Universiteit
Leiden
The Netherlands

Resolving riddles and presenting new puzzles in Chonorinidae Phylogenetics

Kokshoorn, B.

Citation
Kokshoorn, B. (2008, December 3). *Resolving riddles and presenting new puzzles in Chonorinidae Phylogenetics*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/13342

Version:	Corrected Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/13342

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Resolving Riddles and Presenting New Puzzles in Chondrinidae Phylogenetics

Bas Kokshoorn

Kokshoorn, Bas

Resolving Riddles and Presenting new Puzzles in Chondrinidae Phylogenetics

Thesis Leiden University

Photographs, cover, artwork and lay-out: B. Kokshoorn
Printing: Gildeprint b.v.

ISBN 9789071382567

Resolving Riddles and Presenting New Puzzles in Chondrinidae Phylogenetics

Proefschrift
ter verkrijging van
de graad van Doctor aan de Universiteit Leiden,
op gezag van de Rector Magnificus Prof. Mr. P. F. van der Heijden,
volgens besluit van het College voor Promoties
te verdedigen op woensdag 3 december 2008
klokke 11:15 uur

door

Bas Kokshoorn

geboren te Voorburg in 1980

PROMOTIECOMMISSIE

Promotor:	Prof. Dr. E. Gittenberger (Universiteit Leiden)
Referent:	Dr. M. Glaubrecht (Museum für Naturkunde, Berlin)
Overige leden:	Prof. Dr. P. Baas (Universiteit Leiden) Prof. Dr. P. Brakefield (Universiteit Leiden) Prof. Dr. P.J.J. Hooykaas (Universiteit Leiden) Prof. Dr. M. Schilthuizen (Rijksuniversiteit Groningen)

CONTENTS

	Nederlandse inleiding en samenvatting	**7**
Chapter 1	Introduction and summary	**15**
Chapter 2	The family Chondrinidae (Gastropoda, Pulmonata) *Kokshoorn, B., & E. Gittenberger*	**21**
Chapter 3	Historical biogeography of the land snail genus *Chondrina* (Gastropoda, Chondrinidae) *Kokshoorn, B., Erkelens, I., Schoor, M. van, & E. Gittenberger*	**41**
Chapter 4	Evolutionary inequality in *Chondrina* and *Arianta* (Gastropoda, Pulmonata): 'prime' and 'remnant' species *Gittenberger, E., & B. Kokshoorn*	**59**
Chapter 5	The Sierra del Cadí	**65**
Chapter 6	*Abida secale* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata): discrepancies between morphology and molecules *Kokshoorn, B., & E. Gittenberger*	**73**
Chapter 7	Altitudinal gradients and shell morphology in *Abida secale*: ecophenotypic variation andsubspecies *Kokshoorn, B., & M.M. Bos*	**99**
Chapter 8	Chondrinidae taxonomy revisited: new synonymies, new taxa, and a checklist of species and subspecies (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata) *Kokshoorn, B., & E. Gittenberger*	**115**
	Curriculum Vitae	**187**

