

**Seefrösche  
in einer  
Tümpelfrosch-Wasserfrosch-Population**

**in einem anthropogen beeinflussten Habitat.**

von

Peter Beerli

ausgeführt unter der Leitung von

*Dr. Hansjürg Hotz*

*Dr. Hans Heusser*

begutachtet von

*Prof. Dr. Vinzenz Ziswiler*

August 1986

Zoologisches Museum der Universität Zürich  
Winterthurerstrasse 190  
CH-8057 *Zürich*

**DANK**

Für die Hilfe im Feld danke ich D. Kaden, F. Liechti und A. Schläpfer. Für die kritischen Kommentare und Anregungen zu labortechnischen wie methodischen Problemen danke ich G. Guex. B. Schätti korrigierte eine erste Version des Manuskripts. H. Heusser und H. Hotz danke ich für die Betreuung und Einführung in die biochemische Taxonomie. Ohne die grosszügige Unterstützung von V. Ziswiler wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |            |
|--|------------|
| <b>Dank</b> . . . . .                    | <b>iii</b> |
| <b>Einleitung</b> . . . . .              | <b>1</b>   |
| <b>Material und Methode</b> . . . . .    | <b>2</b>   |
| Untersuchungsstandort . . . . .          | 2          |
| Dichtebestimmung . . . . .               | 2          |
| Morphometrie . . . . .                   | 3          |
| Alterbestimmung . . . . .                | 3          |
| Bestimmung des Ploidie-Grades . . . . .  | 4          |
| Enzymbestimmungen . . . . .              | 4          |
| Somatische Gewebe . . . . .              | 4          |
| Oocyten . . . . .                        | 5          |
| <b>Resultate</b> . . . . .               | <b>7</b>   |
| Populationsgrösse . . . . .              | 7          |
| Erythrozyten . . . . .                   | 7          |
| Unterscheidung der Arten . . . . .       | 8          |
| Klassierung nach LDH-1-Allelen . . . . . | 8          |
| Morphologie . . . . .                    | 8          |
| Heterozygotie . . . . .                  | 9          |
| Allelfrequenzen . . . . .                | 9          |
| Elektrophorese der Oocyten . . . . .     | 9          |
| Hemiklone . . . . .                      | 9          |
| Altersverteilungen . . . . .             | 10         |
| <b>Diskussion</b> . . . . .              | <b>11</b>  |
| <b>Zusammenfassung</b> . . . . .         | <b>16</b>  |
| <b>Literatur</b> . . . . .               | <b>17</b>  |
| <b>Abbildungen</b> . . . . .             | <b>23</b>  |
| <b>Tabellen</b> . . . . .                | <b>33</b>  |
| <b>Anhang</b> . . . . .                  | <b>39</b>  |
| Probleme der Enzymdarstellung . . . . .  | 39         |
| Probleme der Altersschätzung . . . . .   | 39         |

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1.  | Trennung der nach LDH-1 bestimmten Arten durch ihre Morphologie . . . . . | 23 |
| 2.  | Zusammenhang zwischen Körperlänge und dem Gewicht . . . . .               | 24 |
| 3.  | Vergleich der 4 Körpermasse zwischen den Arten . . . . .                  | 25 |
| 4.  | Altersverteilung aller Grünfrösche . . . . .                              | 26 |
| 5.  | Altersverteilung der Wasserfrösche . . . . .                              | 27 |
| 6.  | Altersverteilung der Seefrösche . . . . .                                 | 28 |
| 7.  | Verteilung der verschiedenen Hemiklone bei Wasserfröschen . . . . .       | 29 |
| 8.  | Kontrolle der Resorptionen . . . . .                                      | 30 |
| 9.  | Alter und Kopf-Rumpflänge . . . . .                                       | 31 |
| 10. | Altersbestimmung durch "resting lines" . . . . .                          | 32 |

## TABELLENVERZEICHNIS

|    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | Untersuchungstage in der Grube Trubenschloo bei Homburg . . . . . | 33 |
| 2. | Dichteschätzung nach der Weighted-Mean-Methode . . . . .          | 34 |
| 3. | Erythrozytenflächen. . . . .                                      | 35 |
| 4. | Anzahlen der verschiedenen Genotypen . . . . .                    | 36 |
| 6. | Heterozygotiegrade der 5 untersuchten Enzymloci . . . . .         | 36 |
| 5. | Allelfrequenzen der Enzyme GPI und LHD-1. . . . .                 | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 7. Oocyten der Wasserfrosch- und Seefroschweibchen . . . . . | 38 |
| 8. Gefundene Hemiklone der Wasserfrösche . . . . .           | 39 |

## EINLEITUNG

Der Seefrosch (*Rana ridibunda* Pallas 1771) ist ein Elter des in Europa weit verbreiteten hybriden Wasserfrosches (*Rana esculenta* Linnaeus 1758) (Berger 1967, 1968). Wasserfrösche reproduzieren hybridogenetisch (Schultz 1969) und geben das *ridibunda*-Genom klonal weiter, indem sie das Nicht-*ridibunda*-Genom vor der Gametogenese ausschließen (Tunner 1973, 1974; Uzzell et al. 1975, Graf et al. 1977, Tunner & Heppich, 1981, Hotz et al., 1985). Im westlichen Zentraleuropa existieren keine autochthonen *Rana ridibunda*-Populationen (siehe Hotz 1974 a). Hier finden wir Mischpopulationen von *Rana lessonae* Cameraano 1882 und dem Hybriden *esculenta* (das L-E System, Uzzell & Berger 1975). Das *ridibunda*-Genom wird durch Rückkreuzungen mit *lessonae* in *esculenta*-Hybridlinien erhalten (Tunner, 1973, 1974). *R. esculenta* × *esculenta* Kreuzungen erzeugen *ridibunda*-Phänotypen (Berger 1967, 1971 a). Diese Frösche sterben normalerweise vor der Geschlechtsreife, da sich wahrscheinlich auf dem klonal vererbten Genom Letalfaktoren anhäufen (Muller 1964, Berger 1976, Graf & Müller 1979, Uzzell et al. 1980). Binkert (1981) vermutet einen Zusammenhang zwischen Biotoptyp und Letalität der Nachkommen. In anthropogen beeinflussten Kiesgruben ist die Eltern-Art *Rana lessonae* nur mit wenigen Tieren vertreten (Blankenhorn 1974). Dadurch wird eine Testsituation für verschiedene Genkombinationen bei *esculenta* × *esculenta*-Paarungen geschaffen, falls mehrere Hemiklone vorkommen. Diese Arbeit soll Einblick geben in die Strukturen einer isolierten Grünfroschpopulation an einem in neuster Zeit geschaffenen Standort. Durch die gut bekannte Geschichte des untersuchten Standortes sollen auch kurzfristige Zeitphänomene aufgedeckt werden, die bei isolierten und anthropogen beeinflussten Standorten eine wesentliche Rolle spielen dürften.

## MATERIAL UND METHODE

### Untersuchungsstandort

Der untersuchte Standort (Flurname Trubenschloo) liegt im nordöstlichen Mittelland auf dem Seerücken (Landes-Koordinaten 719'950 / 256'650 , 580 m ü.M.). Es ist eine ehemalige Kiesgrube, die allseitig von mindestens 200 m Wald umgeben ist. Die Grube hat eine Fläche von 150 m × 100 m . Sie ist deutlich von anderen Amphibienstandorten isoliert. Die nächste Fundstelle eines Wasserfrosches ist 1.5 km entfernt (Fischteich). Das nächste Grünfrosch-Laichgewässer liegt circa 3 km weit weg (siehe Beerli 1985).

Die Naturschutzbehörde des Kanton Thurgau kaufte 1977 die Grube und stellte sie unter Schutz. Im gleichen Jahr wurden 5 Tümpel ausgehoben. Die grösseren beiden messen ca. 30 m × 30 m respektive 20 m × 7 m und haben ausgedehnte Flachwasserzonen. Die Grube hatte auch 1984 noch starken Pionierbiotopcharakter. Die Pflanzendecke war noch nicht geschlossen, und Gebüsch war nur am Grubenrand vorhanden. Mehr als 80 % der Wasserflächen lagen offen. Nur an den oben genannten Tümpeln waren kleine Röhrichte und submerse Flora vorhanden. Bis 1977 kamen hier nur Geburtshelferkröten (*Alytes obstetricans*) und Fadenmolche (*Triturus helveticus*) vor. Bis 1980 wurden 300 - 500 Gelbauchunken (*Bombina variegata*), 60 - 100 Kreuzkröten (*Bufo calamita*), 30 Laubfrösche (*Hyla arborea*) und ca. 60 Kammolche (*Triturus cristatus*) sowie 20 - 40 Grünfrösche (genaue Artzugehörigkeit unbekannt) eingesetzt (Müller-Meyre, mündl.; eigene Einsetzungen). Alle Tiere wurden aus 2 Kiesgruben (Fallenwiesen, LK 726'000 / 268'600 und Engwilen LK 724'300 / 275'800) entnommen. Diese Standorte wurden zwischen 1977 und 1981 zerstört.

### Dichtebestimmung

Die Grünfrösche wurden ausschliesslich während der Paarungszeit zwischen dem 3. Juni und dem 16. Juli 1984 (Tab. 1) in 9 Nächten

gefangen. Sie wurden mit einer starken Stablampe geblendet. Die irri-  
tierten Tiere liessen sich leicht von Hand fangen. Nach Mondaufgang  
sank die Catchability merklich, da die Tiere den Fänger sahen und  
flüchteten.

Die Populationsdichte und Standardabweichungen wurden nach der  
Weighted-Mean-Methode (Begon 1979) geschätzt. Dichteschätzungs-  
methoden verlangen zufällige Auswahl der Tiere. Es wurde versucht,  
alle Tümpel entsprechend ihrer Grösse mit gleichem Aufwand zu besam-  
meln. Sämtliche Tiere wurden gefangen, auch wenn diese schon mar-  
kiert waren.

### **Morphometrie**

Die Frösche wurden am Morgen nach dem Fang nach folgenden Merkma-  
len ausgemessen: Kopf-Rumpf-Länge, Tibiallänge (auf den nächsten  
Millimeter), Länge und Höhe des Callus internus, Länge des Digitus  
primus (auf den nächsten 1/10 mm) und das Gewicht (auf das Gramm  
genau). Die Längenmasse wurde mit einer Schublehre, das Gewicht  
mit einer Federwaage bestimmt. Die üblichen Trennmass (z.B. Hotz  
1974 b) diskriminieren wegen der Messungenaugigkeit der Länge der 1.  
Zehe schlechter als die Standardisierung Merkmal / Länge. Diese wird  
im Folgenden benutzt wenn Merkmale besprochen werden. Durch eine  
Diskriminanzanalyse (BMDP7M: Dixon 1981) wurden die 4 gemessenen  
Merkmale (relative Fersenhöckerlänge, -höhe, Tibiallänge, Länge der 1.  
Zehe) auf 2 neue Variablen (Canonische Variable 1 und 2) reduziert.  
Die Markierung erfolgte durch Phalangenamputation. Zur Untersuchung  
der Erythrozyten wurde aus der Wunde ein Blutstropfen auf einen  
Objektträger gestrichen und an der Luft getrocknet. Der entfernte  
Finger wurde bei  $-25^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse aufbewahrt. Die Tiere wurden  
vor 12<sup>00</sup> Uhr wieder in der Grube ausgesetzt.

### **Alterbestimmung**

Die Grünfrösche sind während des Winters inaktiv. In dieser Zeit wachsen sie nicht oder nur sehr langsam. Dies führt zu Wachstumsstops in den Knochen (Kleinenberg & Smirina 1969). Die gefrorenen Finger wurden aufgetaut und unter dem Binokular wurde der 2. Phalangenknochen herausgeschnitten. Das restliche Gewebe diente für die Elektrophorese. Der Knochen wurde 2 - 8 Tage zum Entkalken und Vorfärben in Bouin-Lösung (Romeis 1968) gebracht, danach 2 - 4 mal gewässert und dann mit einem Gefriermikrotom (Reichert & Jung Frigocut 2700) geschnitten (10 µm dick). Die Dünnschnitte färbte ich mit Hämatoxylin nach Ehrlich (Romeis 1968). Auf den Präparaten wurden die hämatoxylinophilen Linien gezählt. Zur Kontrolle der Resorption des ersten Wachstumsstops wurden von 70 Tieren die Ringdurchmesser mit einem Messokular bei 100× Vergrößerung gemessen.

