden Taxa schließen.

Die Fossilfunde weisen somit auf ein frühes, sehr schnell hintereinander folgendes Auftreten aller heutigen „Familien“, die als Eunicida zusammengefasst werden, zeitgleich mit den meisten anderen „Familien“ der Polychaeten hin. Dadurch sind die Zeitspannen der gemeinsamen Stammlinien der verschiedenen höheren Taxa der Polychaeten, wie zum Beispiel die Eunicida oder Phyllodocida, sehr kurz. So kommt es nur zu wenigen unterstützenden Mutationen in den einzelnen Genen. Gleichzeitig ist die nachfolgende Zeitspanne mit etwa 500 Millionen Jahren sehr lang, so dass eine hohe Wahrscheinlichkeit für homoplastische Mutationen besteht, die das Signal verrauschen (Philippe *et al.* 1994; Regier & Shultz 1998). Innerhalb der Eunicida trennten sich nur die Stammlinien der Eunicidae und Onuphidae wesentlich später, so dass die Zeitspanne der gemeinsamen Stammlinie relativ lang war. Dadurch können wesentlich mehr unterstützende

Mutationen in den einzelnen Genen stattfinden. Gleichzeitig wird durch den späteren Zeitpunkt der Trennung die Wahrscheinlichkeit für homoplastische Mutationen erheblich reduziert. Derartige Schwestergruppenverhältnisse sollten daher mit hoher Sicherheit und relativ einfach durch molekulare Datensätze nachgewiesen werden können. Dementsprechend wird in den meisten der hier vorgestellten Analysen auch einzig die enge Verwandtschaft der Eunicidae und Onuphidae zwischen den höheren Taxa der Eunicida rekonstruiert und durch signifikante Werte gestützt. Auch diese Analysen, vor allem in Bezug auf die Eunicida, weisen somit daraufhin, dass es sich bei der „explosiven Radiation“ der Annelida, um ein wirkliches historisches Ereignis handeln könnte.

Analysen zur Phylogenie der Eunicida sollten daher auf die Taxa der Eunicida eingeschränkt werden und mehrere Gene umfassen, um zu gewährleisten, dass zum einen das der Evolution der Eunicida entsprechende Substitutionsmodell gewählt wird und zum anderen durch die Erhöhung der Anzahl der variablen Positionen die Wahrscheinlichkeit für unterstützende Positionen zu verbessern (Cummings *et al.* 1995; Nixon & Carpenter 1996). Die kombinierten Analysen haben gezeigt, dass die Verwendung mehrerer Gene zum einen zur einer Rekonstruktion der Monophylie der Eunicida führte und zum anderen wird zum Beispiel das Schwestergruppenverhältnis von den Eunicidae und Onuphidae mit *Protodrovillea kefersteinii* und somit wahrscheinlich zu der Gruppe mit den sieben Dorvilleiden immer besser, zum Teil signifikant, unterstützt. Allerdings ist die Zahl der in diese Analysen eingegangen Arten und Taxa der Eunicida noch zu gering, um daraus definitive Schlussfolgerungen ziehen zu können. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Ergebnisse bei Hinzufügen weiterer Arten stabilisieren. Solche Analysen könnten auch zeigen, ob sich die basale Position der Lumbrineridae, die in den meisten Analysen, die eine Monophylie der Eunicida voraussetzten, ermittelt wurde, bestätigen lässt. Nichtsdestotrotz lassen sich, vor allem basierend auf den Analysen der 18S-rDNA, zwei Aspekte der Phylogenie der Eunicida etwas genauer betrachten.

In allen Analysen, die mehr als einen Dorvilleiden umfassen, also basierend auf der 18S-rDNA bzw. der CO I, sind die „Dorvilleidae“ nicht monophyletisch und bestätigen somit molekularphylogenetische Analysen die auf 18S-rDNA-Sequenzen und einem wesentlich kleineren Datensatz beruhen (Struck *et al.* 2002a). Auf der Grundlage von morphologischen Daten werden die „Dorvilleidae“ im Allgemeinen für ein gut begründetes monophyletisches Taxon gehalten (Fauchald & Rouse 1997; Rouse & Fauchald 1997). Als autapomorphes Merkmal der „Dorvilleidae“ wird ihr so genannter ctenognather Kieferapparat mit Reihen aus maxillaren Elementen und nachfolgenden Trägerelementen angesehen (Jumars 1974; Orensanz 1990; Fauchald & Rouse 1997). Allerdings wird meistens nicht berücksichtigt, dass die meisten frühen

Fossilien von einem Dorvilleiden-ähnlichen Typ sind und juvenile Stadien der anderen Taxa der Eunicida normalerweise einen Dorvilleiden-ähnlichen Kieferapparat besitzen, der in späteren Entwicklungsstadien durch den taxon-spezifischen Kieferapparat ersetzt wird (Monro 1924; Åkesson 1967; Tzetlin 1980; Paxton 1986; Orensanz 1990). Ferner leitet Tzetlin (1980) den labidognathen Kiefer der Eunicidae, Onuphidae und Lumbrineridae aus dem zangenförmigen, als K-Typ bezeichneten Kieferapparat ab, wie er bei vielen Arten von *Ophryotrocha* auftritt. Dieses weist daraufhin, dass sehr wahrscheinlich schon die Stammart der Eunicida einen ctenognathen Kieferapparat besaß. Orensanz (1990) ordnet dementsprechend den ctenognathen Typ dem Grundmuster der Eunicida zu und platzierte ihn an der Wurzel des Stammbaumes. Daraus folgt für die „Dorvilleidae“, das ihr Kieferapparat ein plesiomorphes Merkmal ist und es kein morphologisches Merkmal gibt, welches ihre Monophylie eindeutig und zweifelsfrei unterstützt.

Hinweise darauf, dass die „Dorvilleidae“ nicht monophyletisch sind, ergeben sich auch durch die kladistische Analyse von Eibye-Jacobsen & Kristensen (1994) in der die Dinophilidae hoch abgeleitete Dorvilleiden sind. Die Monophylie der gesamten Gruppe, also „Dorvilleidae“ mit den Dinophilidae, wurde von den Autoren allerdings nicht in Frage gestellt. Die Gruppen, die sich aufgrund der molekularen Analysen ergeben, sind kongruent mit morphologischen Daten. Die fünf großen kiefertragenden Dorvilleiden aus der Gruppe der sieben Dorvilleiden, *Schistomeringos rudolphi*, *Dorvillea bermudensis*, *Dorvillea similis*, *Protodorvillea kefersteini* und *Parougia* sp., besitzen Kieferstrukturen, die hoch komplex und weitgehend identisch sind (Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994). Die beiden anderen Arten dieser Gruppe sind vermutlich durch Progenese evolviert (siehe 4.6 Progenetische Evolution innerhalb der „Dorvilleidae“). *Pettibonia urciensis* hingegen hat relativ einfache maxillare Elemente (Campoy & San Martin 1980; Eibye-Jacobsen & Kristensen 1994). Für die *Ophryotrocha*-Arten, sowie für noch einige andere Arten der Dorvilleidae, ist aufgrund der in vielen Adulten besonderen Zangenförmigen maxillaren Kieferelemente (K-Typ) schon der Status einer eigenen „Familie“ diskutiert worden (Fauchald 1970; Orensanz 1990). Die konvergente Evolution dieser verschiedenen Kieferapparate von einem einfachen primitiven ctenognathen Kiefertyp kann somit nicht ausgeschlossen werden. Da weder die morphologischen noch die molekularen Daten die Monophylie stützen und das kennzeichnende Merkmal plesiomorph ist, sollten die „Dorvilleidae“ als parapyhletisch innerhalb der Eunicida betrachtet werden und mit Anführungsstrichen geführt werden (Hennig 1994).

Als letztes soll noch auf die systematische Position der kommensalischen oder parasitischen Histriobdellidae eingegangen werden. Die Einordnung der Histriobdellidae in die Eunicida ist

aufgrund der Kieferelemente morphologisch eindeutig belegt (Mesnil & Caullery 1922; Orensanz 1990). Die systematische Einordnung innerhalb der Eunicida hingegen ist völlig ungeklärt (Orensanz 1990; Rouse & Pleijel 2001). In allen Analysen der 18S-rDNA nimmt *Histriobdella homari* eine sehr basale Position ein und eine nähere Verwandtschaft zu einem anderen Taxon der Eunicida wird nicht unterstützt. Dieses ist sehr wahrscheinlich auf den langen Zweig und die somit hohe genetische Differenz zu allen anderen Taxa zurückzuführen. Lange Zweige tendieren in phylogenetischen Berechnungen häufig dazu eine basale Position einzunehmen (Hendy & Penny 1989 siehe auch 4.3 Vergleich der einzelnen Gene sowie deren Kombination). Außerdem legt dieses die Möglichkeit nahe, dass die Stammlinie der Histriobdellidae oder ihrer direkten Vorfahren sich schon während oder kurz nach der „explosiven Radiation“ von den anderen Taxa der Annelida, im Besonderen von denen der Eunicida, trennte. Über den zeitlichen Ursprung der Histriobdellidae ist nichts bekannt, da bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Fossilien gefunden wurden (Rouse & Pleijel 2001). In der Analyse, die eine Monophylie der Taxa der Eunicida voraussetzt, ist *Histriobdella homari* am nächsten mit *Ophryotrocha gracilis* verwandt. Diese Analyse unterstützt somit die Hypothese, dass die Histriobdellidae näher mit Arten der „Dorvilleidae“ verwandt sind (Tzetlin 1980). Allerdings kann auch in dieser Analyse nicht ausgeschlossen werden, dass die Gruppierung artifiziell ist, da beide Arten sich durch eine hohe genetische Differenz zu den anderen Arten der Annelida auszeichnen. Auch für die systematische Einordnung der Histriobdellidae innerhalb der Eunicida basierend auf molekularen Daten gilt somit auch wie für die Phylogenie der Eunicida, dass sie mehrere Gene umfassen sollte.

