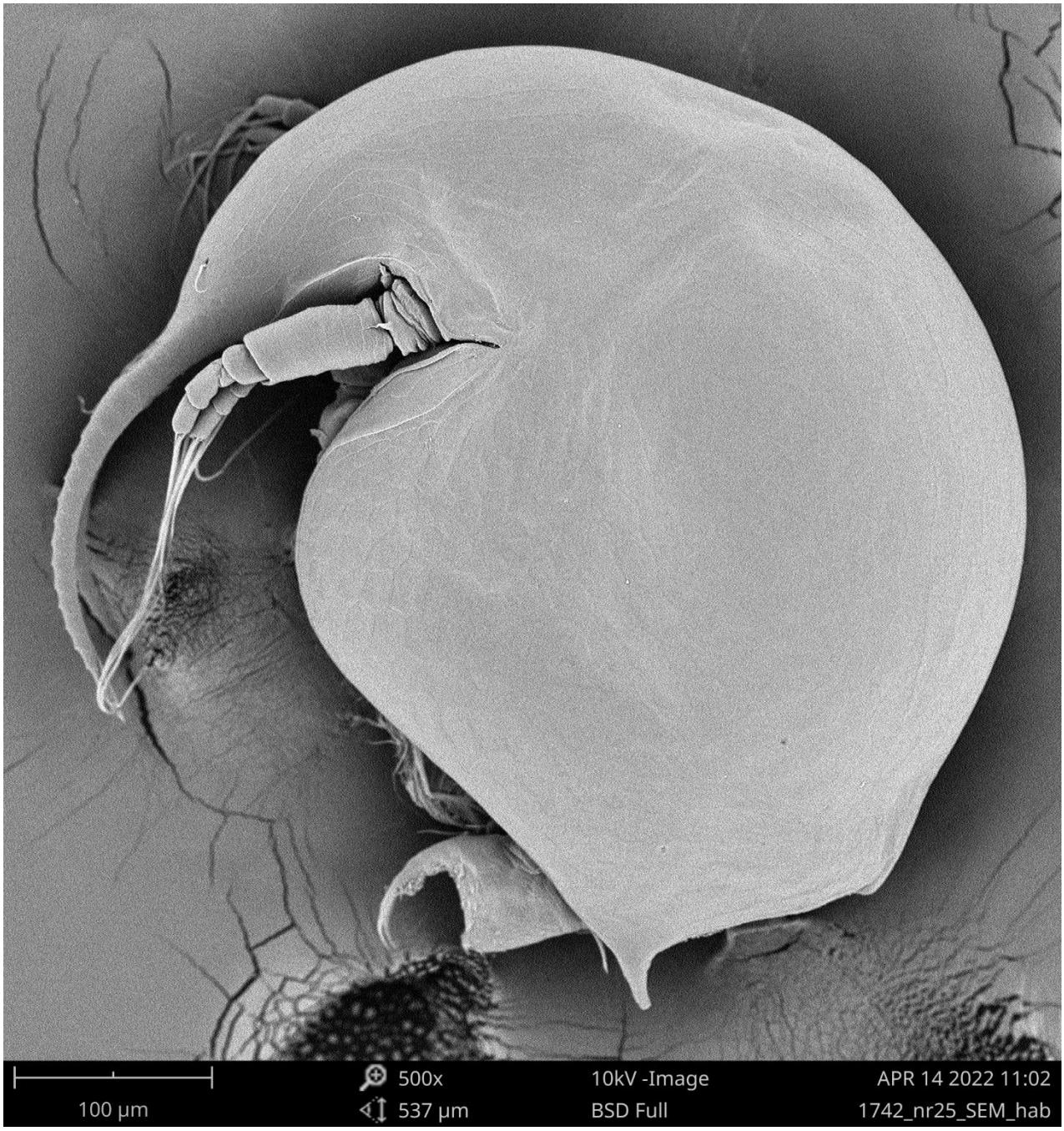
Het voorkomen van cryptische soorten binnen *Bosmina longirostris*



Auteur: Dave Jonker

Datum: 6-6-2022

Het voorkomen van cryptische soorten binnen *Bosmina longirostris*

Auteur: Dave Jonker

Studie: Toegepaste biologie (Bachelor)

Opdrachtgever: Aeres hogeschool Almere

Afstudeer docent: Sander Harting - de Groot

Bedrijf: Rijkswaterstaat Lelystad, hydrobiologisch laboratorium

Bedrijfsbegeleider: Martin Soesbergen

Foto voorpagina: *Bosmina longirostris* morfologische variëteit *pellucida* (500x vergroting) (Dave Jonker, 2022)

Versie: Thesis definitief

Plaats: Harderwijk

Datum: 6-6-2022

DISCLAIMER

Dit rapport is gemaakt door een student van Aeres Hogeschool als onderdeel van zijn/haar opleiding. Het is géén officiële publicatie van Aeres Hogeschool. Dit rapport geeft niet de visie of mening van Aeres Hogeschool weer. Aeres Hogeschool aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor enige schade voortvloeiend uit het gebruik van de inhoud van dit rapport.