### **Bestimmung des Ploidie-Grades**

Von 160 Fröschen wurden die luftgetrockneten Erythrozyten unter dem Mikroskop bei 100× Vergrößerung betrachtet und mit einer Camera lucida (Vergrößerung 1000×) direkt auf ein Digitalisierbrett (Kontron MOP AM/02) projiziert. Hier wurden durch Abtasten der Erythrozytenumfänge die Flächen integriert. Der angeschlossene Kleincomputer (HP-9815A) berechnete die Durchschnitte und die Standardabweichungen der Flächen. Für jedes Tier wurden zwischen 15 und 25 Erythrozyten ausgemessen. Unterschiede der Mittelwerte zwischen den Taxa und den Geschlechtern wurde mit einem Wilcoxon-Test (PROC NPAR1WAY: SAS Institute, 1985) geprüft.

### **Enzymbestimmungen**

**Somatische Gewebe:** Für die Enzymelektrophorese wurden die Überreste der Phalangen (N = 164) oder Muskelproben (N = 23) von getöteten Tieren in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Glaspistill in gleich viel Volumen dest. Wasser homogenisiert. Die Extrakte wurden

mit Filterpapier Whatman Nr. 3 aufgenommen und auf 15%-Stärkegele (Connaught:Electrostarch = 1:1) aufgetragen (Hotz 1983). Als Gel- und Elektrodenpuffer wurde Tris 7.8 mM + 3.3 mM Zitronensäure respektive 0.22 M + 0.09 M benutzt. Die Proteine wurden horizontal bei 11 V / cm während 4 - 5 Stunden bei 8°C mit Eisbedeckung getrennt. Die Filterpapiere wurden nach 15 Minuten Elektrophorese entfernt. Die 1 cm dicke Gelplatte wurde dann in 4 - 5 dünne Scheiben geschnitten. Es wurden Aspartataminotransferase (AAT, Enzyme Commission 2.6.1.1), Glucosephosphatisomerase (GPI, EC 5.3.1.9), der anodale Locus von Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27), Mannosephosphatisomerase (MPI, EC 5.3.1.8) und Phosphoglucomutase (PGM, EC 2.7.5.1) dargestellt. Diese Enzyme trennen die Elternarten beinahe vollständig (Hotz & Uzzell 1983). Alle Enzyme, ausser AAT, wurden in 1% Agar-Overlays nach den Methoden von Shaw & Prasad (1970) und Harris & Hopkinson (1976) gefärbt und anschliessend fotografiert. Die Allele wurden mit Kleinbuchstaben benannt (nach Hotz, 1983).

Zur Kontrolle der Mobilitäten wurden auf jedem Gel Proben mit bekanntem elektrophoretischem Phänotyp aufgetragen. Bei Interpretationsproblemen wurden die Proben in anderer Anordnung und mit anderen Kontrollen nochmals laufen gelassen. Einige Proben zeigten keine interpretierbaren Banden (vergleiche Anhang), diese wurden für die Enzymauswertung nicht berücksichtigt.

**Oocyten:** 17 weiblichen Fröschen injizierte ich intraperitoneal 70 - 200 Units Heparin in 0.1. - 0.4 ml Holtfreterlösung. Sie wurden in ein Wasserbecken mit 0.001 % MS-222 (Fischbetäubungsmittel, Sandoz) gesetzt, und nach 10 Minuten durch Herzpunktion getötet. Blut und die Leber wurden für weitere Untersuchungen tiefgefroren. Die Oocyten wurden in Holtfreter-Lösung gewaschen und nachher bei -25°C für die Analyse aufbewahrt.

Unter einem Binokular mit kleiner Vergrösserung wurden die langsam aufgetauten Oocyten in kalter Holtfreter-Lösung von somatischem Gewe-

be getrennt und mit einer Platinöse einzeln auf Streifen von Whatman No.3 Filterpapier ( $4 \times 8 \text{ mm}^2$ ) aufgetragen und zerdrückt. Das weitere Procedere ist im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Die Grössenbestimmung der Oocyten erfolgte qualitativ mit dem Innendurchmesser einer Platinöse. Alle untersuchten Oocyten entsprechen der mittleren Grössenklasse von Berger (1979) und Uzzell & Berger (1975).

## RESULTATE

### Populationsgrösse

Von 169 gefangenen Grünfröschen waren 82 Weibchen, 15 Männchen und 72 Juvenile. Die Weighted Mean Methode schätzt die Populationsgrösse auf  $246 \pm 45$  (Schätzwert  $\pm T_{\alpha=0.05}$  \* Standardabweichung). Weibchen und Juvenile stellen den grössten Teil der Population (Tab. 2). Jungtiere wurden erst im Juli in grösseren Zahlen gefangen (Tab. 1). Dadurch wird die Schätzung ihrer Anzahl im Vergleich zu den Adulten ungenau. Dies wird durch eine grössere Standardabweichung und einen kleinen Anteil der markierten Tiere an der geschätzten Anzahl der Juvenilen belegt (Tab. 2). Das Geschlechtsverhältnis Weibchen : Männchen war 5.1 : 1. Dieses Missverhältnis wird durch die fehlenden Seefroschmännchen verursacht. Es wurden in 9 Fangtagen 69 weibliche, aber keine männlichen Seefrösche gefangen. Das Geschlechtsverhältnis der *esculenta* war 20 : 11 und das der *lessonae* 2:4. Das Geschlechtsverhältnis der *lessonae* ist statistisch nicht von 1:1 verschieden. Gleichbleibende Überlebensrate vorausgesetzt - für das kurze Untersuchungsintervall plausibel - lassen sich keine Unterschiede in der Fangbarkeit zwischen den Geschlechtern feststellen (Kontingenztafeltest,  $\chi^2 < 1.0$ , 1 Freiheitsgrad).

Im Feld verzichtete ich auf eine Artbestimmung. Also konnte die Dichte der Arten nicht geschätzt werden. Da über 65% der Population markiert wurden, dürften die wahren Anteile ungefähr den gefangenen entsprechen.

### Erythrozyten

Adulte Wasser- und Seefrösche haben signifikant grössere Erythrozyten als Juvenile oder Tümpelfrosch-Männchen. Die Werte für die Tümpelfroschweibchen waren gleich tief, wie die der Männchen, doch genügen 2 Tiere für keinen Test (Tab. 3).

Es wurden 4 Grünfrösche mit grossen Erythrozytenflächen gefunden. Die Flächen waren grösser als der Median + 20%. Es waren 2 *ridibunda*, 1 *esculenta*-Männchen und 1 *esculenta*-Weibchen. Ein Gendosiseffekt liess sich auf den Elektrophoresephotos nicht erkennen. Die Aussehenmorphologie gibt auch keinen Aufschluss, ob diese Tiere triploid waren oder nicht.

### Unterscheidung der Arten

**Klassierung nach LDH-1-Allelen:** Zur Artbestimmung diente der LDH-1-Locus. Die Zuordnung erfolgte durch Vergleiche mit bekannten *ridibunda* (Balkan) und *lessonae* Phänotypen (Flachmoor bei Frauenfeld). In der Tab. 4 sind die in der Grube Trubenschloo gefundenen Genotypen dargestellt. Bei den Seefröschen und bei den Tümpelfröschen waren nur homozygote Zustände der c respektive e Allele vorhanden. Nur die Wasserfrösche zeigten das ganze Spektrum der möglichen Allele (Tab. 5). Die a und b Allele waren aber selten.

**Morphologie:** Die 3 Arten lassen sich morphologisch deutlich trennen (Abb. 1). Tümpelfrösche unterschieden sich von Seefröschen und Wasserfröschen deutlich. Die Morphologie stützte die Klassierung nach LDH-1-Allelen in 93% der Fälle. Bei den abweichenden Tieren muss es sich um Messfehler bei der Fersenhöckerhöhe handeln. Diese ist schwer zu messen und trägt viel zur Trennung bei.

Ein Vergleich von Länge und Gewicht (Abb. 2) zeigt, dass die Wasserfrösche in der Längensklasse 50 - 70 mm fehlten. 81 % der Seefrösche fielen in diese Grössenklasse. Die Wasserfrösche spalteten sich in abgrenzbare Gruppen, die deutlich mit dem Alter korreliert waren (vergleiche Kapitel Alterverteilung).

*Rana ridibunda* liess sich in 3 von 4 Merkmalen (relative Fersenhöckerhöhe, -länge, Tibiallänge) beinahe vollständig von den beiden anderen Arten abtrennen (Abb. 3). Die relative Fersenhöckerhöhe erlaubte eine völlig Trennung der *lessonae* von den *esculenta*. Die Wasserfrö-

sche zeigten morphometrisch mehr Ähnlichkeit mit den Seefröschen als mit den Tümpelfröschen (Abb. 3, Abb. 1).

**Heterozygotie:** Der hybride Zustand der *esculenta* zeigte sich nicht nur in seiner Morphologie, sondern auch in seinen hoch heterozygoten Enzymloci (Tab. 6). GPI lag in mehr als 73% der Wasserfrösche heterozygot vor. Es fanden sich keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern, doch waren juvenile Wasserfrösche noch heterozygoter als die Adulten. Für das gleiche Enzym zeigte *ridibunda* einen erstaunlich hohen Heterozygotiegrad von über 0.75 für GPI (Tab. 6). Die Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht ist mit  $\chi^2 = 25.9$  und 1 Freiheitsgrad stark gesichert. *R. lessonae* war in allen untersuchten Enzymloci homozygot. Die Muskelproben (untersuchte Enzyme: GPI, LDH, MPI, AAT) unterstützen die gefundenen Werte der Zehenproben. Die Wasserfrösche zeigten hier nur heterozygote Muster (Tab. 6).

**Allelfrequenzen:** Allelfrequenzen wurden für die Enzyme GPI und LDH-1 berechnet (Tab. 5). Die Tümpelfrösche zeigten nur das Allel d für GPI und das Allel e für LDH-1. Bei den Wasserfröschen (Anzahl = 93) wurden alle Allele von GPI und LDH-1 gefunden, doch waren die LDH-1-Allele a und b nur in 7 Tieren vorhanden. Die Frequenzen der GPI-Allele der *esculenta* waren zugunsten des d-Allels verschoben. Einige Tiere waren homozygot d/d. In der Population muss also auch ein d-Allel der Seefrösche vorhanden sein, das vom *lessonae*-Allel d nicht zu unterscheiden ist.

**Elektrophorese der Oocyten:** Die Oocyten I der Seefrösche zeigten wie die Muskelproben beide Genprodukte (Tab. 7). 127 von 130 untersuchten Wasserfrosch-Oocyten zeigten nur die *ridibunda*-Allele. Ein Tier hatte Oocyten I, die für GPI heterozygot, aber für LDH-1 homozygot waren.

**Hemiklone:** Die *esculenta* haben eine hemiklonale Vererbung. Das *ridibunda*-Genom wird nicht rekombiniert und unverändert an die näch-

ste Generation übergeben. Es wurden die durch GPI und LDH-1 bestimmten Hemiklone untersucht. Die *esculenta* zeigten die Hemiklone A, D, B und C (Tab. 8). Die Frequenzen der letzten beiden waren gering.

49 Seefrösche hatten Genotypen, die einer Genom-Heterozygotie der *esculenta*-Hemiklone A und D entsprachen. 7 Tiere schienen bei GPI homozygot das a-Allel und 1 Tier das d-Allel zu besitzen. Die Herkunft der heterozygoten *ridibunda* lässt sich durch Paarungen von A und D Hemiklonen der *esculenta* erklären.