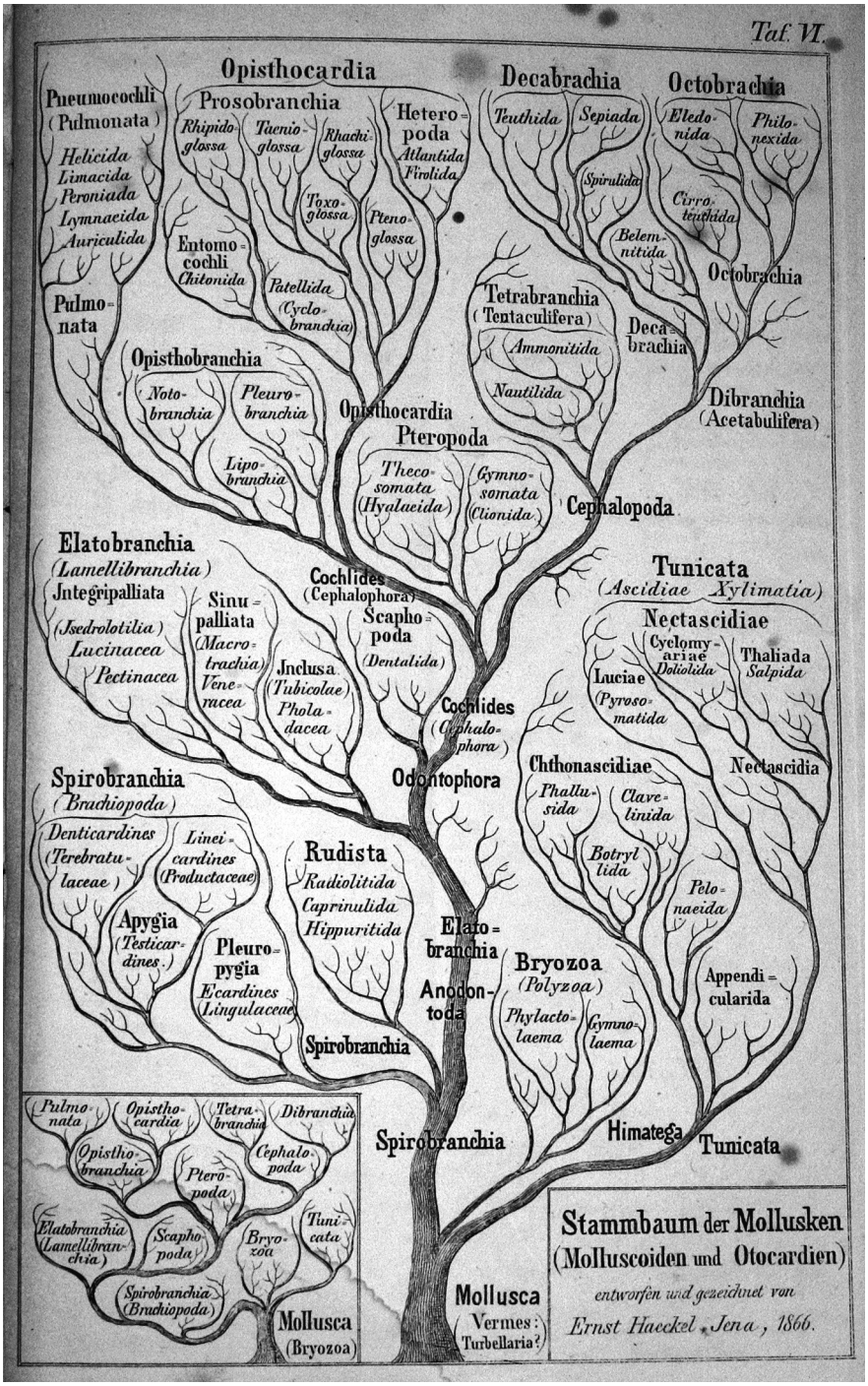
NEDERLANDSE INLEIDING EN SAMENVATTING

De evolutietheorie stelt dat het leven op aarde eenmalig is ontstaan. Aanpassingen aan de omgeving (adaptatie), natuurlijke selectie (de minst aangepasten verdwijnen door competitie om bijvoorbeeld voedsel, territorium etc.), en het toeval, resulteren in veranderingen in de genetische samenstelling van groepen individuen (populaties). Als deze veranderingen worden doorgegeven aan het nageslacht, kan dit proces na verloop van tijd leiden tot het ontstaan van nieuwe soorten. De relaties tussen de soorten kunnen, net als in een stamboom van een menselijke familie, worden weergegeven als de vertakkingen van een boomkruin (fig. 1), waarbij het splitsen van takken het ontstaan van nieuwe soorten verbeeldt.

Fylogenetische systematiek is de wetenschap die zich bezig houdt met het bestuderen en reconstrueren van de verwantschappen tussen soorten, ofwel het reconstrueren van het "vertakkings-patroon" zoals dat in de loop van de evolutie is ontstaan. Dergelijke reconstructies zijn essentieel voor het bestuderen van de onderliggende processen die verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van nieuwe soorten. Deze "macro-evolutie" (in tegenstelling tot de "micro-evolutie", die zich afspeelt op het niveau van het gen of individu) is niet alleen verantwoordelijk voor de diversiteit aan leven zoals we die nu kennen, maar ook voor de verspreiding en het voorkomen van de uiteenlopende soorten en hogere groepen (taxa). Het bestuderen van de patronen in biodiversiteit levert dus inzicht in de processen die voor deze patronen verantwoordelijk zijn.

Landslakken zijn bij uitstek geschikt voor het bestuderen van evolutionaire patronen. Hun spreekwoordelijke traagheid maakt dat soortvormingsprocessen vaak heel lokaal plaatsvinden. Dit kan resulteren in een hoge diversiteit binnen een relatief klein gebied, wat het bestuderen ervan eenvoudig maakt. De slakken zijn bovendien relatief eenvoudig in grote aantallen in het veld te verzamelen en te bestuderen.