## 5. Zusammenfassung

- In dieser Arbeit wurde die progenetische Evolution der Dinophilidae innerhalb der Eunicida („Polychaeta“, Annelida) sowie der Ursprung weiterer vermutlich progenetischer Arten des Euniciden-Taxons „Dorvilleidae“ (*Parapodrilus psammophilus* und *Microdorvillea* sp. n.) mit Hilfe molekularer Daten untersucht.
- Ein etwa 1800 bp langer Abschnitt der 18S-rDNA wurde erfolgreich von den in Tabelle 1 aufgeführten Arten (s. S. 5-7), mit Ausnahme von *Ophryotrocha puerilis* und *Pusillotrocha akessoni*, sequenziert. Von der 28S-rDNA wurde ein etwa 2250 bp langer Abschnitt von *Trilobodrilus heideri*, *Protodorvillea kefersteinii*, *Eunice* sp. und *Hyalinoecia tubicola* sequenziert. Von den folgenden Arten wurden 488 bzw. 482 bp der CO I bestimmt: *Rheomorpha neiswestonovae*, *Trilobodrilus axi*, *Trilobodrilus heideri*, *Ophryotrocha gracilis*, *Ophryotrocha puerilis*, *Protodorvillea kefersteinii*, *Schistomeringos rudolphi*, *Eunice* sp., *Marphysa sanguinea*, *Lumbrineris funchalensis*, *Hyalinoecia tubicola*, *Potamodrilus fluviatilis* und *Sabella crassicornis*. Zusätzliche Sequenzen der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der CO I wurden der Datenbank GenBank entnommen. Weitere Sequenzen der 28S-rDNA und der CO I wurden freundlicherweise von Frau Jördens zur Verfügung gestellt.
- Vor den phylogenetischen Analysen wurden Bereiche unterschiedlicher Variabilität definiert. Unterschiede zwischen den Substitutions-, Transitions-, Transversions- und allgemeinen Mutationsraten sowohl untereinander als auch zwischen den Variabilitätsbereichen sowie Sättigungen wurden ermittelt. Das phylogenetische Signal wurde mittels Likelihood Mapping verdeutlicht. Phylogenetische Analysen der einzelnen Gene sowie in Kombination der beiden nukleären ribosomalen Gene und aller drei Gene wurden durchgeführt. Dabei wurden die Parsimonie-, die ML- und die Bayes'sche Analyse parallel angewendet. Soweit möglich wurden Signifikanztests durchgeführt. Die zum einen die beiden Hypothesen der Monophylie der Eunicida mit und ohne Dinophilidae gegeneinander und zum anderen die beste Lösung gegen diese beiden Hypothesen und die Hypothese einer Monophylie der Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ verglichen.
- Die Voruntersuchungen an den Datensätzen der einzelnen Gene zeigen bei den drei Genen deutliche Unterschiede der Substitutionsraten sowohl zwischen den einzelnen Variabilitätsbereichen als auch untereinander. Die Muster in den beiden Genen der 28S-rDNA und der 18S-rDNA sind sich relativ ähnlich, allerdings ist die 28S-rDNA

variabler. Die CO I unterscheidet sich deutlich von den beiden anderen Genen in ihrem Muster und in ihrer Variabilität. Es wurde in allen drei Analysen Substitutionsmodelle gewählt die diese Unterschiede adäquat berücksichtigten. In der ML- und der Bayes'schen Analyse wurden die Modelle mittels dem Programm Modeltest bzw. MrModeltest bestimmt.

- In den Analysen der einzelnen Gene zeichnet sich die 18S-rDNA für diese Fragestellungen durch die beste Auflösung aus. Dieses ist auf die niedrige Variabilität sowie die große Anzahl an OTUs zurückzuführen. Die 28S-rDNA ist in der Auflösung wesentlich besser als die CO I und etwa so gut wie die 18S-rDNA. Die CO I alleine ist für Fragestellungen, die die Phylogenie der höheren taxonomischen Einheiten der Polychaeten betreffen, nicht geeignet. Die Kombination mehrerer Gene führte ebenfalls zu einer Verbesserung der Auflösung. Dabei wird die Auflösung mit steigender Zahl der Gene besser.
- Auch in diesen Analysen unterstützen die „posterior probabilities“ mehr Gruppen mit signifikanten Werten und sind immer höher als die BS-Werte. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung der besten Phylogenie der ML-Analyse als Startbaum in der Bayes'schen Analyse schneller und sicherer ins stabile optimale Gleichgewicht führt. Es wird daher empfohlen, diese Option wenigstens als Test für die Etablierung des stabilen optimalen Gleichgewichtes in zukünftigen Analysen zu verwenden.
- Die molekularen Daten lehnen eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu den Eunicida sowie zu den Taxa der ehemaligen „Archiannelida“ mit hoher Wahrscheinlichkeit, allerdings nicht signifikant, ab. Eine mögliche Verwandtschaft zu einem in die Analysen nicht eingegangenen Taxon der Eunicida kann nicht ausgeschlossen werden, da die Monophylie der Eunicida nur in den Analysen aller drei Gene bestätigt wird. Ebenfalls kann eine nähere Verwandtschaft der Dinophilidae zu einem anderen Taxon der „Polychaeta“ nicht mit signifikanter Unterstützung nachgewiesen werden. Da weder die molekularen noch die morphologischen Daten zurzeit eine eindeutige systematische Einordnung der Dinophilidae innerhalb der „Polychaeta“ erlauben, sollten die Dinophilidae wieder als eigenständiges Taxon innerhalb der „Polychaeta“ geführt und keinem anderen Taxon zugeordnet werden. Der progenetische Ursprung der Dinophilidae ist aufgrund morphologischer Untersuchungen gut belegt.
- Die enge Verwandtschaft sowohl von *Parapodrilus psammophilus* als auch *Microdorvillea* sp. n. zu großen kiefertragenden Dorvilleiden mit polytrochen Larven

wird mit signifikanten Werten in allen Analysen unterstützt. Die molekularen Daten unterstützen somit die vermutete progenetische Evolution von wenigstens *Parapodrilus psammophilus*.

- Dadurch dass die Dinophilidae mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in die „Dorvilleidae“ oder Eunicida eingeordnet werden können, ist auch die systematische Einordnung der Gattungen ohne muskulöses Pharynx-Organ (*Apodotrocha* und *Apharyngtus*) in die „Dorvilleidae“ nicht mehr mit eindeutiger Sicherheit gegeben. Sie wurden aufgrund der gleichen morphologischen Merkmale wie die Dinophilidae den „Dorvilleidae“ zu geordnet.
- Die molekular-phylogenetischen Analysen unterstützen nur in den kombinierten Analysen aller drei Gene die Monophylie der Eunicida. Dieser ist wahrscheinlich auf die „explosive Radiation“ dieses Taxons sowie der Taxa der Polychaeten im Allgemeinen zurückzuführen. Die nahe Verwandtschaft von Eunicidae und Onuphidae wird in allen Analysen, außer in denen mit der CO I, signifikant unterstützt.
- Die molekularen Daten unterstützen eine Monophylie der „Dorvilleidae“ nicht. Da der ctenognathe Kieferapparat der „Dorvilleidae“ sehr wahrscheinlich ein plesiomorphes Merkmal innerhalb der Eunicida ist, wird das Taxon auch morphologisch durch kein autapomorphes Merkmal charakterisiert. Die „Dorvilleidae“ sollten deshalb als parapyletisch innerhalb der Eunicida betrachtet werden und mit Anführungsstrichen geführt werden.
- Die systematische Position der Histriobdellidae innerhalb der Eunicida kann basierend auf den Analysen der 18S-rDNA nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings legt die Analyse, die eine Monophylie der Eunicida ohne Dinophilidae erzwingt, eine Verwandtschaft mit *Ophryotrocha gracilis* nahe.
- Zukünftige molekular-phylogenetische Analysen sowohl die Phylogenie der Annelida und im Besonderen der Eunicida als auch die systematische Einordnung der Dinophilidae betreffend sollten vor allem bei den Genen der 28S-rDNA und CO I noch mehr Taxa und Arten umfassen, um der geringen Auflösung der basalen Verzweigungen in allen Analysen und Problemen wie der „long branch attraction“ in zwei der Analysen mit der 28S-rDNA besser zu begegnen. Ferner sollte der Datensatz noch um andere Gene, wie zum Beispiel dem Elongationsfaktor 1 $\alpha$  oder den Histonen, mit einer möglichst großen Zahl an Taxa erweitert werden.