### Altersverteilungen

Die einzelnen Arten zeigten in den Altersklassen verschieden starke Präsenz (Abb. 4). *Rana lessonae* erschien nur in den Altersklassen 3 und 4. Alle *Rana ridibunda* waren jünger als 5 Jahre. Nur die *esculenta* waren in jeder Altersgruppe zu finden. In der Altersklasse 2 und 3 waren sie jedoch nur mit 5 respektive 1 Tier vertreten (Abb. 4). Die Seefrösche konzentrieren sich gerade in diesen zwei Klassen. Die Histogramme der einzelnen Arten zeigen das "Loch" der *esculenta* und den Peak der *ridibunda* besonders deutlich (Abb. 5, Abb. 6). Der D-Klon war in jeder Alterklasse am häufigsten (Abb. 7, siehe auch Tab. 5). B und C waren nur vereinzelt zu finden. Nur der Klon A ist gleichmässig, wenngleich nicht sehr häufig, über alle Altersklassen verteilt. Die ältesten 2 Hemiklone A und D (in Tieren älter als 6 Jahre) dürften aus den zerstörten Gruben Engwilen und Fallenwiesen entnommen worden sein. In den *ridibunda*-Phänotypen fanden sich nur Allelkombinationen, die den Klonen A und D entsprachen. Diese beiden Klone wurden bei den Wasserfröschen ( $N_{\text{Klon A}} = 1, N_{\text{Klon D}} = 6$ ) der Altersklassen über 5 Jahre festgestellt. In den Jahren 1982/83 müssen vor allem solche Inter-Hemiklon-Paarungen erfolgreich gewesen sein. Dies führte zu einem deutlichen Anstieg der *ridibunda*. Bei gleichzeitiger Absenz der *lessonae* erklärt dies auch das Absinken der *esculenta*-Teilpopulation während 1981 bis 1983.

## DISKUSSION

Die Populationsdichte der Grünfrösche in der Grube Trubenschloo ist im Vergleich zu ähnlichen Standorten gering und scheint noch nicht an eine Kapazitätsgrenze gestossen zu sein. Beerli & Liechti (1983) schätzten 1982 mit der gleichen Methodik den Bestand auf  $76 \pm 4$  Grünfrösche, ohne die kleinste Altersklasse. Wir fingen damals 72 Tiere. Von diesen waren 4 sichere Seefrösche und 68 Wasserfrösche (Hotz, pers. Mitt.). Die Population hat sich innerhalb von 2 Jahren auf  $246 \pm 45$  verdreifacht. Blankenhorn et al. (1969) schätzten in Biotopen mit der Hälfte oder einem Viertel der Fläche der Grube Trubenschloo die Grünfroschbestände auf 75 - 220 und 215 - 350. Diese Zahlen entsprechen eigenen Beobachtungen in einer alten Kiesgrube (ein Viertel der Fläche des Trubenschloos) mit 320 - 540 Fröschen (unpubl. Daten, 1984).

- Die Bestimmung des Alters der Tiere durch resting lines ermöglicht eine bessere Aufteilung und Strukturerkennung der Population. Durch Resorptionen von Knochenmaterial werden jedoch präzise Aussagen weitgehend erschwert. Kleinenberg & Smirina (1969), Smirina (1972), Borkin et al. (1979) addieren zum gefundenen Alter 2 Jahre. Hemelaar & van Gelder (1980) und Hemelaar (1985) untersuchten mit Regressionsanalysen die Durchmesser der einzelnen Hämatoxylinringe, um Resorptionen zu erkennen. Diese Korrekturen sind bei den vorliegenden Daten nicht angebracht. Da in früheren Jahren in der Grube keine Altersuntersuchungen an den Grünfröschen gemacht wurden, konnten keine Kontrolle an gleichen Individuen durchgeführt werden. Änderungen der Umwelt (Biotop, Mikroklima) können zu verschiedenen Wachstumsraten führen. Durch Vergleiche mit der Länge und dem Gewicht scheinen die Aussagen für die einzelnen Altersklassen zu genügen, aber nicht für jedes Individuum. Die Längenangaben von Hemmer (1977) für juvenile *esculenta* sind mit denen der untersuchten

Juvenilen vergleichbar. Die Alterstruktur der gesamten Grünfroschpopulation zeigt gleiche Häufigkeiten einzelner Altersklassen wie dies Borkin et al. (1979) bei *lessonae*-Populationen fanden. Die Alterssverteilungen der einzelnen Arten sind instabil, so sind Vergleiche mit anderen Arbeiten kaum möglich, da keine Altersparameter geschätzt werden konnten.

Die *ridibunda* aus der Grube Trubenschloo waren nur Weibchen. Eingeführte Seefroschpopulationen zeigen nie ein solch extremes Geschlechtsverhältnis (eigene Beobachtungen). Kreuzungsexperimente von Berger (1967, 1971 c), Tunner & Dobrowsky (1976) und Binkert (1981) zeitigten aus *esculenta* × *esculenta* Paarungen immer nur weibliche Nachkommen. Es wird angenommen, dass im *ridibunda*-Genom kein männchenbestimmender Faktor vorhanden ist, da durch die Bevorzugung von grösseren Weibchen der *lessonae*-Männchen (Blankenhorn, 1974) nur Primärhybridisierungen zwischen *lessonae*-Männchen und *ridibunda*-Weibchen stattfanden. Weiter lässt die homogene Altersverteilung der Seefrösche eine Einsetzung der Seefrösche unwahrscheinlich erscheinen. Da 1982 in der Grube wahrscheinlich keine *lessonae* vorhanden waren (Beerli & Liechti 1983 und Hotz schriftl.), paarten sich die *esculenta* unter sich. Die Oocyten der Wasserfrösche zeigen bis auf diejenigen eines Tieres keine Abweichungen vom bekannten hybridogenetischen Ausschluss des *lessonae*-Genoms in der Keimbahn. Also wurden 1982 nur *ridibunda*-Nachkommen erzeugt. Das abweichende Tier könnte mindestens teilweise rekombiniert haben, doch müssten hier noch mehr verschiedene Enzymloci untersucht werden.

Die Unterschiedlichkeit der 2 Genome in einem Grünfrosch kann als Mass der Vitalität des Individuums dienen. Wasserfrösche als somatische Hybriden mit einem *lessonae* und einem *ridibunda* Genom sind vitaler und anpassungsfähiger als die Elternarten. So zeigen sie weni-

D  
o

ger Sterblichkeit durch O<sub>2</sub>-Verlust (Tunner & Nopp, 1979), Crowding (Heusser & Blankenhorn, 1973) und ein schnelleres Larvalwachstum (Berger 1971 c). Die Seefrösche sind an grössere, die Tümpelfrösche an kleine, flache und eher saure Wasserkörper angepasst (Heym, 1974). Da die *esculenta* ihr *ridibunda*-Genom klonal weitergeben, werden diese Genome normalerweise nicht rekombiniert (in wenigen Fällen wurden jedoch Rekombinationen festgestellt, Übersicht in Uzzell et al. 1980). Die *ridibunda*-Genome in einer Population sind deshalb relativ homomorph. *R. ridibunda* aus *esculenta* × *esculenta* Paarungen mit gleichen Hemiklonen sind höchst homozygot. Diese Nachkommen sterben meist in der 5. - 9. Larvalwoche oder nach der Metamorphose vor Erreichen der Geschlechtsreife (Berger, 1971 c; Blankenhorn, Heusser & Vogel, 1971; Tunner, 1980; Binkert, Borner & Chen, 1982). Wenige *esculenta* × *esculenta*-Kreuzungen zeitigten metamorphosierende *ridibunda*-Phänotypen (= Durchbrenner, nach Binkert, 1981) (Berger, 1971 c, Binkert, Borner & Chen, 1982; Tunner & Dobrowsky 1976). Diese Durchbrenner sind weniger vital als die anderen Grünfrösche (Berger, 1971 c, Tunner & Nopp, 1979).

Der unterschiedliche Ursprung der *esculenta* in der Grube Trubenschloo lässt eine minimale Verschiedenheit der Genome erwarten. Diese manifestiert sich in verschiedenen Hemiklonen. Durch Paarungen zwischen Hybriden verschiedener Hemiklone werden Letaleffekte, die sich auf klonal vererbten Genomen anhäufen, gemildert. Durch die eingeschränkte Variabilität kann ein Tier kaum auf schnelle Umweltänderungen oder interaktive Stressfaktoren reagieren (O'Brien, 1983; O'Brien et al., 1985). Das Vorkommen von Durchbrennern im Freiland scheint durch die Häufigkeit verschiedener Hemiklone, von der Anzahl möglicher Paarungen der *esculenta* inter se und von den Umweltfaktoren abzuhängen. In der jungen und isolierten Grube Trubenschloo waren in den Jahren 82/83 die Tierbestände klein (kein Crowding). Räuber der Froschlärven oder der Adulten waren ausser

Insektenlarven (Libellen, Schwimmkäfer) und eventuell Molchen keine zu finden. Fische, die zu den grossen Kaulquappenräubern zählen (Clausnitzer 1983), fehlen völlig.

49 von 58 Seefrösche waren heterozygot. Erfolgreich schienen *esculenta*-Paarungen mit den *ridibunda*-Genom-Klonen A und D. 1984 zeichnete sich ein Schwinden der Seefroschpopulation ab. Parallel dazu stieg die Anzahl der juvenilen Wasserfrösche enorm. Zudem wurden auch 6 Tümpelfrösche gefunden, die 1982 fehlten. Die Durchbrennerzahl scheint direkt mit der Anzahl der *lessonae*-Männchen zusammenzuhängen. Diese zeigen Präferenzen für grosse Weibchen (also *esculenta*) und sind sexuell aktiver als die *esculenta*-Männchen (Blankenhorn, 1977). Die Paarungshäufigkeit zwischen den Wasserfröschen sinkt dadurch stark und die Wahrscheinlichkeit für Genomkombinationen, die vitale Durchbrenner erzeugen, wird klein. Es wäre an anderen Standorten zu prüfen, ob die Anzahl der Durchbrenner allein von der hohen Paarungshäufigkeit der *esculenta* inter se abhängt. Binkert (1981) hat von Standorten mit einem sehr hohen *esculenta*-Anteil bei Kreuzungsversuchen auch Durchbrenner erhalten. In 3 der 5 untersuchten *ridibunda*-Weibchen sind die Oocyten gleich gross wie die *esculenta*-Oocyten. Die Elektrophoresedaten der Oocyten der *ridibunda* zeigen bei GPI und MPI heterozygote Muster. So ist zu erwarten, dass diese Durchbrenner eine ordentliche Meiose machen und auch rekombinieren. Dadurch können aber ein neuer *ridibunda*-Genom-Klon entstehen. Durch Hybridisierung mit einem Tümpelfroschmännchen findet dann dieser neue Klon wieder in *esculenta*-Linien. Bei einem Verhältnis von 59 Durchbrenner- zu 20 Wasserfroschweibchen und 4 Tümpelfroschmännchen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Paarung zwischen *lessonae*-Männchen  $\times$  *ridibunda*-Weibchen zu rechnen. Dadurch werden rekombinierte *ridibunda*-Genome in den *ridibunda*-Genom-Pool der *esculenta* gelangen. Falls diese neuen Genkombinationen erfolgreich sind, kann mithilfe der Hemiklone nur noch bedingt auf genetische Verschie-

denheit geschlossen werden. Denn diese Rekombinationen sind von ursprünglichen Primärhybridisationen mit der benutzten Methode nicht zu unterscheiden.

Wenn die verschiedenen Hemiklone in einem Durchbrenner zusammentreffen werden Faktoren aussortiert, deren Auftreten für einen Hybriden nicht letal, aber zumindestens subletal sind. Durch Einbringen dieser "gereinigten Genome" in *esculenta*-Hemiklone kann vielleicht das lange Persistieren der Hybridlinien weit weg vom normalen Verbreitungsgebiet der *ridibunda* besser verstanden werden.