De familie Chondrinidae is een goed voorbeeld van een dergelijke groep landslakken. De familie wordt onderverdeeld in 6 geslachten, te weten *Abida*, *Chondrina*, *Rupestrella*, *Granaria*, *Granopupa* en *Solatopupa*. De soorten in deze geslachten hebben veelal een beperkte verspreiding. Zij zijn allemaal strikt afhankelijk van kalkhoudend gesteente. Dit heeft ervoor gezorgd dat de soorten in principe alleen op kalkhoudende "eilanden" voorkomen, soms beperkt tot een klein deel van een gebergteketen. In totaal bevatten deze 6 geslachten 78 bekende soorten. Het aantal soorten is echter niet evenredig verdeeld. Waar *Granopupa*, *Granaria* en *Solatopupa* (voor zover we nu weten) samen slechts 14 soorten bevatten, kennen we nu alleen al 37 *Chondrina* soorten (en 25 ondersoorten) en in *Abida* 12 soorten, met daarbij één uitzonderlijk variabele soort, die wordt opgesplitst in niet minder dan 18 geografische rassen of ondersoorten.


Taf. VI.
Opisthocardia
Prosobranchia
Pneumocochli (Pulmonata)
Helicida
Limacida
Peroniada
Lymnaeida
Auriculida
Rhipido-glossa
Taenio-glossa
Rhachi-glossa
Hetero-poda
Atlantida
Firolida
Toxo-glossa
Ptero-glossa
Entomo-cochli
Chitonida
Patellida (Cyclo-branchia)
Pulmo-nata
Opisthobranchia
Noto-branchia
Pleuro-branchia
Lipo-branchia
Opisthocardia Pteropoda
Theco-somata (Hyaleida)
Gymno-somata (Clionida)
Decabrachia
Teuthida
Sepiada
Spirulida
Belem-nitida
Octobrachia
Eledo-nida
Philo-nexida
Cirro-teuthida
Octobrachia
Tetrabranchia (Tentaculifera)
Ammonitida
Nautilida
Deca-brachia
Dibranchia (Acetabulifera)
Cephalopoda
Elatobranchia (Lamellibranchia)
Integripalliata
(Isedrolotilia)
Lucinacea
Pectinacea
Sinu-palliata (Macro-trachia)
Vene-racea
Cochlides (Cephalophora)
Scapho-poda (Dentalida)
Inclusa (Tubicolae)
Phola-dacea
Cochlides (Cephalo-phora)
Tunicata (Ascidiae Xylimatia)
Nectascidiae
Cyclomy-ariae Doliolida
Thaliada Salpida
Luciae (Pyroso-matida)
Chthonascidiae
Phallu-sida
Clave-linida
Botryl-lida
Nectascidia
Pelo-naeida
Spirobranchia (Brachiopoda)
Denticardines (Terebratu-laceae)
Linei-cardines (Productaceae)
Apygia (Testicar-dines.)
Pleuro-pygia Ecardines (Lingulaceae)
Rudista
Radiolitida
Caprinulida
Hippuritida
Odontophora
Elato-branchia
Anodon-toda
Spirobranchia
Bryozoa (Polyzoa)
Phylacto-laema
Gymno-laema
Appendi-cularida
Himatega
Tunicata
Pulmo-nata
Opistho-cardia
Tetra-branchia
Dibranchia
Opistho-branchia
Cephalo-poda
Ptero-poda
Elatobranchia (Lamellibran-chia)
Scapho-poda
Bryo-zoa
Tuni-cata
Spirobranchia (Brachiopoda)
Mollusca (Bryozoa)
Spirobranchia
Mollusca
Vermes: Turbellaria?
Stammbaum der Mollusken
(Molluscoiden und Otocardien)
entworfen und gezeichnet von
Ernst Haeckel, Jena, 1866.