## 6. Literatur

- **Aguinaldo, A. M. A., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A. & Lake, J. A. (1997).** Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**: 489-493.
- **Akaike, H. (1974).** A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr.* **19**: 716-723.
- **Åkesson, B. (1967).** The embryology of the polychaete *Eunice kobiensis*. *Acta Zool.* **48**: 141-192.
- **Åkesson, B. (1977).** Parasite-Host relationships and phylogenetic systematics. The taxonomic position of dinophilids. *Mikrofauna Meeresboden* **61**: 19-28.
- **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1990).** Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage. VCH-Verlag, Weinheim.
- **Allard, M. W. & Carpenter, J. M. (1996).** On weighting and congruence. *Cladistics* **12**: 183-198.
- **Altekar, G., Dwarkadas, S., Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2003).** Parallel Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* (in Review).
- **Anderson, D. T. (1959).** The embryology of the polychaete *Scoloplos armiger*. *Quart. J. Micro. Sci.* **100**: 89-166.
- **Anderson, D. T. (1961).** The development of the polychaete *Haploscoloplos fragilis*. *J. Micro. Sci.* **102**: 257-272.
- **Apakupakul, K., Siddall, M. E. & Burreson, E. M. (1999).** Higher level relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based morphology and gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **12**: 350-359.
- **Avise, J. C. (1994).** Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- **Bahl, A. & Pfenniger, M. (1996).** A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucl. Acids Res.* **24**: 1587-1588.
- **Bayes, T. (1763).** An essay towards solving a problem in the doctrine of chances. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **53**: 370-418. *Erneut gedruckt (1970) in "Studies in the History of Statistics and Probability"* (Pearson, E. S. & Kendall, M. G., eds.), pp. 131-153, Charles Griffin, London.
- **Bleidorn, C., Vogt, L. & Bartolomaeus, T. (2003).** New insights into polychaete phylogeny (Annelida) inferred from 18S rDNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* (in press).
- **Boore, J. L. & Brown, W. M. (1995).** Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris*. *Genetics* **138**: 423-443.
- **Brown, S., Rouse, G., Hutchings, P. & Colgan, D. (1999).** Assessing the usefulness of histone H3, U2 snRNA and 28S rDNA in analyses of polychaete relationships. *Australian J. Zool.* **47**: 499-516.

- **Bruno, W. J. & Halpern, A. L. (1999).** Topological bias and inconsistency of maximum likelihood using wrong models. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 564-566.
- **Buckley, T. R., Arensburger, P., Simon, C. & Chambers, G. K. (2002).** Combined data, Bayesian phylogenetics, and the origin of the New Zealand cicada genera. *Syst. Biol.* **51**: 4-18.
- **Campoy, A. & San Martin, G. (1980).** *Pettiboneia urciensis* sp. n.: un nouveau Dorvilleidae (Polychètes: Errantes) de la Méditerranée. *Cah. Biol. Mar.* **21**: 201-207.
- **Christensen, B. & Theisen, B. F. (1998).** Phylogenetic status of the family Naididae (Oligochaeta, Annelida) as inferred from DNA analyses. *J. Zool. Syst. Evol. Research* **36**: 169-172.
- **Cummings, M. P., Otto, S. P. & Wakeley, J. (1995).** Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 814-823.
- **Cunningham, C. W., Zhu, H. & Hillis, D. M. (1998).** Best-fit maximum-likelihood models for phylogenetic inference: Empirical tests with known phylogenies. *Evolution* **52**: 978-987.
- **Eeckhaut, I., McHugh, D., Marduyln, P., Tiedemann, R., Monteyne, D., Janqoux, M. & Milinkovitch, M. C. (2000).** Myzostomida: a link between trochozoans and flatworms? *Proc. R. Soc. London* **267**: 1383-1392.
- **Efron, B., Halloran, E. & Holmes, S. (1996).** Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13429-13434.
- **Eiby-Jacobsen, D. (1994).** On the nature of the two anterior asetigerous rings in Dorvilleidae and Dinophilidae (Annelida, Polychaeta). In "Actes de la 4ème Conférence internationale des Polychètes (Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, Vol. 163)" (J.-C. Dauvin, L. Laubier & D. J. Reish, eds.), pp. 93-100. Editrons du Museum d'Histoire Naturelle, Paris.
- **Eiby-Jacobsen, D. & Kristensen, R. M. (1994).** A new genus and species of Dorvilleidae (Annelida, Polychaeta) from Bermuda, with a phylogenetic analysis of Dorvilleidae, Iphitimidae and Dinophilidae. *Zool. Scr.* **23**: 107-131.
- **Erséus, C. (1987).** Phylogenetic analysis of the aquatic Oligochaeta under the principle of parsimony. *Hydrob.* **155**: 75-89.
- **Erséus, C. (1990).** Cladistic analysis of the subfamilies within the Tubificidae (Oligochaeta). *Zool. Scr.* **19**: 57-63.
- **Farris, J. S. (1973).** A probability model for inferring evolutionary trees. *Syst. Zool.* **22**: 250-256.
- **Fauchald, K. (1970).** Polychaetous annelids of the families Eunicidae, Lumbrineridae, Iphitimidae, Arabellidae, Lysaretidae and Dorvilleidae from western Mexico. *Allan Hancock Monogr. Mar. Biol.* **5**: 1-335.
- **Fauchald, K. (1977).** The polychaete worm: definitions and keys to the orders, families and genera. Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series 28, 1-190.

- 
- **Fauchald, K. & Rouse, G. W. (1997).** Polychaete systematics: Past and present. *Zool. Scr.* **26**: 71-138.
  - **Felsenstein, J. (1973).** Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* **22**: 240-249.
  - **Felsenstein, J. (1978).** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* **27**: 401-410.
  - **Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368 – 376.
  - **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
  - **Féral, J. P., Phillipe, H., Desbruyères, D., Laubier, L., Derelle, E. & Chenuil, A. (1994).** Molecular phylogeny of the active Pacific Ocean hydrothermal vents alvinellid Polychaetes. *Comptes Rendu de l'Academie des Sciences* **317**: 771-779.
  - **Ferraguti, M. & Erséus, C. (1999).** Sperm types and their use for a phylogenetic analysis of aquatic clitellates. *Hydrobiologia* **402**: 225-237.
  - **Ferraguti, M., Erséus, C., Kaygorodova, I. & Martin, P. (1999).** New sperm types in Naididae and Lumbriculidae (Annelida: Oligochaeta) and their possible phylogenetic implications. *Hydrob.* **406**: 213-222.
  - **Franzén, A. (1977).** Ultrastructure of spermatids and spermatozoa in Archiannelida. *Zoon. Upps.* **4**: 97-107.
  - **Friedlander, T. P., Regier, J. C. & Mitter, C. (1994).** Phylogenetic information content of five nuclear gene sequences in annelids: initial assessment of character sets from concordance and divergence studies. *Syst. Biol.* **43**: 511-525.
  - **George, J. D. & Hartmann-Schröder, G. (1985).** Polychaetes: British Amphinomida, Spintherida and Eunicida. Keys and notes for the identification of the species. Vol. 32. In “Synopsis of the British Fauna.” (D. M. Kermack, and R. S. K. Barnes, eds.), Brill & Backhuys, Leiden.
  - **Giribet, G. (2002).** Current advances in the phylogenetic reconstruction of metazoan evolution. A new paradigm for the Cambrian explosion? *Mol. Phylogenet. Evol.* **24**: 345-357.
  - **Goldman, N., Anderson, J. P. & Rodrigo, A. G. (2000).** Likelihood-based tests of topologies in phylogenetics. *Syst. Biol.* **49**: 652 – 670.
  - **Goldschmidt, R. (1961).** Theoretische Genetik. Akademie-Verlag, Berlin.
  - **Gould, S. J. (1977).** Ontogeny and Phylogeny. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
  - **Graybeal, A. (1998).** Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Syst. Biol.* **47**: 9-17.

- **Gu X., Fu, Y.-X. & Li, W.-H. (1995).** Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Mol. Biol. Evol.* **12**: 546-557.
- **Hall, B. G. (2001):** Phylogenetic trees made easy – A how-to manual for molecular biologists. Sinauer, Sunderland, MA.
- **Hartmann-Schröder, G. (1971).** Annelida, Borstenwürmer, Polychaeta. Die Tierwelt Deutschlands 58. Teil. Gustav Fischer, Stuttgart.
- **Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, K. (1985).** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**: 160-174.
- **Hedges, S. B. (1992).** The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap *P* value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 366-369.
- **Hendy, M. D. & Penny, D. (1989).** A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Syst. Zool.* **38**: 297-309.
- **Hennig, W. (1994).** Wirbellose I. Gustav Fischer, Jena.
- **Hermans, C. O. (1969).** The systematic position of the Archannelida. *Syst. Zool.* **18**: 85-102.
- **Hilbig, B. & Blake, J. (1991).** Dorvilleidae (Annelida: Polychaeta) from the U.S. Atlantic slope and rise. Description of two new genera and 14 new species, with a generic revision of *Ophryotrocha*. *Zool. Scr.* **20**: 147-183.
- **Hillis, D. M. & Dixon, M. T. (1991).** Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Reviews of Biology* **66**: 411-453.
- **Hillis, D. M. & Bull, J. J. (1993).** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 182-192.
- **Huelsenbeck, J. P. (1995).** Performance of phylogenetic methods in simulation. *Syst. Biol.* **44**: 17-48.
- **Huelsenbeck, J. P. (1997).** Is the Felsenstein zone a fly trap? *Syst. Biol.* **46**: 69-74.
- **Huelsenbeck, J. P. & Hillis, D. M. (1993).** Success of phylogenetic methods in the four-taxon case. *Syst. Biol.* **42**: 247-264.
- **Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001).** MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- **Huelsenbeck, J. P., Larget, B., Miller, R. E. & Ronquist, F. (2002).** Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Syst. Biol.* **51**: 673-688.
- **Jägersten, G. (1944).** Zur Kenntnis der Morphologie, Enzystierung und Taxonomie von *Dinophilus*. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* **21**: 1-90.