Das beschriebene Ereignis scheint zumindest im westlichen Mitteleuropa selten einzutreten. Die äusseren Umstände wie Isolationen von ausgesetzten reinen Wasserfroschbeständen mit genügend verschiedenen *ridibunda*-Genomen sind jedoch auch selten so stark ausgeprägt wie am Untersuchungsstandort.

### ZUSAMMENFASSUNG

Wasserfrösche (*Rana esculenta*) sind die hybridogenetischen Hybriden von Seefröschen (*Rana ridibunda*) und Tümpelfröschen (*Rana lessonae*). In Mitteleuropa sind diese meist mit den Tümpelfröschen vergesellschaftet. Die Wasserfrösche schliessen in der Keimbahn das Genom des Tümpelfrosches aus und geben das Seefroschgenom klonal weiter. Bei Kreuzungen inter se treffen sich 2 klonal vererbte Genome mit wahrscheinlich angehäuften Letalfaktoren, so dass meistens keine Jungtiere aus diesen Paarungen resultieren. Bei Paarungen zwischen Tieren aus verschiedenen Regionen wird angenommen, dass diese genügend verschiedene Genome haben, um lebensfähige Nachkommen zu erzeugen. Diese sind alles weibliche Seefrösche. In der Grube Trubenschloo bei Homburg wurden zwischen 1977 und 1980 Amphibien eingesetzt. Die Grünfrösche wurden aus zwei Kiesgruben, die voneinander getrennt waren, eingesetzt. 1984 war die Populationsdichte der Grünfrösche  $246 \pm 45$ . Das Geschlechtsverhältnis betrug 5 : 1 zugunsten der Weibchen. Diese starke Abweichung wurde durch 69 weibliche und keine männlichen Seefrösche erzeugt. Die Artzugehörigkeit dieser Tiere wurden eindeutig durch ihre Morphologie und Enzymmuster bestimmt. Die Altersbestimmung durch Phalangenquerschnitte ergab eine homogene, aber instabile Altersstruktur der Seefrösche. Juvenile und alte Seefrösche wurden ~~keine~~ gefunden. Die Wasserfrösche zeigten aber während des Maximums der Seefroschpopulation ein Minimum. 1982 konnten keine Tümpelfrösche nachgewiesen werden. Die verschiedenen Seefrosch-Allele der Enzyme der Wasserfrösche finden sich in heterozygotem Zustand auch in den Seefröschen. Die homogene Altersverteilung, das Fehlen von Seefroschmännchen und Tümpelfröschen im Jahr 1982 und die hohe Heterozygotie der gefunden Seefrösche schlagen deren Entstehung aus Hybrid  $\times$  Hybrid- Paarungen an Ort und Stelle vor. Es ist also möglich, im Freiland lebende, adulte Nachkommen von Paarungen zwischen Wasserfröschen zu finden. Die Möglichkeit ist aber klein,

H1 kann

einen Standort zu finden, der genügend grosse Zahlen von solchen nicht ausgesetzten Seefröschen zeigt. Durch die grosse Anfälligkeit gegenüber Stressfaktoren werden diese Inter se-Tiere wohl nur kurze Zeit in Pionierbiotopen zu finden sein. Mit der zunehmenden Reife eines Biotops werden immer mehr Nischen besetzt und die nicht konkurrenzfähigen Tiere wahrscheinlich verdrängt. Durch Einwanderung von Tümpelfröschen dürfte das Gleichgewicht schnell zugunsten der Wasserfrösche verschoben werden und Seefrösche können kaum mehr gefunden werden. Das Zusammentreffen der verschiedenen Seefroschgenome erzeugt eine weitere Komplikation. Durch Verpaarung eines heterozygoten Seefrosches mit einem Tümpelfrosch-Männchen kann ein rekombiniertes Genom in den *ridibunda*-Genompool der Wasserfrösche geschleust werden, so dass neue Hemiklone ohne Primärhybridisation entstehen können.

#### LITERATUR

- Beerli, P. (1985): Amphibieninventar des Kantons Thurgau (1981 - 1983) . Mitt. thurg. naturf. Ges. 46 : 8 - 52.
- Beerli, P., F. Liechti (1983): Dichteschätzung von Amphibien an einem Sekundärstandort. unveröffentlichte Semesterarbeit, Universität Zürich, 26 Seiten.
- Begon, M. (1979): Investigating Animal Abundance. Edward Arnold (Publishers) Limited, London : 97 Seiten.
- Berger, L. (1967): Embrional and larval development of F<sub>1</sub> generation of green frogs different combinations. Acta Zoologica Cracoviensia 12(7) : 123 - 160.
- Berger, L. (1968): Morphology of the F<sub>1</sub> Generation of Various Crosses within *Rana esculenta* Complex. Acta Zoologica Cracoviensia 23 (13) : 301 - 324.

- Berger, L. (1971 a): Inheritance of Sex and Phenotype in F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> Crosses within *Rana esculenta* Complex. *Genetica Polonica* 12 (4) : 517 - 521.
- Berger, L. (1971 b): Sex Ratio in the F<sub>1</sub> Progeny within Forms of *Rana esculenta* Complex. *Genetica Polonica* 12 (1-2) : 87 - 101.
- Berger, L. (1971 c): Viability, Sex and Morphology of F<sub>1</sub> Generation within Forms of *Rana esculenta* Complex. *Zoologica Poloniae* 21 (4) : 345 - 393.
- Berger, L. (1976) Hybrids of B<sub>2</sub> generation of European water frogs (*Rana esculenta* complex). *Annales zoologici* 33 (12) : 201 - 214.
- Berger, L. (1979) Egg size as an index of phenotype in progeny of *Rana esculenta* females. *Mitt. zool. Mus. Berlin* 55 (1) : 187 - 202.
- Binkert, J. A. (1981): Untersuchungen über die Letalität der Inter se - Kreuzung von *Rana esculenta*. Dissertation Universität Zürich : 93 pp.
- Binkert, J., P. Borner und P. S. Chen (1982): *Rana esculenta* complex: An experimental analysis of lethality and hybridogenesis. *Experientia* 38 : 1283 - 1292.
- Blankenhorn, H.J. (1974): Soziale Organisation einer Mischpopulation von *Rana lessonae* Camerano und *Rana esculenta* Linnaeus. Dissertation Universität Zürich : 155 pp.
- Blankenhorn, H.J. (1977): Reproduction and Mating Behavior in *Rana lessonae*-*Rana esculenta* mixed Populations. In : Taylor, D.H., S.I. Guttman (Ed.) : The reproductive biology of amphibians. Plenum Press, New York und London : 389 - 410.
- Blankenhorn, H. J., H. Burla, P. Müller-Meyre und M. Villiger (1969): Die Bestände an Amphibien zur Laichzeit in 3 Gewässern des Kan-

tons Zürich. Vierteljahresschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich 114 (3) : 255-267.

**Blankenhorn, H. J., H. Heusser und P. Vogel (1971):** Drei Phänotypen von Grünfröschen aus dem *Rana esculenta*-Komplex in der Schweiz. *Revue suisse Zoologique* 78 : 1242 - 1247.

**Borkin, L. Ja., W.I. Garanin, N.T. Tichenko und I.A. Zaune (1979):** Some Results in the Green Frogs Survey in the USSR. *Mitt. Zool. Mus. Berlin* 55 (1) : 153 - 170.

**Clausnitzer, H.-J. (1983):** Zum gemeinsamen Vorkommen von Amphibien und Fischen. *Salamandra* 19 (3) : 158 - 162.

**Dixon, W.J. (Ed.) (1981):** BMDP statistical software. University of California Press, Berkley : X + 726 Seiten.

**Graf, J.-D., F. Müller (1979):** Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* Complex: *Experientia* 35 (12): 1574 - 1576.

**Graf, J.-D., F. Karch und M.-C. Morreillon (1977):** Biochemical variation in the *Rana esculenta* Complex: A new hybrid form related to *Rana perezi* and *Rana ridibunda*. *Experientia* 33 : 1582 - 1584.

**Harris H., D.A. Hopkinson (1978):** Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Company.

**Hemelaar A. (1985):** An Improved Method to estimate the Number of Year Rings resorbed in Phalanges of *Bufo bufo* (L.) and its Application to Populations from Different Latitudes and Altitudes. *Amphibia - Reptilia* 6 : 323 - 341.

**Hemelaar, A., J. J. Van Gelder (1980):** Annual growth in phalanges of *Bufo bufo* (Anura, Amphibia) from the Netherlands and their use for Age determination. *Netherlands Journal of Zoology* 30 (1) : 129 - 135.

Hemmer, H. (1977): Studien an einer nordwestdeutschen Grünfroschpopulation als Beitrag zur Bestimmungsproblematik und zur Rolle der Selektion im *Rana esculenta*-Komplex (Amphibia: Salientia: Ranidae). *Salamandra* 13 (3/4) : 166 - 173.

Heusser, H. , H. J. Blankenhorn (1973): Crowding - Experimente mit Kaulquappen aus homo- und heterotypischen Kreuzungen der Phänotypen *esculenta*, *lessonae* und *ridibunda* (*Rana esculenta* - Komplex, Anura, Amphibia). *Revue suisse Zool.* 80 (2) : 543 - 569.

Heym, W.-D. (1974): Studien zur Verbreitung, Ökologie und Ethologie der Grünfröschen in der mittleren und nördlichen Niederlausitz. *Mitt. Zool. Mus. Berlin* 50 (2) : 264 - 285.

Hotz, H. (1974 a): Ein Problem aus vielen Fragen - europäische Grünfrosche (*Rana esculenta*-Komplex) und ihre Verbreitung. *Natur & Museum* 104 (9) : 262 - 272

Hotz, H. (1974 b): Biometrische Untersuchung an europäischen Grünfroschpopulationen des *Rana esculenta* - Komplexes (Amphibia, Salientia). Diplomarbeit Universität Zürich : 74 Seiten.

Hotz, H. (1983): Genic Diversity among Water Frog Genomes inherited with and without Recombination. Dissertation Universität Zürich :136 pp.

Hotz, H. und T. Uzzell (1983): Interspecific hybrids of *Rana ridibunda* without germ line exclusion of parental genom. *Experientia* 39 : 538 - 540.

Hotz, H., G. Mancino, S. Bucci-Innocenti, M. Raghianti, L. Berger and T. Uzzell (1985): *Rana ridibunda* Varies Geographically in Inducing Clonal Gametogenesis in Interspecific Hybrids. *Journal of Experimental Zoology* 236 : 199 - 210.

- Kleijnenberg S. E., E. M. Smirina (1969): A contribution to the method of age determination in amphibians. Zool. Zh. 52: 752 - 765.
- Muller, H. J. (1964): The relation of recombination to mutational advance. Mutational research 1 : 2 - 9.
- Romeis, B. (1968): Mikroskopische Technik. R. Oldenbourg Verlag, München-Wien 1968, 757 Seiten.
- SAS Institute Inc. (1985): SAS User's Guide: Basics, Version 5 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1985, 1290 Seiten
- Shaw, C.R., R. Prasad (1970): Starch gel electrophoresis of enzymes - a compilation of recipes. Biochemical genetics 4 (2): 297 - 320.
- Schultz, R. J. (1969): Hybridization, unisexuality and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. American Naturalist 103 (934) : 605 - 619.
- O'<sup>e</sup>Brian, S. J. (1983): The Cheetah is Depauperate in Genetic Variation. Science 221 : 459 - 462.
- O'<sup>e</sup>Brian, S. J., M.E. Roelke, L. Marker, A. Newman, C.A. Winkler, D. Meltzer, L. Colly, J.F. Evermann, M. Bush, D.E. Wildt (1985): Genetic Basis for Species Vulnerability in the Cheetah. Science 227 : 1428 - 1434.
- Smirina E. M. (1972): Annual Layers in Bones of *Rana temporaria* Zool. Zh. 51 (10) : 1529 - 1534.
- Tunner H. G. (1973): Demonstration of the Hybrid Origin of the Common Green Frog *Rana esculenta* L. Naturwissenschaften 60 : 481 - 482.