Dit proefschrift spitst zich vooral toe op de diversiteit in *Abida* en *Chondrina*. Naast het feit dat deze twee geslachten samen verreweg het grootste deel van de soorten-diversiteit in de familie bevatten, vinden we hier ook twee bijzonder interessante patronen. Zo is er een enorme uiterlijke (morfologische) diversiteit van ondersoorten binnen de soort *Abida secale*. In *Chondrina* zien we een veel beperktere variatie in een complex van soorten in wat tot nu toe *Chondrina farinesii* heette. In dit proefschrift worden de evolutionare verwantschappen binnen deze complexen en hun nauwste verwanten gereconstrueerd. Dit wordt gedaan op basis van DNA gegevens van de diverse slakken. De mate van verschil tussen het DNA van twee slakken levert informatie over de mate van onderlinge verwantschap. Kleine verschillen betekent dat ze een gemeenschappelijke voorouder hebben die naar verhouding kort geleden leefde, terwijl grote verschillen wijzen op een voorouder in het diepere geologische verleden. Op basis van dit principe is het mogelijk om voor grote aantallen individuen een verwantschapsschema (een stamboom) op te stellen. Op basis hiervan worden mogelijke verklaringen besproken voor de waargenomen patronen.

In hoofdstuk 2 worden de verwantschappen besproken op een hoger niveau binnen de familie Chondrinidae. Hiertoe worden de evolutionaire relaties tussen een selectie van vertegenwoordigers van de 6 geslachten gereconstrueerd. Bovendien worden twee scenario's m.b.t. tot de ouderdom van de verschillende groepen getest. Uit dit onderzoek blijkt dat er een diepe "vertakking" binnen de familie Chondrinidae bestaat. Dit resulteert in twee groepen van soorten, nl. *Granaria*, *Granopupa* en *Solatopupa*, samen aangeduid met de naam Granariinae, en als tweede groep *Chondrina*, *Abida* en *Rupestrella*, ofwel de Chondrininae. De tweede groep omvat 82% van de soorten-diversiteit binnen de familie. Mede daardoor krijgen de Chondrininae in dit proefschrift extra veel aandacht.

De oudste bekende fossielen die tot de Chondrinidae worden gerekend stammen uit het Eoceen, 57,8 - 36,6 miljoen jaar geleden (in het Engels afgekort als Mya). Meer specifiek kennen we twee soorten uit het Lutetien, een tijdsperiode die binnen het Eoceen valt (52 - 43,6 Mya). Afgaande op deze gegevens kunnen we de oorsprong van de Chondrinidae dateren als minimaal 43,6 miljoen jaar geleden. De fossielen laten namelijk zien dat er al Chondrinidae waren aan het eind van het Lutetièn. De familie kan heel wel nog ouder zijn, maar niet jonger. Als we deze minimum leeftijd voor de verschillende vertakkingen doorrekenen komen we op een zeer hoge ouderdom voor alle groepen. Dit lijkt sterk in strijd met de gegevens die we hebben over onder meer de verspreiding en de geologie van de gebieden waar deze taxa voorkomen. Het tweede scenario gaat uit van de opvallende verspreiding

---

Figuur **1**. Een reconstructie van verwantschappen is weer te geven als de vertakkingen van een boom, zoals hier is gedaan voor de weekdieren.
Figuur uit: Haeckel, E., 1866. Generelle Morphologie der Organismen. Jena, Germany. Vol. II, Plate VI.

---

van het geslacht *Rupestrella*. Gebaseerd op de geologische geschiedenis van het westelijk Middellandse Zee-gebied, wordt aangenomen dat een splitsing van soorten binnen deze groep ca. 5,3 miljoen jaar geleden ontstond. Als de hele stamboom van de familie met behulp van dit laatste gegeven "gecalibreerd" wordt, blijkt dat de uitkomst beter aansluit bij de huidige aannames m.b.t. de ouderdom van de diverse groepen.

Als we het tweede scenario daarom aannemen als werkhypothese (in beide gevallen gaat het om minimum-leeftijden!), vallen de fossielen die we kennen vanaf het Eoceen dus buiten de huidige radiatie van soorten. Met andere woorden; de huidige radiatie van soorten is recenter dan (en waarschijnlijk een afgeleide van) een oudere radiatie die inmiddels grotendeels is uitgestorven.