- 
- **Jouin, C. (1978).** Anatomical and ultrastructural study of the pharyngeal bulb in *Protodrilus* (Polychaeta, Annelida). I. Muscles and myoepithelial junctions. *Tissue Cell* **10**: 269-287.
  - **Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969).** Evolution of protein molecules. In "Mammalian Protein Metabolism" (H.N. Munro, ed.), pp. 21-132, Academic Press, New York.
  - **Jumars, P. (1974).** A generic revision of the Dorvilleidae (Polychaeta), with six new species from the deep North Pacific. *Zool. J. Linn. Soc.* **54**: 101-135.
  - **Kielan-Jaworowska, Z. (1966).** Polychaete jaw apparatus from the Ordovician and Silurian of Poland and a comparison with modern forms. *Acta Palaeont. Pol.* **16**: 1-152.
  - **Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
  - **Kishino, H. & Hasegawa, M. (1989).** Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *J. Mol. Evol.* **29**: 170-179.
  - **Kluge, A. G. (1997a).** Testability and the refutation and corroboration of cladistic hypotheses. *Cladistics* **13**: 81-86.
  - **Kluge, A. G. (1997b).** Sophisticated falsification and research cycles: consequences for differential character weighting in phylogenetic systematics. *Zool. Scr.* **26**: 349-360.
  - **Knippers, R. (1995).** Molekulare Genetik. Georg Thieme, Stuttgart.
  - **Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. & Wilson, A. C. (1989).** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **86**, 6196-6200.
  - **Kojima, S., Segawa, R., Hashimoto, J. & Ohta, S. (1997).** Molecular phylogeny of vestimentiferans collected around Japan, revealed by the nucleotide sequences of mitochondrial DNA. *Marine Biology* **127**: 507-513.
  - **Kondo, R., Satoshi, H. Satta, Y. & Takahata, N. (1993).** Evolution of hominoid mitochondrial DNA with special reference to the silent substitution rate over the genome. *J. Mol. Evol.* **36**: 571-531.
  - **Kozur, H. (1970).** Zur Klassifikation und phylogenetischen Entwicklung der fossilen Phyllococida und Eunicida (Polychaeta). *Freiburger Forschhft. Ser. C* **260**: 35 – 81.
  - **Kristensen, R. M. & Niilonen, T. (1982).** Structural studies on *Diurodrilus* Remane (Diurodrilidae fam. n.), with description of *Diurodrilus westheidi* sp. n.. from the Arctic interstitial meiobenthos, W. Greenland. *Zool. Scr.* **11**: 1-12.
  - **Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C. & Serio, G. (1984).** A new method for calculating evolutionary substitutions rates. *J. Mol. Evol.* **20**: 86-93.

- **Leaché, A. D. & Reeder, T. W. (2002).** Molecular systematics of the Eastern Fence Lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood and Bayesian approaches. *Syst. Biol.* **51**: 44-68.
- **Lecointre, G., Philippe, H., V&acirc;n L&ecirc;e, H. L. & Le Guyader, H. (1993).** Species Sampling has a major impact on phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2**: 205-224.
- **Lemmon, A. R. & Milinkovitch, M. C. (2002).** The metapopulation genetic algorithm: An efficient solution for the problem of large phylogeny estimation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 10516-10521.
- **Martin, P. (2000).** On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**: 1089-1098.
- **Mayr, E. (1969).** Species, speciation, and chromosomes. In "Comparative Mammalian Cytogenetics" (K. Benirschke, ed.), pp. 1-7, Springer Verlag, New York.
- **McHugh, D. (2000).** Molecular Phylogeny of the Annelida. *Can. J. Zool.* **78**: 1873-1884.
- **Mesnil, F. & Caullery, M. (1922).** L'appareil maxillaire d'*Histriobdella homari*; affinités des histriobdellides avec les euniciens. *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris* **174**: 613-617.
- **Mettam, C. (1985).** Functional constraints in the evolution of the Annelida. In "The origins and relationships of lower invertebrates. Vol. 28" (S. C. Morris, J. D. George, R. Gibson, and H. M. Platt, Eds.), pp. 297-309, The Systematics Association, Oxford.
- **Meyer, A. (1994).** Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *TREE* **9**: 278-280.
- **Mierzejewski, P. & Mierzejewski, G. (1975).** Xenognath type of polychaete jaw apparatuses. *Acta Palaeont. Pol.* **20**: 437-443.
- **Milinkovitch, M. C., LeDuc, R. G., Adachi, J., Farnir, F., Georges, M. & Hasegawa, M. (1996).** Effects of character weighting and species sampling on phylogenetic reconstruction: a case study based on DNA sequence data in cetaceans. *Genetics* **144**: 1817-1833.
- **Monro, C. A. A. (1924).** On the post-larval stages of *Diopatra cuprea*, Bosc, a polychaetous annelid of the family Eunicidae. *Ann. Mag. Nat. Hist. (London)* **14**: 193-199.
- **Müller, M. C. (1999).** Das Nervensystem der Polychaeten: Immunohistochemische Untersuchungen an ausgewählten Taxa. Dissertation, Universität Osnabrück.
- **Müller, M. C. M. & Westheide, W. (2002).** Comparative analysis of the nervous systems in presumptive progenetic dinophilid and dorvilleid polychaetes (Annelida) by immunohistochemistry and cLSM. *Acta Zool.* **83**: 33 - 48.
- **Nicholas, K. B. & Nicholas, H. B. jr. (1997).** GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author.

- 
- **Nixon, K. C. & Carpenter, J. M. (1996).** On simultaneous analysis. *Cladistics* **12**: 221-241.
  - **Nylander, J. A. A., Erséus, C. & Källersjö, M. (1999).** A test of the monophyly of the gutless Phalloporinae (Oligochaeta: Tubificidae) and the use of a 573 bp region of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene in analysis of annelid phylogeny. *Zool. Scr.* **28**: 305-313.
  - **Orensanz, J. M. (1990).** The eunicemorph polychaete annelids from Antarctic and Subantarctic seas. With addenda to the Eunicemorpha of Argentina, Chile, New Zealand, Australia, and the southern Indian Ocean. *Biol. Antarc. Seas* **21**: 1-183.
  - **Paxton, H. (1986).** Generic revision and relationships of the family Onuphidae (Annelida: Polychaeta). *Rec. Austr. Mus.* **38**: 1-74.
  - **Pesole, G., Attimonelli, M., Preparata, G. & Saccone, C. (1992).** A statistical method for detecting regions with different evolutionary dynamics in multialigned sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**: 91-96.
  - **Phillipe, H. & Germont, A. (2000).** Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: Long-branch attraction and models of sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 830-834.
  - **Philippe, H., Chenail, A. & Adoutte, A. (1994).** Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny. *Development Suppl.*, 15-25.
  - **Pollock, D. D., Zwickl, D. J., McGuire, J. A. & Hillis, D. M. (2002).** Increased taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Syst. Biol.* **51**: 664-671.
  - **Posada, D. & Crandall, K. A. (2001).** Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst. Biol.* **50**: 580-601.
  - **Purschke, G. (1985a).** Anatomy and ultrastructure of ventral pharyngeal organs and their phylogenetic importance in Polychaeta (Annelida) - I. The pharynx of the Dinophilidae. *Zoomorphology* **105**: 223-239.
  - **Purschke, G. (1985b).** Anatomy and ultrastructure of ventral pharyngeal organs and their phylogenetic importance in Polychaeta (Annelida) - II. The pharynx of the Nerillidae. *Mikrofauna mar.* **2**: 23-60.
  - **Purschke, G. (1987).** Anatomy and Ultrastructure of ventral pharyngeal organs and their phylogenetic importance in Polychaeta (Annelida) - IV. The pharynx and jaws of the Dorvilleidae. *Acta Zool.* **68**: 83-105.
  - **Purschke, G. (2002).** On the ground pattern of Annelida. *Org. Divers. Evol.* **2**: 181-196.
  - **Purschke, G. & Jouin, C. (1988).** Anatomy and ultrastructure of the ventral pharyngeal organs of *Saccocirrus* (Saccocirridae) and *Protodriloides* (Protodriloidae fam. n.) with remarks on the phylogenetic relationships within the Protodrilida (Annelida: Polychaeta). *J. Zool., Lond.* **215**: 405-432.
  - **Purschke, G. & Tzetlin A. B. (1996).** Dorsolateral ciliary folds in the polychaete foregut: structure, prevalence and phylogenetic significance. *Acta Zool. (Stockholm)* **77**: 33-49.