Tunner, H. G. (1974): Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation. Zeitschrift für Zool. Systematik und Evolutions-Forschung 12 (4) : 309 - 314.

Tunner, H. G., M.-Th. Dobrowsky (1976): Zur morphologischen, serologischen und enzymologischen Differenzierung von *Rana lessonae* und der hybridogenetischen *Rana esculenta* aus dem Seewinkel und dem Neusiedlersee (Österreich, Burgenland). Zool. Anz. 197 (1/2) : 6 - 22.

Tunner, H. G. und H. Nopp (1979): Heterosis in the Common European Water Frog. Naturwissenschaften 66 : 268 - 269.

Tunner, H. G., S. Heppich (1981): Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. Naturwissenschaften 68 (4) : 207 - 208.

Uzzell, T., L. Berger (1975): Electrophoretic Phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and their hybridogenetic Associate, *Rana esculenta*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 127 (2) : 13 - 24.

Uzzell, T., R. Günther und L. Berger (1975): Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (Amphibia, Salientia). Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 127 (11) : 81 - 91.

Uzzell, T., H. Hotz und L. Berger (1980): Genome Exclusion in Gametogenesis by an Interspecific *Rana* Hybrid: Evidence From Electrophoresis of Individual Oocytes. Journal of Experimental Zoology 214 : 251 - 259.

ABBILDUNGEN

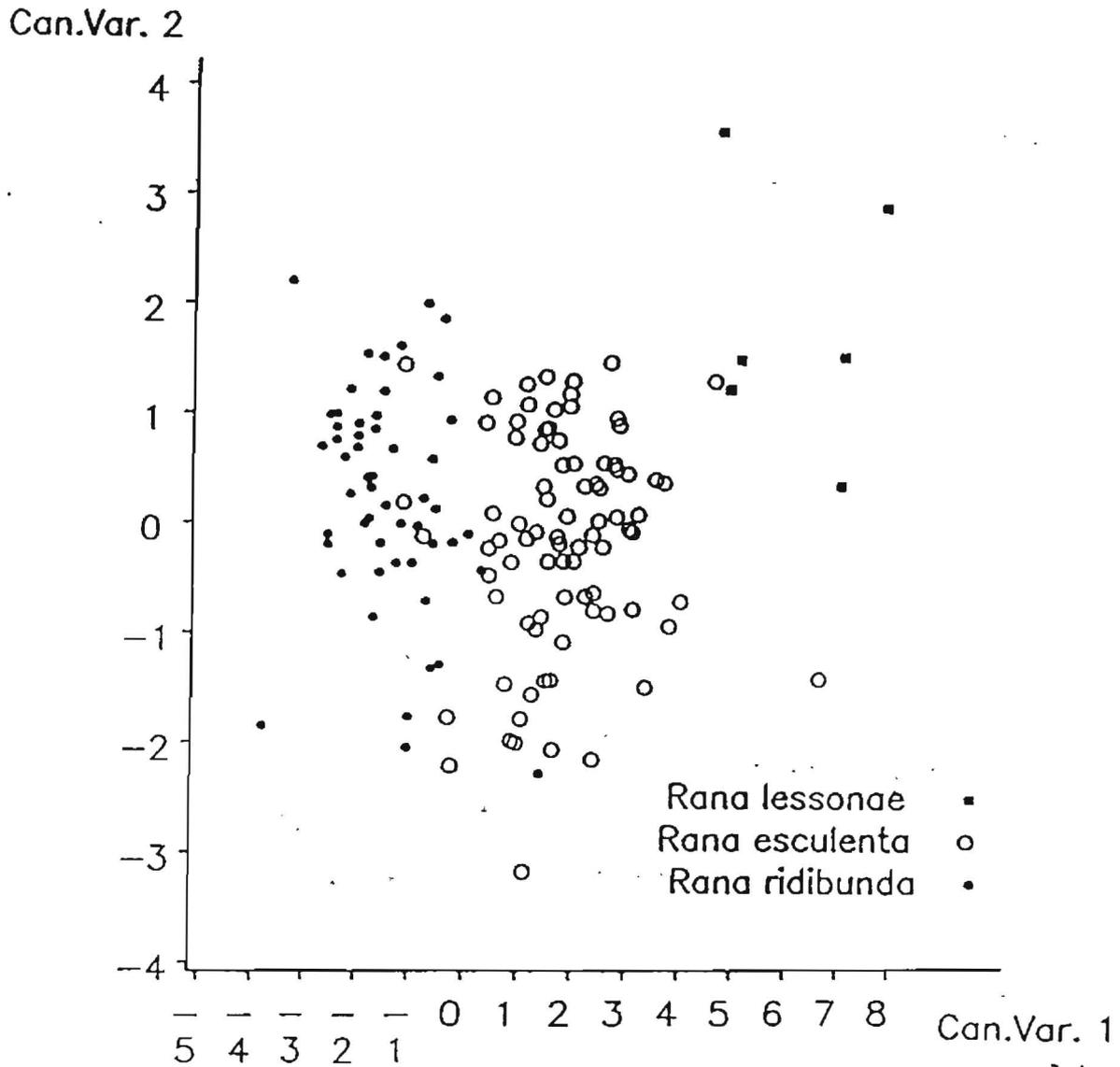


Abb. 1: Trennung der nach LDH-1 bestimmten Arten durch ihre Morphologie. Die Grünfrösche wurden nach LDH-1-Allelmuster in die 3 Arten klassiert und nach 4 morphologischen Massen gruppiert. Trennungsschärfe: 93%. Die Koordinaten wurden mit einer Diskriminanzanalyse (BMDP7M: Dixon, 1984) berechnet. Die canonische Variable 1 (Can. Var.) trennt die Punkte zu 88% und die Can. Var. 2 zu 40%.

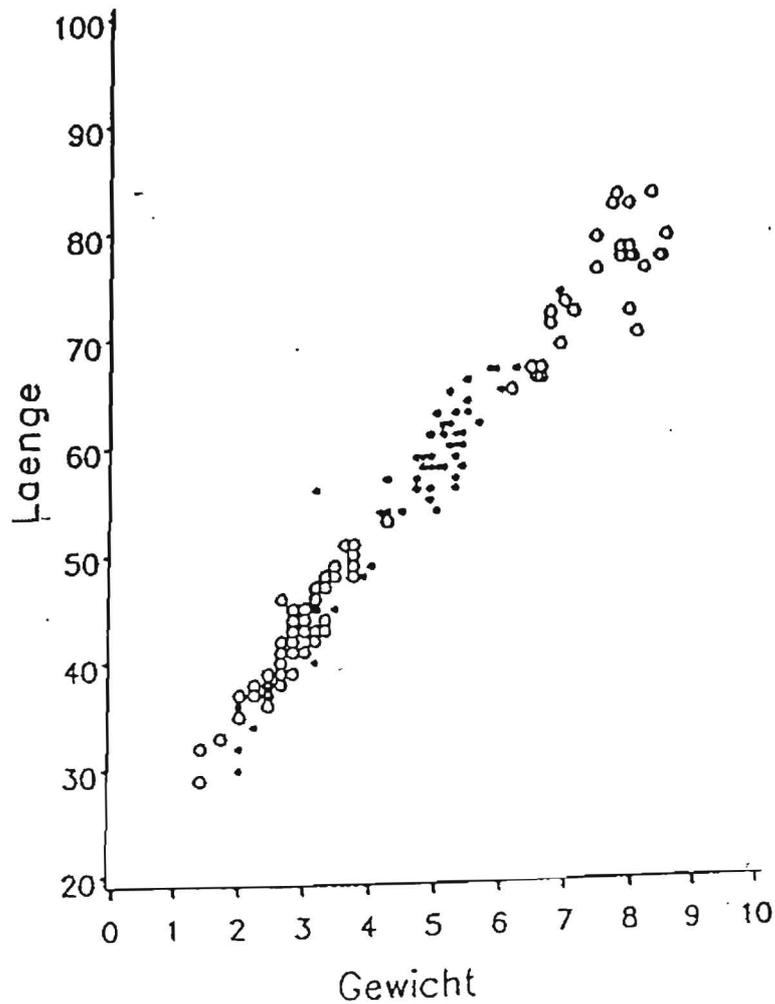


Abb. 2: Zusammenhang zwischen Körperlänge und dem Gewicht. Die Körperlänge wurde gegen die dritte Wurzel des Gewichtes aufgetragen, um beide in der gleichen Dimension vergleichen zu können.

Regressionsgerade: Körperlänge =  $17.7 * \text{Gewicht}^{-3} + 6.8$ ,  $R^2 = 0.96$ . Die ausgefüllten Kreise sind die Werte der Seefrösche (N = 63) und die leeren diejenigen der Wasserfrösche (N = 92).

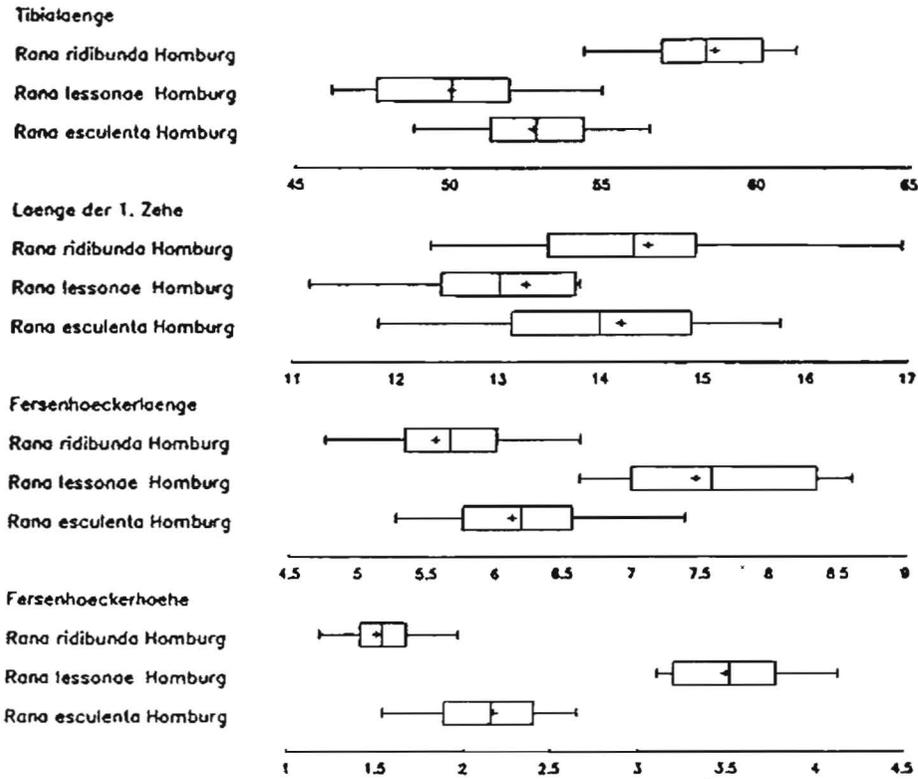
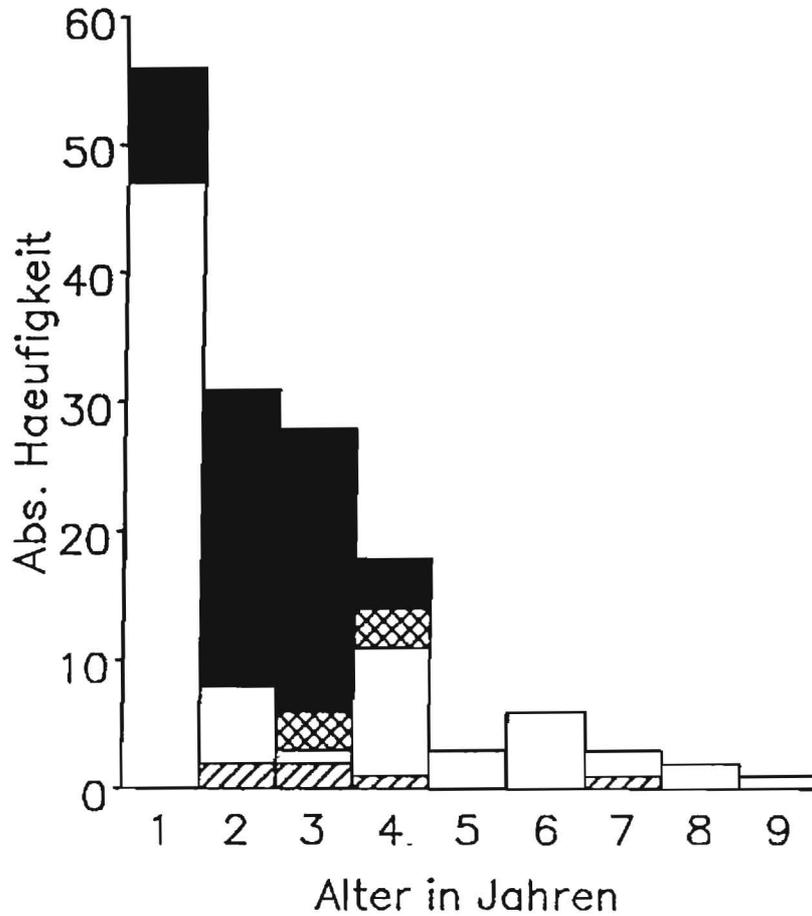