Hoofdstuk drie behandelt de verwantschappen binnen het geslacht *Chondrina*. De grote diversiteit aan soorten in *Chondrina* op het Iberisch schiereiland suggereert dat daar de oorsprong van dit geslacht ligt. De fylogenetische reconstructie van de verwantschappen binnen de groep laat dit ook zien. Basaal in de stamboom vinden we een soort die slechts in één, zeer klein gebied in Andalusië (Spanje) voorkomt. Vervolgens 'zien' we een groep van soorten ontstaan, die bekend zijn van de Kaukasus, de zuidelijke Balkan en de zuidzijde van de Alpen. Van deze gebieden is bekend dat ze tijdens de ijstijden hebben gefunctioneerd als "refugia", ofwel gebieden buiten de directe invloed van het landijs waar soorten de koude periode konden overleven. De overige soorten die we nu uit Europa kennen blijken 'jongere' soorten te zijn die nl. hoger in de stamboom aftakken. Hieruit kunnen we afleiden dat het geslacht *Chondrina* inderdaad is ontstaan in (het zuiden van) het Iberisch schiereiland om zich vervolgens over Europa te verspreiden. Klimatologische veranderingen (ijstijden) hebben sommige soorten teruggedrongen in de refugia waar ze (of hun afstammelingen) nu nog gevonden worden. Een nog weer latere kolonisatiegolf heeft vervolgens Europa bevolkt met hoofdzakelijk twee (onder)soorten: *Chondrina avenacea avenacea* en *C. arcadica clienta*.

De groep die ooit gemakshalve *Chondrina farinesii* genoemd werd, bestaat uit aanzienlijk meer dan één soort. De DNA gegevens, in combinatie met een gedetailleerde studie van de uiterlijke (morfologische) kenmerken en de verspreiding, suggereren een radiatie die geleid heeft tot tenminste 14 meer of minder duidelijk herkenbare soorten. De gebruikelijke kenmerken voor het identificeren van soorten in de familie Chondrinidae, zoals de tandjes in de mondopening van de schelpjes, bleken maar zeer ten dele bruikbaar voor het onderscheiden van deze soorten.

In hoofdstuk vier gaat het over twee opvallende patronen die in de evolutie van, onder meer, landslakken worden waargenomen. Uit de analyse van de gegevens van *Chondrina* blijkt dat één enkele soort (*Chondrina maginensis*), die in een zeer klein gebied in Andalusië voorkomt, als zgn. zustergroep naast de overige, huidige *Chondrina*-soorten geplaatst moet worden. Dit betekent dat er in één 'tak' ruim twintig soorten zijn ontstaan, terwijl de andere tak ofwel niet gediversificeerd is, of vrij-

wel uitgestorven is, op één enkele 'overblijver' (de "remnant-species" *C. maginensis*) na. Een dergelijke ongelijkheid wordt vaker aangetroffen binnen groepen van landslakken.

Daarnaast zien we binnen bijv. een genus geregeld dat de meeste soorten erg beperkt zijn in hun voorkomen, ten opzichte van één enkele (onder)soort die juist een zeer groot verspreidingsgebied inneemt. Een dergelijke wijd verspreide soort duiden we aan met de term "prime-species". Opvallend is dat prime-species vaak 'jonge' soorten zijn, d.w.z. ze takken hoog in de stamboom af. Remnant-species daarentegen blijken vrijwel steeds juist de 'oudere' soorten te zijn. Naast het introduceren van beide concepten, bespreken we in dit hoofdstuk enkele voorbeelden en mogelijke verklaringen voor deze fenomenen.

Hoofdstukken 6 en 7 hebben betrekking op het geslacht *Abida* en meer specifiek *Abida secale*. Hoofdstuk vijf geeft eerst enige achtergrond-informatie over het gebied waarbinnen *A. secale* een extreem grote mofologische variatie laat zien, de Sierra del Cadí in Spanje. Gegevens over geologie, vegetatie en klimaat geven enig inzicht in het gebied dat een grote rol speelt in beide volgende hoofdstukken.

Abida secale komt voor van Engeland in het westen tot Slowakije in het oosten, en zuidelijk tot in het noordoosten van Spanje. In het grootste deel van het verspreidingsgebied is de soort in uiterlijke kenmerken zeer constant. Echter, in het zuidwesten van het verspreidingsgebied, noordoostelijk Spanje en de Franse oostelijke Pyreneeën, wordt een uitzonderlijk grote variatie aan vormen aangetroffen, waarbinnen momenteel 17 ondersoorten worden onderscheiden.

In hoofdstuk zes wordt een verwantschapsschema voor het geslacht *Abida* gepresenteerd, met nadruk op de variatie binnen *Abida secale*.