- **Purschke, G., Westheide, W., Rohde, D. & Brinkhurst, R. O. (1993).** Morphological reinvestigation and phylogenetic relationship of *Acanthobdella peledina* (Annelida, Clitellata). *Zoomorphology* **113**: 91-101.
- **Purschke, G., Hessling, R. & Westheide, W. (2000).** The phylogenetic position of the Clitellata and the Echiura – on the problematic assessment of absent characters. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **38**: 165 – 173.
- **Rannala, B. & Yang, Z. H. (1996).** Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* **43**: 304-311.
- **Richards, T. L. (1967).** Reproduction and development of the polychaete *Stauronereis rudolphi*, including a summary of development in the superfamily Eunicea. *Marine Biol.* **1**: 124-133.
- **Regier, J. C. & Shultz, J. W. (1998).** Molecular phylogeny of arthropods and the significance of the Cambrian “Explosion” for molecular systematics. *Amer. Zool.* **38**: 918-928.
- **Rieger, R. M. (1980).** A new group of interstitial worms, Lobatocerebridae nov. fam. (Annelida) and its significance for metazoan phylogeny. *Zoomorphology* **95**: 41-84.
- **Rieger, R. M. (1988).** Comparative ultrastructure and the Lobatocerebridae: Keys to understand the phylogenetic relationship of Annelida and the Acoelomates. In “Microfauna Marina. The Ultrastructure of Polychaeta” (W. Westheide & C. O. Hermans, eds.), pp. 373-382, Fischer, Stuttgart.
- **Rieger, R. M. & Rieger, G. E. (1975).** Fine structures of the pharyngeal bulb in *Trilobodrilus* and its phylogenetic significance within Archiannelida. *Tissue Cell* **7**: 267-279.
- **Rodrigo, A. (1993).** Calibrating the bootstrap test of monophyly. *Int. J. Parasitol.* **23**: 507-514.
- **Rodríguez, F., Oliver, J. L., Marín, A. & Medina, J. R. (1990).** The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* **142**: 485-501.
- **Rota, E., Martin, P. & Erséus, C. (2001).** Soil-dwelling polychaetes: enigmatic as ever? Some hints on their phylogenetic relationship as suggested by a maximum parsimony analysis of 18S rRNA gene sequences. *Contributions to Zoology* **70**: 127-138.
- **Rouse, G. W. & Fauchald, K. (1997).** Cladistics and polychaetes. *Zool. Scr.* **26**: 139-204.
- **Rouse, G. W. & Pleijel, F. (2001).** Polychaetes. Oxford University Press, New York.
- **Rousset, V., Rouse, G. W., Féral, J. P., Desbruyères, D. & Pleijel, F. (2003).** Molecular and morphological evidence of Alvinellidae relationships (Terebelliformia, Polychaeta, Annelida). *Zool. Scr.* **32**: 185-197.
- **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning. A laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.



- 
- **Sanderson, M. J. & Wojciechowski, M. F. (2000).** Improved bootstrap confidence limits in large-scale phylogenies, with an example from Neo-*Astragalus* (Leguminosae). *Syst. Biol.* **49**: 671-685.
  - **Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
  - **Scharnofske, P. (1984).** Anatomie, Ultrastruktur und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane der Dinophilidae und Histriobdellidae (Annelida, Polychaeta). Dissertation, Universität Göttingen.
  - **Scharnofske, P. (1986).** Ultrastructure of sperm morphology of *Trilobodrilus axi* and *T. heideri* (Dinophilidae, Polychaeta). *Helgol. Meeresunters.* **40**: 419-430.
  - **Schirmacher, A., Schmidt, H. & Westheide, W. (1998).** RAPD-PCR investigations on sibling species of terrestrial *Enchytraeus* (Annelida: Oligochaeta). *Biochem. Syst. Ecol.* **26**: 35-44.
  - **Schminke, H.-K. (1981).** Adaptation of Bathynellacea (Crustacea, Syncarida) to life in the interstitial ('Zoëa-Theory'). *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **66**: 578-637.
  - **Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (1999).** Multiple comparisons of log-likelihood's with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1114 – 1116.
  - **Siddall, M. E. & Kluge, A. G. (1997).** Probabilism and phylogenetic inference. *Cladistics* **13**: 313-336.
  - **Siddall, M. E. & Burreson, E. M. (1998).** Phylogeny of leeches (Hirudinea) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. *Mol. Phylogenet. Evol.* **9**: 156-162.
  - **Siddall, M. E. & Whiting, M. F. (1999).** Long-branch abstractions. *Cladistics* **15**: 9-24.
  - **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. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 651-701.
  - **Steel, M. & Penny, D. (2000).** Parsimony, likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 839-850.
  - **Strimmer, K. & Haeseler, A. von (1997).** Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6815-6819.
  - **Struck, T., Westheide, W. & Purschke, G. (2002a).** Progenesis in Eunicida ("Polychaeta", Annelida) - separate evolutionary events? Evidence from molecular data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **25**: 190-199.
  - **Struck, T., Hessling, R. & Purschke, G. (2002b).** The phylogenetic position of the Aeolosomatidae and Parergodrilidae, two enigmatic oligochaete-like taxa of the "Polychaeta", based on molecular data from 18S rDNA sequences. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **40**: 155-163.
  - **Struck, T., Bleidorn, C. & Vogt, L. (2003).** 18S-rDNA and polychaete phylogeny. (in Vorbereitung).

- **Sturmbauer, C. & Meyer, A. (1992).** Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of African cichlid fishes. *Nature* **358**: 578-581.
- **Suzuki, Y., Glazko, G. V. & Nei, M. (2002).** Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16138-16143.
- **Sveshnikov, V. A. (1958).** The morphology of certain eunicemorph (Polychaeta) larvae. *Dokl. Acad. Nauk. SSSR* **121**: 695 – 697.
- **Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. & Hillis, D. M. (1996).** Phylogenetic inference. In “Molecular Systematics” (D. M. Hillis, C. Moritz & B. K. Mable, eds.), Sinauer, Sunderland, MA.
- **Swofford, D. L., Waddell, P. J., Huelsenbeck, J. P., Foster, P. G., Lewis, P. O. & Rogers, J. S. (2001).** Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Syst. Biol.* **50**: 525-539.
- **Takezaki, N. & Gojobori, T. (1999).** Correct and incorrect vertebrate phylogenies obtained by the entire mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 590-601.
- **Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 512-526.
- **Tavaré, S. (1986).** Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lec. Math. Life Sci.* **17**: 57-86.
- **Tempelton, A. R. (1983).** Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution* **37**: 221-244.
- **Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid. Res.* **22**: 4673-4680.
- **Tzetlin, A. B. (1980).** *Ophryotrocha schubrayi* sp. n. und das Problem der Evolution des Kieferapparates der Eunicemorpha (Polychaeta). *Zoologische Zeitschrift* **54**: 665-676.
- **Uhlig, G., Thiel, H. & Gray, J. S. (1973).** The quantitative separation of Meiofauna. *Helgoländer wiss. Meeresunters.* **25**: 173-195.
- **Van de Peer, Y., Baldauf, S. L., Doolittle, W. F. & Meyer, A. (2000).** An updated and comprehensive rRNA phylogeny of (crown) eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances. *J. Mol. Evol.* **51**: 565-576.
- **Waddell, P. J. & Steel, M. A. (1997).** General-time reversible distances with unequal rates across sites: Mixing  $\Gamma$  and inverse Gaussian distributions with invariant sites. *Mol. Phylogenet. Evol.* **8**: 398-414.

- 
- **Wakeley, J. (1994).** Substitution-rate variation among sites and the estimation of transition bias. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 436-442.
  - **Wakeley, J. (1996).** The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *TREE* **11**: 158-163.
  - **Warwick, R. M. (2000).** Are loriciferans paedomorphic (progenetic) priapulids? *Vie et Milieu* **50**: 191-193.
  - **Westheide, W. (1965).** *Parapodrilus psammophilus* nov. gen. nov. spec., eine neue Polychaeten-Gattung aus dem Mesopsammal der Nordsee. *Helgol. wiss. Meeresunters.* **12**: 207-213.
  - **Westheide, W. (1971).** *Apharyngtus punicus* nov. gen. nov. spec., ein aberranter Archiannelide aus dem Mesopsammal der tunesischen Mittelmeerküste. *Mikrofauna Meeresboden* **6**: 1-19.
  - **Westheide, W. (1982).** *Ikosipodus carolensis* gen. et sp. n., an interstitial neotenic polychaete from North Carolina, U.S.A., and its phylogenetic relationships within Dorvilleidae. *Zool. Scr.* **11**: 117-126.
  - **Westheide, W. (1984).** The concept of reproduction in polychaetes with small body size: adaptation in interstitial species. In "Polychaete Reproduction" (A. Fischer & H. D. Pfannenstiel, eds.): *Forsch. Zool.* **29**: 265-287.
  - **Westheide, W. (1985).** The systematic position of the Dinophilidae and the archiannelid problem. In "The origins and relationships of lower invertebrates. Vol. 28" (S. C. Morris, J. D. George, R. Gibson, and H. M. Platt, Eds.), pp. 310-326, The Systematics Association, Oxford.
  - **Westheide, W. (1987).** Progenesis as a principle in meiofauna evolution. *J. Nat. Hist.* **21**: 843-854.
  - **Westheide, W. (1988).** Polychaeta. In "Introduction to the study of meiofauna" (R. P. Higgins & H. Thiel, eds.), Smithsonian Institute Press, Washington D.C..
  - **Westheide, W. (1990).** Polychaetes: Interstitial families. In "Synopsis of the British Fauna, New Series" (D. M. Kermack & R. S. K. Barnes, eds.), Universal Book Services, Oegstgeest.
  - **Westheide, W. (1997).** The direction of evolution within the Polychaeta. *J. Nat. Hist.* **31**: 1-15.
  - **Westheide, W. & Schmidt, P. (1974).** *Trilobodrilus axi* (Polychaeta). Nahrungsaufnahme und Fortpflanzung. Begleitveröffentlichung zum Film E 1955, Encycl. Cinematogr. 1-12.
  - **Westheide, W. & Riser, N. W. (1983).** Morphology and phylogenetic relationships of the neotenic interstitial polychaete *Apodotrocha prognerans* n. gen., n. sp. (Annelida). *Zoomorphology* **103**: 67-87.
  - **Westheide, W., McHugh, D., Purschke, G. & Rouse, G. W. (1999).** Systematization of the Annelida: different approaches. *Hydrobiologia* **402**: 291-307.