Abb. 3: Vergleich der 4 Körpermasse zwischen den Arten. Jedes Merkmal wurde standardisiert:  $100 \times (\text{Merkmal} / \text{Körperlänge})$ . Alle Längenmasse wurden in mm gemessen. Zwischen den 2 Begrenzungsstrichen liegen 90% aller Werte. Innerhalb des Rechtecks liegen 50% der Werte. Der senkrechte Strich entspricht dem Median, das + -Zeichen dem Mittelwert.  $N_{\text{esc}} = 93$ ,  $N_{\text{rid}} = 63$ ,  $N_{\text{les}} = 6$



alle Gruenfroesche

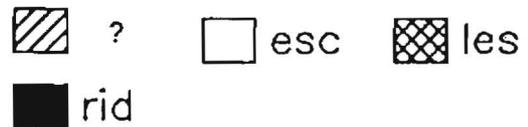
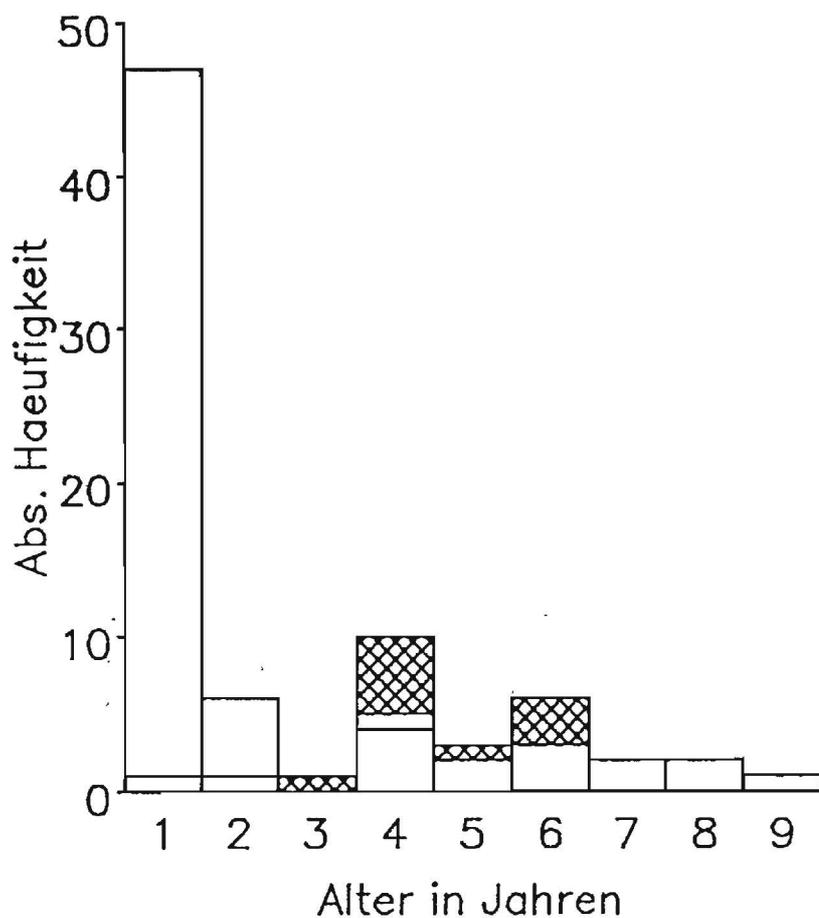
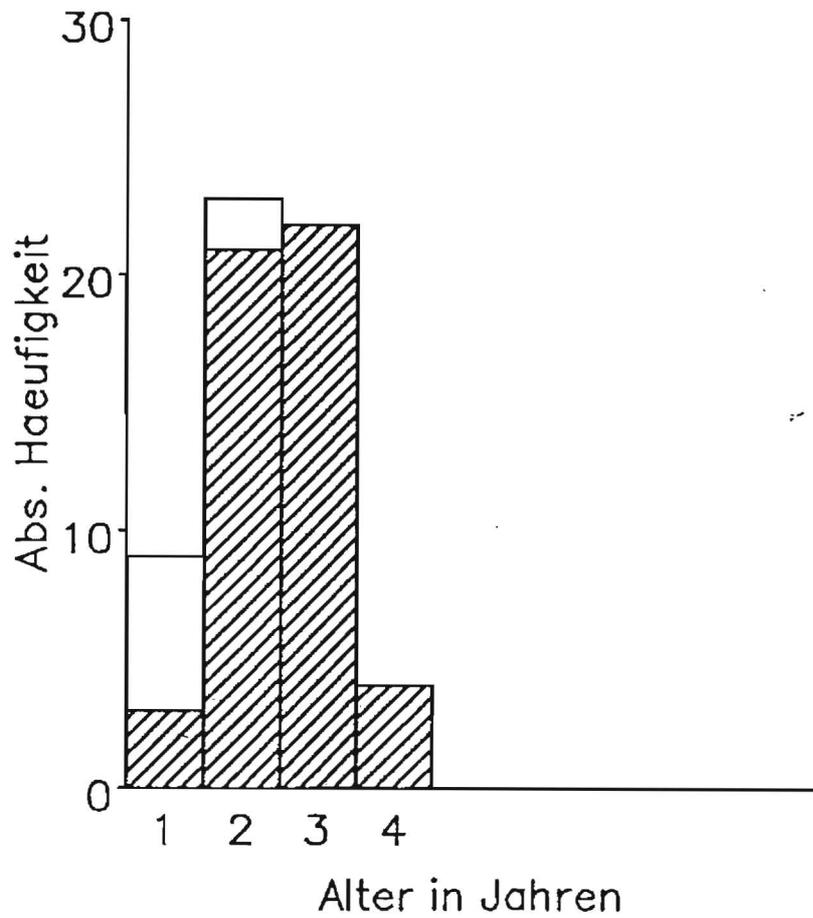


Abb. 4: Altersverteilung aller Grünfrösche. Die Altersverteilung wurde durch Zählen der hämatoxylinophilen Linien ermittelt. Jede Altersklasse wurden nach Art unterteilt. Die Arten wurden mit LDH-1-Allelen unterschieden. les = *Rana lessonae*, esc = *Rana esculenta*, rid = *Rana ridibunda*, ? = Artbestimmung war nicht möglich.



Rana esculenta      □ F    □ J    ▣ M

Abb. 5: Altersverteilung der Wasserfrösche. Die Altersverteilung wurde durch Zählen der hämatoxylinophilen Linien ermittelt. Jede Altersklasse wurde nach Geschlecht unterteilt. Bei kleinen Tieren konnte nicht immer zwischen Weibchen und Juvenilen unterschieden werden. J = Juvenile, F = Weibchen, M = Männchen.



Rana ridibunda      ▨ F      □ J

Abb. 6: Altersverteilung der Seefrösche. Die Altersverteilung wurde durch Zählen der hämatoxylinophilen Linien ermittelt. Jede Altersklasse wurde nach Geschlecht unterteilt. Bei kleinen Tieren konnte nicht immer zwischen Weibchen und Juvenilen unterschieden werden. J = Juvenile, F = Weibchen.

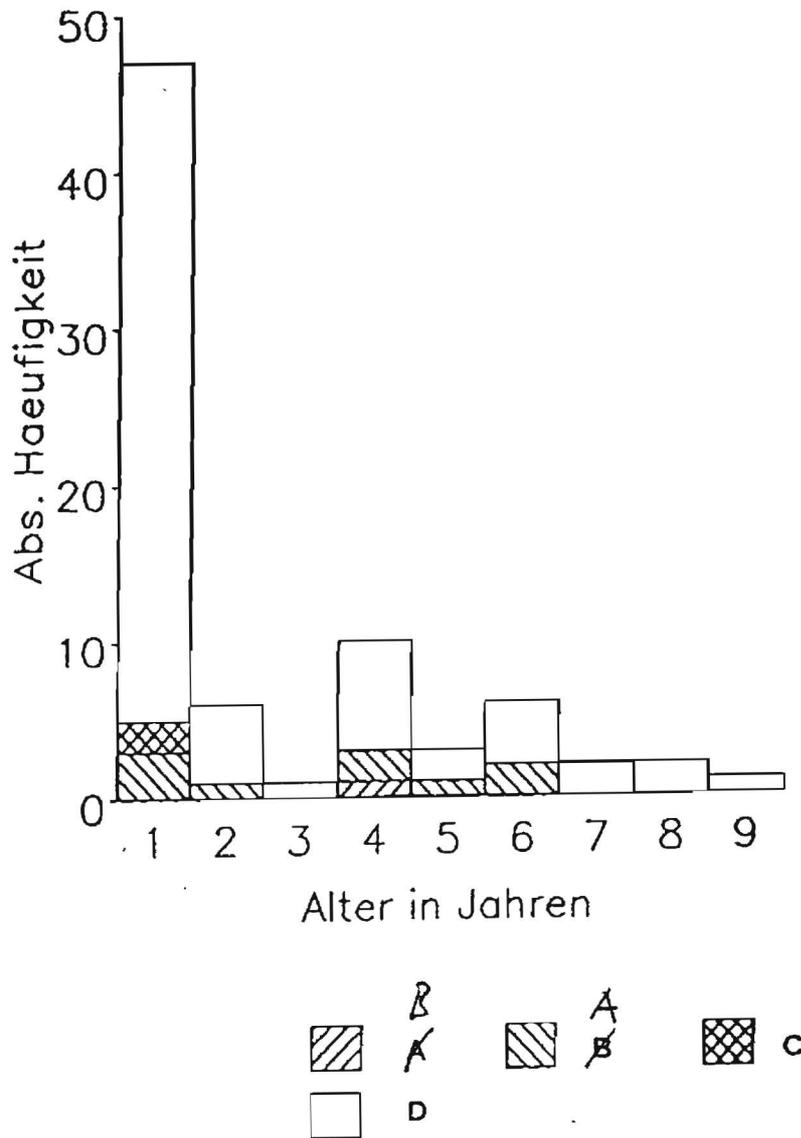
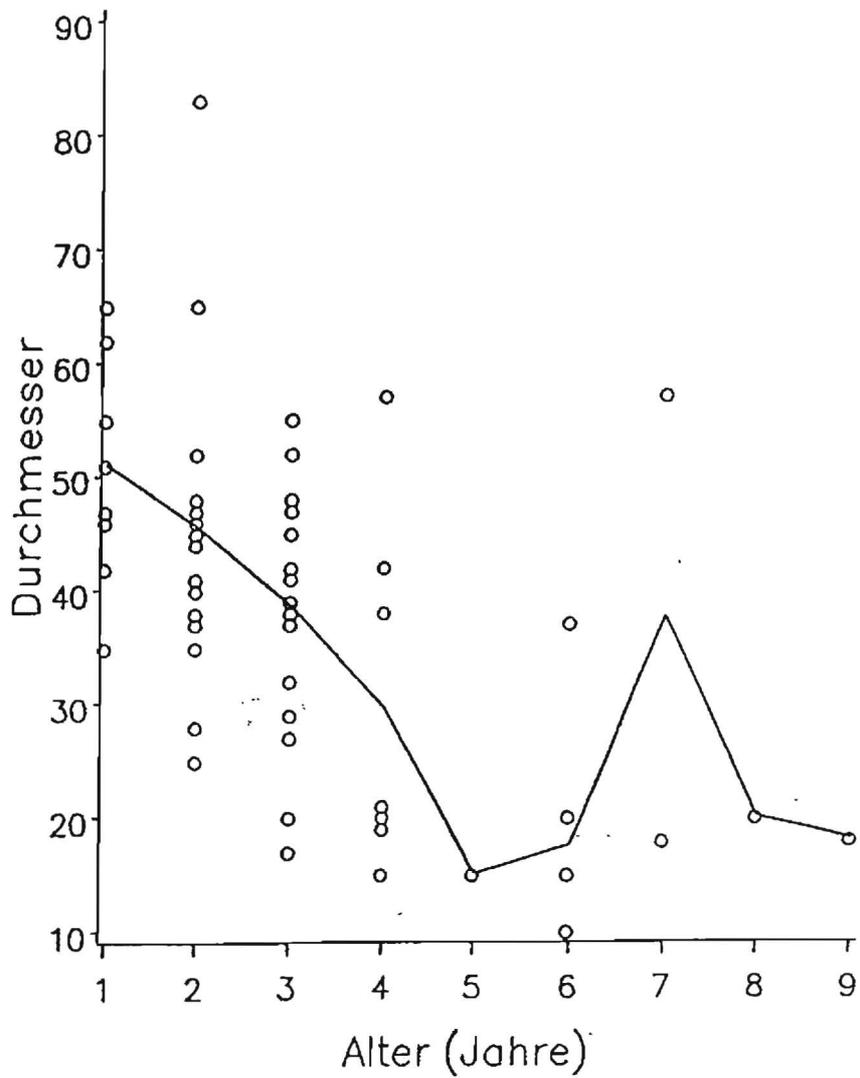