Opvallend is dat *A. secale* in twee groepen ('takken' ofwel 'clades') uiteen valt. Deze clades volgen echter niet strikt de morfologische grenzen tussen de op zich goed herkenbare ondersoorten. De scheidslijn tussen de clades loopt door de verschillende ondersoorten heen, waardoor vertegenwoordigers van één enkele ondersoort in beide clades worden teruggevonden. Die clades zijn bovendien geen zustergroepen van elkaar. De een heeft *Abida attenuata* als zustergroep, de ander de gecombineerde *Abida ateni* en *Abida vergniesiana*. Gebaseerd op onder meer de geografische verspreiding en de verschillen in genetische variatie binnen beide clades wordt geconcludeerd dat er mogelijk sprake is van introgressie van het mitochondriaal DNA van *Abida attenuata* in *Abida secale*. Dit houdt in dat een deel van het DNA (dat alleen van moeder op kinderen overerft via het mitochondrion) van de soort *A. attenuata* door een geval van ongebruikelijke hybridisatie in de soort *A. secale* terecht is gekomen (introgressie). Door een onbekend adaptief voordeel zou dit stuk DNA zich vervolgens binnen *A. secale* hebben kunnen verbreiden ten koste van het originele mitochondrion.

Dit fenomeen maakt het hoe dan ook lastig om de verwantschappen tussen de ondersoorten met behulp van dit mitochondriaal DNA te reconstrueren. Ook de

gegevens van een stuk kern DNA (ITS-1) leverden geen oplossing voor dit probleem. Wel werd duidelijk dat het ontbreken van grote morfologische variatie in *A. secale* in het grootste deel van Europa te wijten is aan een relatief recente kolonisatie van dit gebied.

In hoofdstuk 7 wordt dieper ingegaan op de morfologische variatie die *A. secale* laat zien bij toenemende hoogte. Van de dalen naar de toppen van de gebergteketens laat *A. secale* een min of meer graduele verandering zien. Waarschijnlijk als een aanpassing aan grote hoogte, met relatief korte seizoenen, lagere temperaturen en een hogere vochtigheid, verandert de schelpvorm van de naar verhouding grote 'dalvorm' in een kleinere, eenvoudiger gebouwde 'hoogtevorm'. De verschillen kunnen daarbij zo groot worden, dat men geneigd is de extremen als aparte soorten te beschouwen (fig. 2), ware het niet dat er tal van intermediaire populaties bestaan. Daarnaast verschillen de diverse hoogtevormen ook van elkaar, afhankelijk van de ondersoort die ter plaatse in het dal voorkomt. Dit levert een complex patroon dat feitelijk niet goed in categorieën als ondersoorten te vatten is. Hoewel het patroon en de achterliggende processen hier duidelijk zijn, is het systeem van naamgeving hier lastig objectief toe te passen. De verschillende mogelijkheden om met een dergelijk fenomeen om te gaan in het kader van de huidige nomenclatuurregels worden in dit hoofdstuk besproken.

Hoofdstuk 8 bevat de diverse nomenclatorische wijzigingen en toevoegingen die naar aanleiding van de voorafgaande hoofdstukken naar voren zijn gekomen. In totaal worden 4 nieuwe soorten en 4 nieuwe ondersoorten beschreven, naast enkele aanpassingen in de naamgeving van bekende soorten en soortgroepen. Ook wordt de morfologische variatie in zowel *Chondrina* als *Abida secale* geïllustreerd in 13 platen met afbeeldingen.

Voorheen werd aangenomen dat de ondersoorten van *Abida secale* in het Cadí gebied een ringsoort vormen. Dit houdt in dat de verspreiding van de ondersoorten rond de bergketen aan een soort verbogen hoefijzer doet denken waarvan de uiteinden overlappen en sterk verschillen. Deze uiteinden, in dit geval de hoogtevormen *Abida secale cadica* en *Abida secale cadiensis*, zijn via de andere ondersoorten (genetisch) met elkaar verbonden. Op de plaats waar zij samen voorkomen zouden zij elkaar echter niet meer als soortgenoten herkennen en zich gedragen als twee gescheiden soorten. Deze aanname was gebaseerd op de verspreiding en de uiterlijke kenmerken van *Abida secale*. De moleculaire resultaten suggereren echter dat dit niet het geval is en dat er wel degelijk uitwisseling van genetisch materiaal is (of kort geleden geweest is) tussen *A. s. cadica* en *A. s. cadiensis*. Daarom wordt in dit hoofdstuk een nieuwe hypothese gesteld die de morfologische variatie binnen *A. secale* kan verklaren. Deze zou uitgangspunt kunnen zijn voor vervolgonderzoek aan dit interessante complex.

Figuur **2**. Voorbeelden van een dalvorm (*Abida secale margaridae*, 1.325 m alt. - links) en de geassocieerde hoogtevorm (*A. s. merijni*, 2.530 m alt. - rechts)
8x ware grootte.