- **Westheide, W., Haß-Cordes, E., Krabusch, M. & Müller, M. C. M. (2003).** *Ctenodrilus serratus* (Polychaeta: Ctenodrilidae) is a truly amphi-Atlantic meiofauna species - evidence from molecular data. *Mar. Biol.* **142**: 637-642.
- **Whittingham, L. A., Slikas, B., Winkler, D. W. & Sheldon, F. H. (2002).** Phylogeny of the tree swallow genus, *Tachycineta* (Aves: Hirundinidae), by Bayesian analysis of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **22**: 430-441.
- **Wieser, W. (1994).** Die Evolution der Evolutionstheorie. Von Darwin zur DNA. WBG, Darmstadt.
- **Wilcox, T. P., Zwickl, D. J., Heath, T. & Hillis, D. M. (2002).** Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Mol. Phylogenet. Evol.* **25**: 361-371.
- **Wolf, G. (1980).** Morphologische Untersuchungen an den Kieferapparaten einiger rezenter und fossiler Eunicoidea (Polychaeta). *Senck. marit.* **12**: 1-182.
- **Wuketits, F. M. (1995).** Evolutionstheorien: historische Voraussetzungen, Positionen, Kritik. WBG, Darmstadt.
- **Yang, Z. (1993).** Maximum likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 1396-1401.
- **Yang, Z. (1994).** Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. *J. Mol. Evol.* **39**: 306-314.
- **Yang, Z. (1996a).** Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods. *J. Mol. Evol.* **42**: 294-307.
- **Yang, Z. (1996b).** Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *TREE* **11**: 367-372.
- **Yang, Z. (1998).** On the best evolutionary rate for phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **47**: 125-133.
- **Zhang, J. (1999).** Performance of likelihood ratio tests of evolutionary hypotheses under inadequate substitution models. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 868-875.
- **Zharkikh, A. & Li, W.-H. (1992a).** Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences: I. Four taxa with a molecular clock. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 1119-1147.
- **Zharkikh, A. & Li, W.-H. (1992b).** Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences: II. Four taxa without a molecular clock. *J. Mol. Evol.* **35**: 356-366.
- **Zharkikh, A. & Li, W.-H. (1995).** Estimation of confidence in phylogeny: the full-and-partial bootstrap technique. *Mol. Phylogenet. Evol.* **4**: 44-63.
- **Zwickl, D. J. & Hillis, D. M. (2002).** Increased taxon sampling greatly reduces phylogenetic error. *Syst. Biol.* **51**: 588-598.

## 7. Anhang

### 7.1 Alignment & Variabilitätsbereiche

#### Alignments

Die Alignments der einzelnen Gene sind in den Datei-Formaten Aln (\*.aln), Phylip (\*.phy), PIR (\*.pir), FASTA (\*.aa) und NEXUS (\*.nex) in einem Zip-File auf der Internet-Seite <http://www.biologie.uni-osnabrueck.de/SpezielleZoologie/Struck/Anhang.html> gespeichert.

Sie können mit Programmen wie GeneDoc oder BioEdit geöffnet werden, so dass das Alignment bearbeitet und untersucht werden kann. Ein Link zum Freeware-Programm GeneDoc ist ebenfalls vorhanden. Ferner ist durch die verschiedenen Formate eine Nutzung mit verschiedenen, häufig genutzten molekular-phylogenetischen Programmen möglich.

#### Variabilitätsbereiche

##### *18S-rDNA*

Bei der 18S-rDNA wurden in allen Analysen folgende Positionen aufgrund des nicht eindeutigen Alignments ausgeschlossen:

1-90 114-116 144-169 173-174 214-217 226-228 232-274 278-279 311-401 414-415 427-429 440-442 449-450  
635-636 664-666 670-671 676-677 681-683 841-848 852-870 875-924 930-1026 1037-1039 1053-1056 1063-1064  
1110-1122 1139-1188 1238-1240 1246-1248 1280-1299 1307-1308 1481-1482 1489-1492 1499-1500 1514-1515  
1529-1530 1637-1652 1683-1684 1802-1803 1819-1915 1941-1945 2038-2046 2062-2066 2118-2120 2171-2202  
2280-2438.

In der Analyse, die nur die 18S-rDNA umfasste, wurden folgende Variabilitätsbereiche definiert:

##### Variabilität 0-20%:

190-207 484-489 532-567 598-609 616-627 646-651 772-783 820-831 1078-1083 1189-1191 1324-1335 1402-1413  
1426-1431 1552-1563 1576-1599 1606-1611 1630-1636 1653-1659 1690-1713 1726-1801 1978-1983 2014-2019  
2134-2139 2203-2205 2212-2217 2224-2241.

##### Variabilität 20-40%:

100-113 117 178-189 292-297 418-423 436-439 478-483 568-597 610-615 640-645 652-657 667-669 700-711  
766-771 814-819 832-837 1084-1107 1123-1125 1192-1203 1276-1279 1336-1341 1384-1401 1414-1425  
1432-1443 1444-1455 1456-1461 1522-1527 1546-1551 1600-1605 1624-1629 1660-1665 1678-1682 1714-1725  
1924-1929 1966-1977 1984-1989 1996-2001 2008-2013 2128-2133 2140-2151 2170 2206-2211 2218-2223  
2242-2259.

**Variabilität 40-60%:**

94-99 118-135 170-172 175-177 208-213 275-277 304-310 406-413 416-417 472-477 490-501 526-531 628-634  
 637-639 658-663 678-680 694-699 718-723 730-735 760-765 784-789 871-874 1030-1036 1072-1077 1126-1131  
 1138 1204-1215 1228-1237 1252-1275 1300-1306 1309-1323 1342-1353 1360-1371 1378-1383 1462-1467  
 1510-1513 1528 1531-1533 1540-1545 1564-1575 1612-1623 1666-1677 1685-1689 1804-1818 1918-1923  
 1930-1935 1960-1965 1990-1995 2002-2007 2020-2025 2032-2037 2067-2079 2092-2117 2121-2127 2152-2169  
 2266-2271.

**Variabilität 60-80%:**

91-93 136-143 229-231 280-291 298-303 424-426 430-435 443-448 460-471 508-525 672-675 684-693 712-717  
 724-729 838-840 925-927 1027-1029 1040-1052 1108-1109 1132-1137 1216-1227 1241-1245 1372-1377  
 1493-1498 1501-1509 1516-1521 1534-1539 1946-1959 2026-2031 2047-2061 2080-2091 2260-2265 2272-2279.

**Variabilität 80-100%:**

218-225 402-405 451-459 502-507 736-759 790-813 849-851 928-929 1057-1062 1065-1071 1249-1251 1354-1359  
 1468-1480 1483-1488 1916-1917 1936-1940.

In der Analyse, die die 18S und 28S-rDNA umfasste, wurden folgende Variabilitätsbereiche definiert:

**Variabilität 0-20%:**

94-113 170-172 178-207 275-277 292-297 304-310 406-413 416-423 436-439 472-489 532-585 598-627 637-663  
 678-680 700-711 724-765 772-831 871-874 1030-1036 1078-1109 1189-1209 1228-1237 1252-1257 1276-1279  
 1300-1306 1309-1311 1324-1341 1348-1353 1360-1467 1522-1528 1531-1563 1576-1636 1653-1665 1672-1682  
 1690-1801 1804-1815 1918-1929 1960-1995 2002-2019 2128-2151 2203-2253.

**Variabilität 20-30%:**

130-135 175-177 208-213 229-231 280-285 298-303 430-435 460-465 490-495 586-597 667-669 712-723 766-771  
 832-837 1210-1215 1222-1227 1241-1245 1258-1275 1312-1317 1501-1503 1510-1513 1516-1521 1666-1671  
 1685-1689 1816-1818 1930-1935 1954-1959 1996-2001 2020-2025 2067-2117 2121-2127 2152-2170 2254-2259  
 2266-2271.

**Variabilität 30-100%:**

91-93 117-129 136-143 218-225 286-291 402-405 424-426 443-448 451-459 466-471 496-531 628-634 672-675  
 684-699 838-840 849-851 925-929 1027-1029 1040-1052 1057-1062 1065-1077 1123-1138 1216-1221 1249-1251  
 1318-1323 1342-1347 1354-1359 1468-1480 1483-1488 1493-1498 1504-1509 1564-1575 1916-1917 1936-1940  
 1946-1953 2026-2037 2047-2061 2260-2265 2272-2279.

In der Analyse, die die alle drei Gene umfasste, wurden folgende Variabilitätsbereiche definiert:

Variabilität 0-20%:

94-113 170-172 175-213 229-231 275-277 280-310 406-413 416-423 430-439 454-465 472-489 532-585 592-627  
640-663 667-669 678-680 700-765 772-837 871-874 1030-1036 1078-1109 1123-1125 1189-1209 1222-1237  
1241-1245 1252-1279 1300-1306 1309-1311 1324-1341 1348-1353 1360-1467 1510-1513 1516-1528 1531-1563  
1576-1636 1653-1682 1690-1801 1804-1815 1918-1935 1960-2037 2067-2073 2080-2085 2092-2097 2104-2117  
2121-2163 2203-2259 2266-2271.