Abb. 7: Verteilung der verschiedenen Hemiklone bei Wasserfröschen. Die Altersverteilung wurde durch Zählen der hämatoxylinophilen Linien ermittelt. Jede Altersklasse wurde nach Zugehörigkeit zu verschiedenen Hemiklonen unterteilt. Untersuchte Hemiklone: GPI, LHD-1.  $B$  = GPI-Allel a gepaart mit LDH-1-Allel a,  $BA$  = GPI-a mit LDH-1-c, C = GPI-d mit LDH-1-a, D = GPI-d mit LDH-1-c.



*Abb. 8:* Kontrolle der Resorptionen. Durchmesser = Durchmesser der Markhöhle, Alter = Anzahl der hämatoxylinophilen Linien. Die Kurve entspricht den Medianen der einzelnen Altersklassen. Die Abnahme der Innendurchmesser lässt Resorptionen vermuten. N = 70.

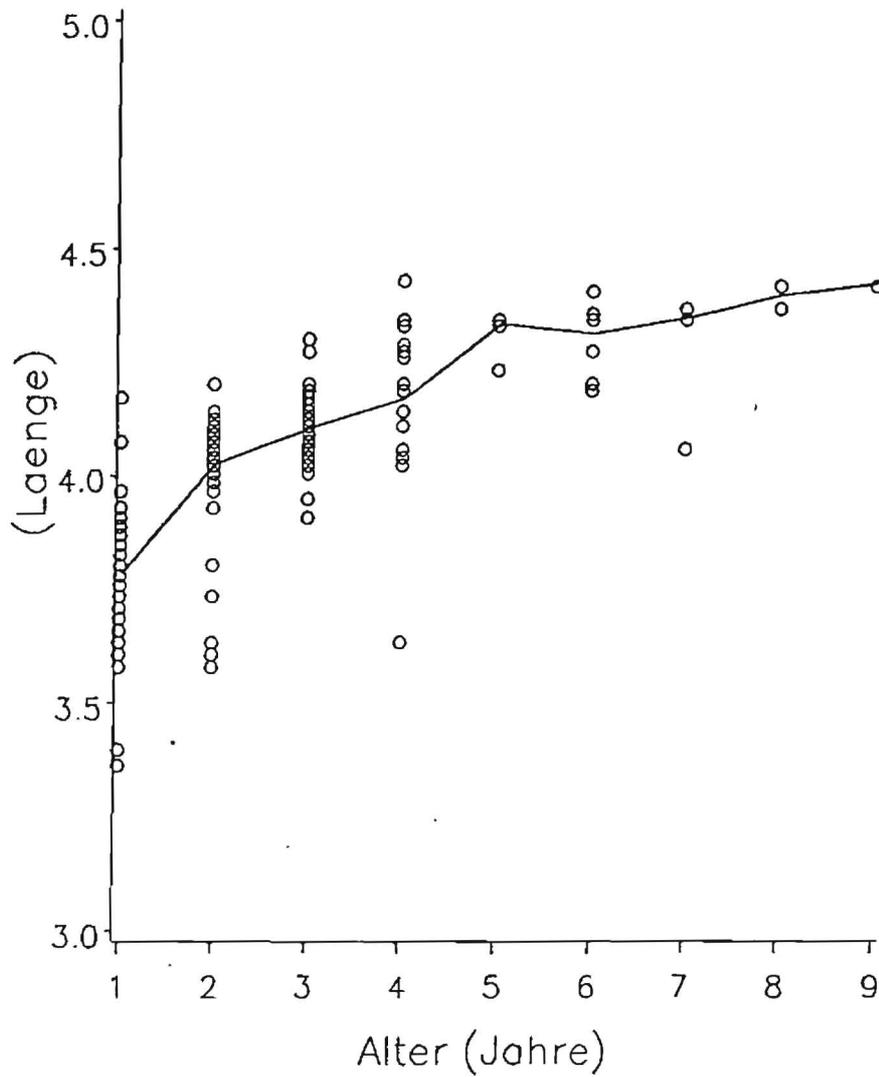
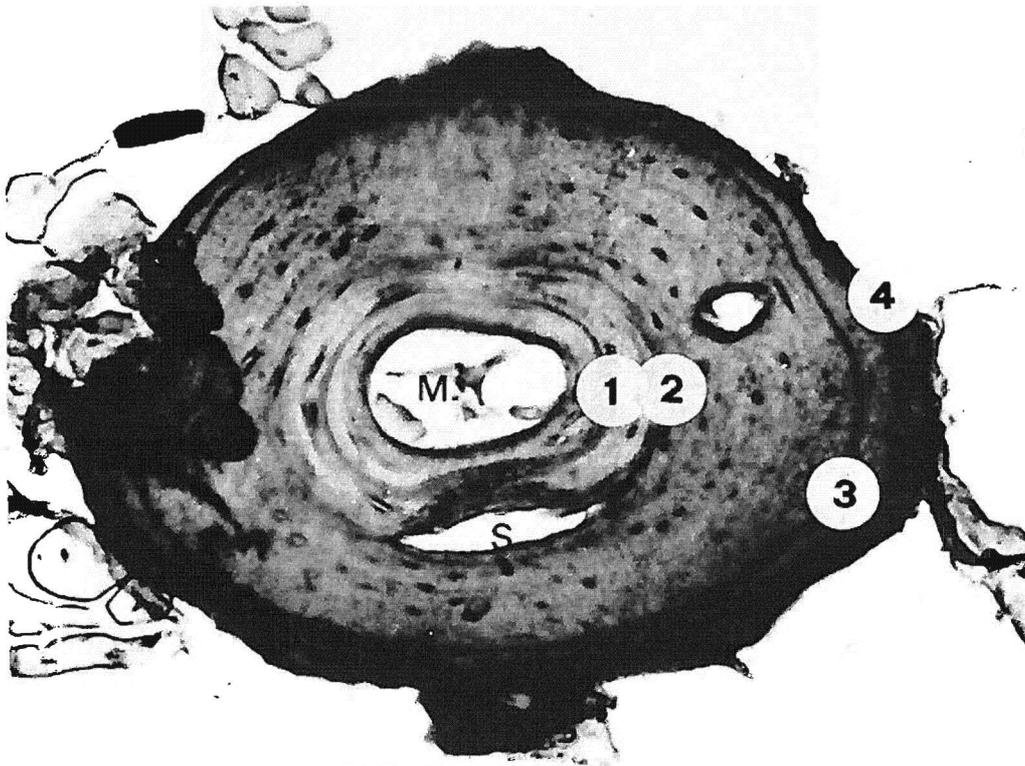


Abb. 9: Alter und Kopf-Rumpflänge. Die Anzahl der Knochenringe entspricht den Lebensjahren. natürlicher Logarithmus der Körperlänge in mm, Alter = Anzahl der hämatoxylinophilen Linien. Die Kurve verbindet die Mediane der einzelnen Altersklassen. Bei stetiger Abnahme des Wachstums resultiert eine Gerade. Im Bereich 2 - 9 Jahre entspricht die Kurve annähernd einer Geraden. N = 148.



*Abb. 10:* Altersbestimmung durch "resting lines". M = Markhöhle, 1 = Wachstumsstop während des 1. Winters (1. Ruheperiode), 2 = 2. Ruheperiode, 3 und 4 entsprechend. S = Schrumpfungen, die wahrscheinlich durch das Aufbewahren bei  $-25^{\circ}\text{C}$  und durch das Entkalken mit Bouin entstanden. M = Muskel- und Sehnen-Reste, die bei der Präparation nicht entfernt wurden.

TABELLEN

Tab. 1: Untersuchungstage in der Grube Trubenschloo bei Homburg

R = nicht markierte, M = markierte Tiere, Beginn des Besuchs eine halbe Stunde nach Sonnenuntergang bis um 01<sup>00</sup> oder Mondaufgang.

| Datum    | Weibchen |    | Männchen |   | Juvenile |   | Alle |    |
|----------|----------|----|----------|---|----------|---|------|----|
|          | R        | M  | R        | M | R        | M | R    | M  |
| 03.06.84 | 18       | -  | 2        | - | 0        | - | 20   | -  |
| 08.06.84 | 18       | 5  | 3        | 0 | 2        | 0 | 23   | 5  |
| 14.06.84 | 9        | 7  | 6        | 1 | 6        | 0 | 21   | 8  |
| 19.06.84 | 19       | 11 | 1        | 5 | 4        | 0 | 24   | 16 |
| 26.06.84 | 4        | 8  | 1        | 1 | 2        | 1 | 8    | 10 |
| 01.07.84 | 4        | 12 | 1        | 0 | 14       | 2 | 19   | 14 |
| 05.07.84 | 2        | 15 | 0        | 1 | 9        | 1 | 11   | 17 |
| 11.07.84 | 4        | 11 | 1        | 2 | 21       | 7 | 26   | 20 |
| 16.07.84 | 4        | 11 | 0        | 2 | 14       | 7 | 18   | 20 |

82   80   15   12

✓

Tab. 2: Dichteschätzung nach der Weighted-Mean-Methode

Die Mittelwerte und 95%-Vertrauensintervalle wurden nach Begon (1979) berechnet. Anzahl Fangtage = 9, P = Populationsgrösse oder Anzahl für jedes Geschlecht, Std = Standardabweichung, Min = untere Vertrauensgrenze, Max = obere Vertrauensgrenze, M = Anzahl markierte Tiere, %M = Prozentsatz der markierten an der geschätzten Grösse.

| Gruppen             | Min | P   | Max | M   | %M   | Std   |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|------|-------|
| Summe aller Gruppen | 201 | 246 | 292 | 169 | 68.6 | 23.11 |
| Weibchen            | 87  | 112 | 137 | 82  | 73.0 | 13.07 |
| Männchen            | 8   | 22  | 36  | 15  | 68.4 | 7.35  |
| Juvenile            | 87  | 151 | 214 | 72  | 47.7 | 32.31 |

169

Tab. 3: Erythrozytenflächen.