Variabilität 20-30%:

91-93 124-143 218-225 443-447 466-471 490-495 520-531 586-591 628-634 637-639 672-675 684-699 766-771  
838-840 925-929 1040-1047 1072-1077 1210-1221 1249-1251 1312-1317 1501-1509 1685-1689 1816-1818  
1916-1917 1936-1940 1946-1959 2047-2061 2074-2079 2086-2091 2098-2103 2164-2170 2260-2265.

Variabilität 30-100%:

117-123 402-405 424-426 448 451-453 496-519 849-851 1027-1029 1048-1052 1057-1062 1065-1071 1126-1138  
1318-1323 1342-1347 1354-1359 1468-1480 1483-1488 1493-1498 1564-1575 2272-2279.

### *28S-rDNA*

Bei der 28S-rDNA wurden in allen Analysen folgende Positionen aufgrund des nicht eindeutigen Alignments ausgeschlossen:

1-22 95-96 116-401 419-424 433-434 440-442 447-463 477-485 494-538 545-575 587-680 687-694 701-758  
846-855 862 868-869 890-920 934-973 979-985 1004-1023 1029-1061 1268-1276 1366-1369 1392-1404  
1410-1411 1491-1492 1496-1497 1661-1662 1666-1697 1741-1745 1771-1772 1908-1998 2003-2005 2046-2047  
2056-2067 2071-2074 2153-2155 2162-2168 2222-2223 2278-2285 2296-2307 2365-2368 2482-2483 2503-2555  
2572-2589 2595-2823 2837-2841 2917-2922 2996-3045.

In der Analyse, die nur die 28S-rDNA umfasste, sowie in der kombinierten Analyse der 18S- und 28S-rDNA wurden folgende Variabilitätsbereiche definiert:

Variabilität 0-20%:

23-63 112-115 796-825 880-885 1090-1113 1126-1185 1192-1233 1240-1263 1282-1317 1330-1359 1405-1409  
1426-1473 1480-1485 1504-1509 1516-1533 1540-1563 1570-1635 1780-1857 1864-1881 2006-2013 2134-2145  
2169-2175 2260-2271 2308-2313 2327-2350 2357-2364 2387-2440 2851-2862 2875-2910 2929-2976 2989-2995.

**Variabilität 20-30%:**

70-81 435-439 790-795 826-837 870-879 974-978 994-999 1072-1077 1084-1089 1114-1125 1186-1191 1234-1239  
1277-1281 1318-1323 1420-1425 1474-1479 1486-1490 1510-1515 1564-1569 1714-1719 1858-1863 2014-2031  
2086-2091 2128-2133 2146-2152 2194-2199 2224-2229 2236-2247 2321-2326 2351-2356 2375-2386 2441-2446  
2842-2850 2869-2874.

**Variabilität 30-50%:**

64-69 406-411 430-432 443-446 580-585 838-845 921-933 986-993 1000-1003 1062-1071 1078-1083 1264-1267  
1324-1329 1360-1365 1370-1383 1412-1419 1498-1503 1534-1539 1636-1653 1663-1665 1708-1713 1720-1725  
1750-1755 1762-1770 1773-1779 1882-1907 2032-2037 2068-2070 2092-2103 2104-2115 2122-2127 2176-2181  
2188-2193 2212-2221 2230-2235 2254-2259 2286-2295 2369-2374 2447-2458 2590-2594 2863-2868 2911-2916  
2923-2928 2977-2988.

**Variabilität 50-70%:**

82-94 97-99 106-111 425-429 490-493 539-544 681-686 695-700 759-777 778-789 863-867 886-889 1384-1391  
1493-1495 1654-1660 1726-1740 1746-1749 1756-1761 2038-2045 2048-2055 2075-2085 2116-2121 2156-2161  
2182-2187 2200-2211 2248-2253 2272-2277 2314-2320 2465-2470 2489-2502 2563-2571 2824-2832.

**Variabilität 70-100%:**

100-105 402-405 412-418 464-476 486-489 576-579 586 856-861 1024-1028 1698-1707 1999-2002 2459-2464  
2471-2481 2484-2488 2556-2562 2833-2836.

In der Analyse, die die alle drei Gene umfasste, wurden folgende Variabilitätsbereiche definiert:

**Variabilität 0-20%:**

23-75 112-115 435-439 443-446 796-837 870-885 974-978 986-1003 1062-1071 1090-1185 1192-1233 1240-1263  
1282-1317 1324-1359 1405-1409 1412-1486 1498-1636 1643-1648 1751-1756 1781-1882 2006-2014 2021-2032  
2048-2050 2068-2070 2087-2098 2123-2152 2169-2182 2189-2194 2219-2221 2237-2248 2261-2272 2308-2314  
2327-2350 2357-2364 2369-2440 2447-2458 2842-2848 2855-2866 2873-2914 2923-2995.

**Variabilität 20-30%:**

76-81 406-411 430-432 790-795 1072-1089 1186-1191 1234-1239 1277-1281 1318-1323 1370-1383 1487-1490  
1637-1642 1649-1654 1709-1732 1763-1770 1773-1780 1883-1907 2015-2020 2099-2116 2195-2200 2213-2218  
2224-2236 2255-2260 2273-2277 2286-2295 2321-2326 2351-2356 2441-2446 2465-2470 2489-2494 2590-2594  
2824-2836 2849-2854 2867-2872.



**Variabilität 30-50%:**

82-94 97-99 425-429 490-493 539-544 580-586 681-686 695-700 759-783 838-845 863-867 886-889 921-933  
1264-1267 1360-1365 1384-1391 1493-1495 1655-1660 1663-1665 1703-1708 1733-1740 1746-1750 1757-1762  
2033-2038 2081-2086 2117-2122 2156-2161 2183-2188 2207-2212 2249-2254 2459-2464 2471-2476 2495-2500  
2556-2571 2915-2916.

**Variabilität 50-100%:**

100-111 402-405 412-418 464-476 486-489 576-579 784-789 856-861 1024-1028 1698-1702 1999-2002 2039-2045  
2051-2055 2075-2080 2201-2206 2315-2320 2477-2481 2484-2488 2501-2502.

*CO I*

Bei der CO I wurden in allen Analysen folgende Positionen ausgeschlossen, da sie den zur Amplifikation eingesetzten Primern entsprechen: 1-27 457-488.

In allen Analysen mit der CO I wurden folgende Variabilitätsbereiche definiert:

Erste Position: 28-4563.

Zweite Position: 29-4563.

Dritte Position: 30-4563.

## **7.2 Danksagungen**

Herrn Prof. Dr. Wilfried Westheide und Herrn Apl.-Prof. Dr. Günter Purschke (Universität Osnabrück) möchte ich herzlich für die Anregung zur Bearbeitung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie für die stete Förderung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, die mir von beiden Gutachtern dieser Arbeit zu Teil wurde, danken.

Herrn Apl.-Prof. Dr. Günter Purschke gilt mein herzlicher Dank ferner auch für das kurzfristige und zeitintensive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ohne das vielfältige Gewebematerial von verschiedensten Arten der Polychaeten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt daher Prof. Dr. Bertil Åkesson (Universität Göteborg, Schweden), Dipl.-Biol. Christoph Bleidorn (Freie Universität Berlin), Dr. Rene Hessling, Dr. Monika C. M. Müller, Anna Paul (Universität Osnabrück), Prof. Dr. Mary Petersen (Universität Kopenhagen, Dänemark), Apl.-Prof. Dr. Günter Purschke, Dipl.-Biol. Wibke Schwerin und Prof. Dr. Wilfried Westheide (Universität Osnabrück), die mir freundlicherweise Tiermaterial zur Verfügung stellten und bei der Bestimmung der Art halfen.

Für die Hilfe durch Rat und Tat bei der Optimierung der verschiedenen Spezifikationen der PCR bin ich Dipl.-Biol. Eva Haß-Cordes und Dipl.-Biol. Janina Jördens (Universität Osnabrück) sehr dankbar. Für die Sequenzen von verschiedenen Primern sowie für Ratschläge zur Modifikation der PCR danke ich Dr. Ralf Bastrop (Universität Rostock), Dr. Kenneth Halanych (Auburn University, USA), Yale Passamaneck (Woods Hole Oceanographic Institute, USA) und Prof. Dr. Martin Schlegel (Universität Leipzig).

Ulrike Coja (Universität Osnabrück) führte die Gelelektrophorese am Sequenzier ABI Prism 377 (Perkin Elmer) in der Arbeitsgruppe Spezielle Botanik durch. Für die stets freundliche und bei Problemen hilfreiche Zusammenarbeit bedanke ich mich recht herzlich.

Eine Einführung in die Welt der molekular-phylogenetischen Analysen gab mir Prof. Dr. Christian Sturmbauer (Universität Graz, Österreich) in einem einwöchigen Kurs an der Universität Innsbruck (Österreich) anno 1999. Für diese ersten Einblicke in eine neue Welt danke ich. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Dipl.-Biol. Christoph Bleidorn und Dr. Lars Vogt (Freie Universität Berlin), mit denen ich zahlreiche Diskussionen über die Stärken

---

und Schwächen der verschiedenen Methoden führte. Die Diskussionen waren sehr fruchtbar. Des Weiteren haben Sie mir Sequenzen der 18S-rDNA von Polychaeten zur Verfügung gestellt genauso wie Dipl.-Biol. Janina Jördens Sequenzen der 28S-rDNA und der CO I, bevor sie in GenBank allgemein zugänglich waren. Auch dafür gilt mein Dank.

Der gesamten Arbeitsgruppe Spezielle Zoologie, inklusive ehemaliger Kolleginnen und Kollegen, möchte herzlich für die freundliche und angenehme Atmosphäre danken, in der die Arbeit Spaß gemacht hat. Besonders bedanken möchte ich bei Eva Haß-Cordes, Janina Jördens, Christine Leutbecher, Monika C. Müller und Andrea Noël für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und privaten Unterhaltungen. Andrea Noël möchte ich außerdem für ihre Hilfe bei den bürokratischen Klippen im Alltag einer Universität danken.

Mein ganz persönlicher und größter Dank gilt meiner geliebten Frau Heike Struck, die mich die gesamte Zeit durch die ungezählten kleinen und großen Hilfen im alltäglichen Leben, besonders in den heißen Phasen, unterstützt und ein Stück weit getragen hat. Genauso gilt mein persönlicher und tiefer Dank meinen Eltern Mechthild und Josef Struck und meiner Schwester Kerstin Struck, die mich in all den Jahren unterstützt und mir durch Rat und Tat geholfen haben. Auch möchte ich mich bei meiner Schwiegermutter Ursula Buchheister für ihren Beistand bedanken. Ohne euch wäre ich jetzt nicht der, der ich bin.

Am Schluss möchte ich meinem Freundeskreis danken, dass er mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt hat (so weit dieses bei mir überhaupt möglich ist).

### ***7.3 Lebens- und Bildungsgang***

#### **Persönliche Daten**

|               |   |
|---------------|---|
| Name, Vorname | Struck, Torsten   |
| Anschrift     | Sterntalerweg 25<br>49479 Ibbenbüren<br>05451/996382<br>struck@biologie.uni-osnabrueck.de |
| Geburtsort    | Ibbenbüren  |
| Geburtsdatum  | 29.05.1973  |
| Familienstand | verheiratet   |
| Konfession    | römisch-katholisch  |

#### **Schulbildung**

|                   |   |
|-------------------|---|
| 08/1979 – 07/1983 | Kardinal-von-Galen-Grundschule Laggenbeck |
| 08/1983 – 06/1992 | Johannes-Kepler-Gymnasium Ibbenbüren      |

#### **Wehrdienst**

|                   |  |
|-------------------|--|
| 07/1992 – 03/1993 | Wehrdienstleistender 5. Transportbatallion 170 in Rheine |
| 04/1993 – 09/1993 | Soldat auf Zeit 5. Transportbatallion 170 in Rheine      |

**Hochschulbildung**

- 10/1993 – 01/1999 Diplom-Studium der Biologie an der Universität Osnabrück mit Schwerpunkt Spezielle Zoologie, Evolutionsbiologie, Molekularbiologie und Biophysik
- 11/1997 Praktikum am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund
- 04/1998 – 01/1999 Diplomarbeit „Molekularbiologische, biochemische und biophysikalische Charakterisierung von mutierten Reverse Transkriptase Enzymen vom Rous Sarkom Virus“ am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund
- 02/1999 Arbeitsuchend
- seit 03/1999 Promotion über das Thema „Progenetische Evolution als Prinzip zur Entstehung neuer Arten innerhalb der Polychaeten am Beispiel der Dinophilidae/Dorvilleidae („Polychaeta“, Annelida)“ in der Arbeitsgruppe „Spezielle Zoologie“ im Fachbereich 05 Biologie/Chemie der Universität Osnabrück
- 05/1999 – 06/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Osnabrück im Fachbereich 05 Biologie/Chemie in der Arbeitsgruppe „Spezielle Zoologie“ mit unterstützender Tätigkeit in der Lehre
- 07/1999 – 11/2000 Stipendiat der Graduiertenförderung des Landes Niedersachsen
- 12/2000 – 06/2002 Stipendiat des Cusanuswerkes
- seit 07/2002 Wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Osnabrück im Fachbereich 05 Biologie/Chemie in der Arbeitsgruppe „Spezielle Zoologie“ mit Schwerpunkt in der EDV-gestützten phylogenetischen Analyse molekularer Daten und unterstützender Tätigkeit in der Lehre

#### **7.4 Publikationen**

**Jördens, J., Purschke, G. & Struck, T. (2003).** Phylogenetic inference of Parergodrilidae and *Hrabeiella periglandulata* ("Polychaeta", Annelida) based on sequences of the CO I, 18S- and 28S-rDNA. (in Vorbereitung).

**Struck, T., Bleidorn, C. & Vogt, L. (2003).** 18S-rDNA and polychaete phylogeny. (in Vorbereitung).

**Struck, T., Westheide, W. & Purschke, G. (2002).** Progenesis in Eunicida ("Polychaeta", Annelida) - separate evolutionary events? Evidence from molecular data. *Mol. Phyl. Evol.* 25: 190-199.

**Struck, T., Hessler, R. & Purschke, G. (2002).** The phylogenetic position of the Aeolosomatidae and Parergodrilidae, two enigmatic oligochaete-like taxa of the "Polychaeta", based on molecular data from 18S rDNA sequences. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 40: 155-163.

**Börgel, C., Lethmate, J., Sommermeyer, J. & Struck, T. (1993).** Blei im Quellwasser – Ein Fallbeispiel zu den ökosystemaren Folgen der Luftverschmutzung. *BIUZ* 23: 63 – 70.

### 7.5 Vorträge & Poster

**Struck, T. & Purschke, G. (2003).** Phylogenetic relationships of small and enigmatic polychaetes based on 18S rDNA sequences. [Poster auf dem "Annual Meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology 2003" in Toronto (Kanada)]

**Struck, T., Bleidorn, C. & Vogt, L. (2002).** 18S-rDNA and polychaete phylogeny. [Vortrag auf dem Symposium "Morphology, Molecules, Evolution and Phylogeny in the Polychaeta and Related Taxa" in Haus Ohrbeck, Osnabrück (Deutschland)].

**Jördens, J., Purschke, G. & Struck, T. (2002).** Phylogenetic inference of Parergodrilidae and *H. periglandulata* ("Polychaeta", Annelida) based on 28S rDNA sequences. [Poster auf dem Symposium "Morphology, Molecules, Evolution and Phylogeny in the Polychaeta and Related Taxa" in Haus Ohrbeck, Osnabrück (Deutschland)].

**Struck, T., Westheide, W. & Purschke, G. (2001).** Progenesis in Eunicida ("Polychaeta", Annelida) - separate evolutionary events? Evidence from molecular data. [Vortrag auf der 7<sup>th</sup> International Polychaete Conference in Reykjavik (Island)]

Der Vortrag wurde mit dem 3. Preis für den Beitrag eines Nachwuchswissenschaftlers honoriert.

**Struck, T., Hessling, R. & Purschke, G. (2001).** The systematic position of two enigmatic oligochaete-like taxa of the Polychaeta based on molecular data: Aeolosomatidae and Parergodrilidae. [Poster auf der 7<sup>th</sup> International Polychaete Conference in Reykjavik (Island)]

**Hessling, R., Struck, T. & Purschke, G. (2000).** On the systematic position of Potamodrilidae and Aeolosomatidae (Annelida). [Vortrag auf dem 8<sup>th</sup> Symposium on Aquatic Oligochaeta in Barcelona (Spanien)]

**Struck, T., Purschke, G. & Westheide, W. (2000).** Are the Dinophilidae progenetic Eunicida („Polychaeta“)? – A molecular genetic approach. *Verh. d. Deutsch. Zool. Gesell.* **93**: 105. [Vortrag auf dem 93. Jahrestreffen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft in Bonn (Deutschland)]

### ***7.6 Eidesstattliche Erklärung über frühere Promotionsversuche***

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Osnabrück, den 16.05.2003

Torsten Struck



## ***7.7 Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistungen***

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen.

1. Prof. Dr. Bertil Åkesson (Universität Göteborg), Dipl.-Biol. Christoph Bleidorn (Freie Universität Berlin), Dr. Rene Hessling, Dr. Monika C. M. Müller, Anna Paul (Universität Osnabrück), Prof. Dr. Mary Petersen (Universität Kopenhagen), Apl.-Prof. Dr. Günter Purschke, Dipl.-Biol. Wibke Schwerin und Prof. Dr. Wilfried Westheide (Universität Osnabrück) stellten freundlicherweise Tiermaterial zur Verfügung und halfen bei der Bestimmung der Art. In Tabelle 1 sind die entsprechenden Arten kenntlich gemacht.
2. Dipl.-Biol. Eva Haß-Cordes und Dipl.-Biol. Janina Jördens (Universität Osnabrück) halfen bei der Optimierung der Bedingungen der Polymerase Kettenreaktion der 18S-rDNA, der 28S-rDNA und der CO I.
3. Ulrike Coja (Universität Osnabrück) führte die Gelelektrophorese am Sequenzierer ABI Prism 377 (Perkin Elmer) durch.
4. Prof. Dr. Christian Sturmbauer (Universität Graz) gab eine einwöchige Einführung in die Methoden der molekularen Phylogenie.

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Person) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Osnabrück, den 16.05.2003

Torsten Struck