N = Anzahl Tiere, Median = Median der Mittelwerte einzelner Tiere (Anzahl Erythrozyten pro Tier > 14), Min = Minimalwert, Max = Maximalwert, Wilcoxon's |Z| steht unter der Diagonale, über der Diagonale ist die Irrtumswahrscheinlichkeit für Unterschiede zwischen den Gruppen angegeben.

\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , n = nicht signifikant.

| Art       |          | Min | Median | Max | N  | Wilcoxon-Test |     |     |     |     |     |   |
|-----------|----------|-----|--------|-----|----|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|
|           |          |     |        |     |    | 1             | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7 |
| lessonae  | Weibchen | 224 | 239.5  | 255 | 2  | -             | n   | n   | n   | n   | n   | n |
|           | Männchen | 221 | 238.5  | 258 | 4  | 0.0           | -   | *   | *   | n   | *   | n |
| esculenta | Weibchen | 247 | 289.5  | 353 | 20 | 1.8           | 2.4 | -   | n   | **  | n   | * |
|           | Männchen | 250 | 280.0  | 343 | 11 | 1.9           | 2.5 | 0.5 | -   | **  | n   | * |
|           | Juvenile | 197 | 242.0  | 287 | 62 | 0.2           | 0.4 | 5.5 | 4.6 | -   | **  | n |
| ridibunda | Weibchen | 228 | 271.0  | 340 | 51 | 1.9           | 2.6 | 1.8 | 1.5 | 6.3 | -   | n |
|           | Juvenile | 225 | 264.5  | 299 | 10 | 1.2           | 1.6 | 2.5 | 2.1 | 2.0 | 1.7 | - |

Tab. 4: Anzahlen der verschiedenen Genotypen

Die Werte wurden aus den Daten der Zehenproben berechnet. a,d und a, b, c, e sind Allele von GPI respektive LDH-1.

| Art und Geschlecht |          | GPI |     |     | LDH |     |     |     |     |
|--------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                    |          | d/d | a/d | a/a | a/e | b/c | c/c | c/e | e/e |
| lessonae           | Juvenile | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 2   |
|                    | Männchen | 4   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 4   |
| esculenta          | Juvenile | 6   | 55  | 0   | 0   | 4   | 0   | 58  | 0   |
|                    | Weibchen | 5   | 15  | 0   | 1   | 1   | 0   | 18  | 0   |
|                    | Männchen | 3   | 8   | 0   | 1   | 0   | 0   | 10  | 0   |
| ridibunda          | Juvenile | 2   | 6   | 0   | 0   | 0   | 10  | 0   | 0   |
|                    | Weibchen | 5   | 43  | 1   | 0   | 0   | 53  | 0   | 0   |

*Kontrolle!*

Tab. 6: Heterozygotiegrade der 5 untersuchten Enzymloci

Für GPI und LDH wurden die Zehenproben und Muskelproben, für die anderen Enzyme nur Muskelproben zur Berechnung des beobachteten Heterozygotiegrades benutzt.  $N_1$  = Anzahl Zehenproben,  $N_2$  = Anzahl Muskelproben.

| Art       | Geschlecht | Zehen |       |       | Skelettmuskel |       |     |       |       | $N_2$ |
|-----------|------------|-------|-------|-------|---------------|-------|-----|-------|-------|-------|
|           |            | GPI   | LDH-1 | $N_1$ | GPI           | LDH-1 | MPI | PGM-1 | AAT-1 |       |
| lessonae  | Weibchen   | 0.0   | 0.0   | 2     | -             | -     | -   | -     | -     | 0     |
|           | Männchen   | 0.0   | 0.0   | 4     | -             | -     | -   | -     | -     | 0     |
| esculenta | Weibchen   | 0.75  | 1.0   | 20    | 1.0           | 1.0   | 1.0 | 1.0   | 1.0   | 11    |
|           | Männchen   | 0.73  | 1.0   | 11    | 0.8           | 1.0   | 1.0 | 1.0   | 1.0   | 5     |
|           | Juvenile   | 0.90  | 1.0   | 55    | -             | -     | -   | -     | -     | 0     |
| ridibunda | Weibchen   | 0.88  | 0.0   | 43    | 1.0           | 0.0   | 0.2 | 0.6   | 0.0   | 6     |
|           | Juvenile   | 0.75  | 0.0   | 8     | -             | -     | -   | -     | -     | 0     |

Tab. 5: Allelfrequenzen der Enzyme GPI und LDH-1.

Die Werte wurden aus den Daten der Zehenproben berechnet. a,d und a, b, c, e sind Allele von GPI respektive LDH-1.  $N_1$  = Anzahl Proben für GPI,  $N_2$  = Anzahl Proben für LDH-1.  $2N$  = Anzahl Genome.

| Art       | Geschlecht   | GPI         | LDH-1       |             |             |             |             | $N_1$     | $N_2$     |
|-----------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
|           |              | d           | a           | a           | b           | c           | e           |           |           |
| lessonae  | Weibchen     | 1.0         | -           | -           | -           | -           | 1.0         | 2         | 2         |
|           | Männchen     | 1.0         | -           | -           | -           | -           | 1.0         | 4         | 4         |
|           | <b>Total</b> | <b>1.0</b>  | -           | -           | -           | -           | <b>1.0</b>  | <b>6</b>  | <b>6</b>  |
| esculenta | Weibchen     | 0.63        | 0.38        | 0.03        | 0.03        | 0.48        | 0.48        | 20        | 20        |
|           | Männchen     | 0.64        | 0.36        | 0.05        | -           | 0.50        | 0.45        | 11        | 11        |
|           | Juvenile     | 0.55        | 0.45        | 0.03        | -           | 0.47        | 0.50        | 61        | 62        |
|           | <b>Total</b> | <b>0.58</b> | <b>0.42</b> | <b>0.01</b> | <b>0.03</b> | <b>0.47</b> | <b>0.49</b> | <b>92</b> | <b>93</b> |
| ridibunda | Weibchen     | 0.54        | 0.46        | -           | -           | 1           | -           | 49        | 53        |
|           | Juvenile     | 0.63        | 0.38        | -           | -           | 1           | -           | 8         | 10        |
|           | <b>Total</b> | <b>0.55</b> | <b>0.45</b> | -           | -           | <b>1</b>    | -           | <b>57</b> | <b>63</b> |

Tab. 7: Oocyten der Wasserfrosch- und Seefroschweibchen

Esc = *Rana esculenta*, rid = *Rana ridibunda*. die Kleinbuchstaben bezeichnen verschiedene Allele der Enzyme GPI und LDH, bei MPI und AAT konnte keine Homologisierung gemacht werden. S = langsames, I = intermediäres, F = schnelles Band in der Elektrophorese, N = Anzahl der untersuchten Oocyten pro Tier.

|      | Art |     |     |     | Soma |     |     | Oocyten | N   |    |
|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|---------|-----|----|
|      | GPI | LDH | MPI | AAT | GPI  | LDH | MPI |         |     |    |
| ↗    | esc | a/d | c/e | S/I | S/F  | a   | c   | I       | 12  |    |
|      | esc | a/d | c/e | S/I | S/F  | -   | -   | -       | 10  |    |
|      |     |     |     |     |      | a   | c   | I       | 14  |    |
| ?    | }   | esc | a/d | c/e | S/I  | S/F | a/d | c       | -   | 9  |
|      |     |     |     |     |      |     | -   | c/e     | -   | 3  |
|      |     |     |     |     |      |     | a/d | c       | I   | 10 |
|      |     |     |     |     |      |     | a/d | c       | I   | 2  |
|      |     |     |     |     |      |     | a   | c       | I/F | 2  |
|      | esc | a/d | c/e | S/I | S/F  | a   | c   | I       | 44  |    |
|      | esc | a/d | c/e | -   | -    | -   | c   | -       | 14  |    |
|      | esc | a/d | c/e | S/I | S/F  | a   | c   | I       | 10  |    |
|      | esc | a/d | c/e | S/I | S/F  | a   | c   | I       | 10  |    |
| LDH? | rid | a/d | c   | I   | -    | a/d | c   | I       | 24  |    |
| →    | rid | a/d | c   | I/F | a    | a/d | c   | I/F     | 10  |    |
|      |     |     |     |     |      | a/d | c   | -       | 6   |    |
|      |     |     |     |     |      | d   | c   | -       | 12  |    |
|      | rid | a/d | c   | I   | a    | a/d | c   | I       | 14  |    |
|      | rid | a/d | c   | I/F | a    | a/d | c   | I/F     | 14  |    |
|      |     |     |     |     |      | a/d | c   | I/F     | 3   |    |
| →    | rid | a/d | c   | -   | -    | a   | c   | S       | 6   |    |
|      |     |     |     |     |      | a/d | c   | S       | 4   |    |

Handwritten notes: 76851, 363, 364, 367, 420 ✓, 421 ✓, 21.8.85, 2.8.85

Tab. 8: Gefundene Hemiklone der Wasserfrösche

Die Hemiklone wurden nach den Allelkombinationen der Enzyme GPI und LDH-1 definiert.

| Hemiklon       | GPI-<br>Allel | LDH-1-<br>Allel | Anzahl   |          |          |
|----------------|---------------|-----------------|----------|----------|----------|
|                |               |                 | Weibchen | Männchen | Juvenile |
| D <del>A</del> | <del>a</del>  | c               | 4        | 3        | 5        |
| B              | a             | a               | 1        | 0        | 1        |
| C              | d             | a               | 0        | 0        | 3        |
| A = D          | d             | c               | 15       | 8        | 52       |

Kontrolle!

#### ANHANG

##### Probleme der Enzymdarstellung

Die Zehenproben wurden auf 5 Enzymsysteme untersucht. Interpretationsprobleme erlaubten jedoch nur für LDH-1 und GPI eine gesicherte Darstellung. AAT, PGM und MPI zeigen Unterschiede zwischen Muskeln und Zehenproben. Zudem sind AAT-1 und AAT-2 in Zehen durchwegs schlechter nachzuweisen als im Muskel. PGM-2 erschien in Zehen nicht. MPI ist ein Monomer (Harris & Hopkinson, 1978); es finden sich jedoch zwei deutliche Bandensysteme, die aus Muskelproben nicht erhältlich sind, diese sind stark verschmiert und dadurch kaum zu interpretieren. Eine Hitze-Denaturierung ist auszuschliessen, da Zehen- und Muskelproben gleich behandelt wurden.

##### Probleme der Altersschätzung

Die Altersschätzung ist trotz der Dünnschnittmethode relativ ungenau. Es werden Tiere, die Knochenmaterial resorbierten, jünger eingestuft als sie tatsächlich sind. Die Messung des Markhöhlendurchmessers ist sehr problematisch. Sie muss bei allen Tieren an genau der gleichen (-der dünnsten-) Stelle ausgeführt werden. Zudem muss der Schnitt senkrecht zum Knochen liegen. Bei kleinen Knochen ist diese Ausrichtung kaum möglich. Ältere Tiere hatten kleinere Markhöhlendurchmes-

ser (Abb. 8). Die Körperlänge stieg mit dem Alter kontinuierlich (Abb. 9). *Rana esculenta* spaltete sich in zwei deutliche Altersgruppen.

Durch das Einfrieren der Phalangen vor der Altersbestimmung dürften weitere Artefakte wie das Ablösen des ersten vom zweiten Altersring entstanden sein (Abb. 10). Die unkorrigierten Altersdaten sind auch recht konsistent mit der Klassierung in die verschiedenen "Geschlechter" (Abb. 5, Abb. 6). Männchen erscheinen immer erst im 3. Altersjahr. Sie scheinen zwischen dem 2. und 3. Lebensjahr geschlechtsreif zu werden. Einige juvenile und weibliche Frösche wurden entweder im Feld oder durch die Altersbestimmung falsch klassiert. Die Häufigkeit dieser Falschklassierungen ist aber klein (Fehlklassierungen: 6 von 148 Tieren, siehe auch Abb. 5 und Abb. 6).