Voorwoord

In het eerste en tweede jaar van de opleiding werkte ik tijdens het Peco/Heco aan een project over de verspreiding van watervlooien in Noordoost Nederland. Tijdens dit project waren er slechts drie veldwerk en drie laboratorium dagen. Door het project is mijn interesse in zoöplankton ontstaan. Na het project ben ik met de begeleider vanuit Rijkswaterstaat (Martin Soesbergen) in contact gebleven. Voor mijn afstuderen wilde ik mij meer gaan verdiepen in zoöplankton.

Bosmina longirostris leek mij een uitstekende soort watervlo om onderzoek naar te doen en een thesis over te schrijven. De soort is ten eerste gewoon karakteristiek door de tot een slurf vergroeide antenne. Ten tweede intrigeerde mij het grote taxonomische probleem dat deze soort veroorzaakt heeft met de grote morfologische variatie en de kosmopolitische verspreiding. Ten slotte vond ik de koppeling van genetica aan morfologie een mooie uitdaging.

Tijdens het verrichten van metingen hoop je dat er verschillen tussen de genetische groepen opduiken waarmee deze direct onderscheiden kunnen worden. Al snel werd duidelijk dat dit niet zo was en ontstond het vermoeden dat het resultaat toch naar geen verschil tussen de groepen ging. De statistische analyse gaf meer richting aan het zoeken en zodoende konden ik toch mooie resultaten uit de data halen.

Ik wil Martin Soesbergen graag bedanken voor de mogelijkheid om bij Rijkswaterstaat deze thesis te schrijven, de gegeven feedback op mijn stukken en de leuke tijd die we samen hebben gehad tijdens het uitvoeren van het onderzoek. Daarnaast wil ik mijn afstudeerdocent Sander Harting-De Groot bedanken voor de ondersteuning vanuit school tijdens mijn afstuderen.

Abstract

The water flea genus *Bosmina* has caused legendary taxonomic confusion over time. The species *Bosmina longirostris* has a large share in this taxonomic confusion. The morphological variation in the species is great. Six morphological varieties are distinguished that were once described as species. Today, cryptic species are found in many other water flea genera using genetic studies. *Bosmina longirostris* seems to consist of three genetic groups in the Netherlands. To find morphological differences between these genetic groups, measurements were made on parthenogenetic females from eleven of the twelve populations in the NIOO-KNAW genetic survey. Measurements of body size were made with a light microscope. Additionally, individuals were viewed with the scanning electron microscope (SEM) to study the lateral head pores and claws in more detail.

From the measurements of the body (length, hight, trunk, etc.) no clear differences were found. However, these results do help with abandoning the idea that the morphological varieties can be considered separate species. Measurements on the lateral head pores and SEM pictures of the claws provided new directions to look further for differences between the genetic groups, more research is needed for this.

The lateral headpores appear different in group 1 than in groups 2 and 3. In group 1, the lateral headpore is on average closer to the fornix edge and scale edge. This is because the lateral headpore in group 1 is usually located against the fornix edge while in groups 2 and 3 it is usually away from it.

Samenvatting

Het watervlooien genus *Bosmina* heeft in de loop der tijd voor een legendarische taxonomische verwarring gezorgd. De soort *Bosmina longirostris* heeft een groot aandeel in deze taxonomische verwarring. De morfologische variatie in de soort is groot. Er worden zes morfologische variëteiten onderscheiden die ooit eens als soort zijn omschreven. Tegenwoordig worden er in veel andere watervlooien genera cryptische soorten gevonden aan de hand van genetisch onderzoek. *Bosmina longirostris* lijkt in Nederland te bestaan uit drie genetische groepen. Om morfologische verschillen tussen deze genetische groepen te vinden zijn er metingen verricht aan parthenogenetische vrouwtjes uit elf van de twaalf populaties uit het genetisch onderzoek van NIOO-KNAW. De metingen aan de grootte van het lichaam zijn lichtmicroscopisch gedaan. Aanvullend zijn er individuen bekeken met de scanning elektronen microscoop (SEM) om de laterale kopporiën en de klauwen in meer detail te kunnen bestuderen.

De metingen aan het lichaam (lengte, hoogte, slurf etc.) leverden geen duidelijke verschillen op. Wel helpen deze resultaten met het loslaten van de gedachte dat de morfologische variëteiten als aparte soorten beschouwd kunnen worden.

De laterale kopporiën lijken anders in groep 1 dan in groep 2 en 3. In groep 1 ligt de laterale kopporie gemiddeld dichter bij de fornixrand en schaalrand. Dit komt doordat de laterale kopporie in groep 1 meestal tegen de fornixrand gelegen is terwijl deze in groep 2 en 3 meestal er van af ligt.

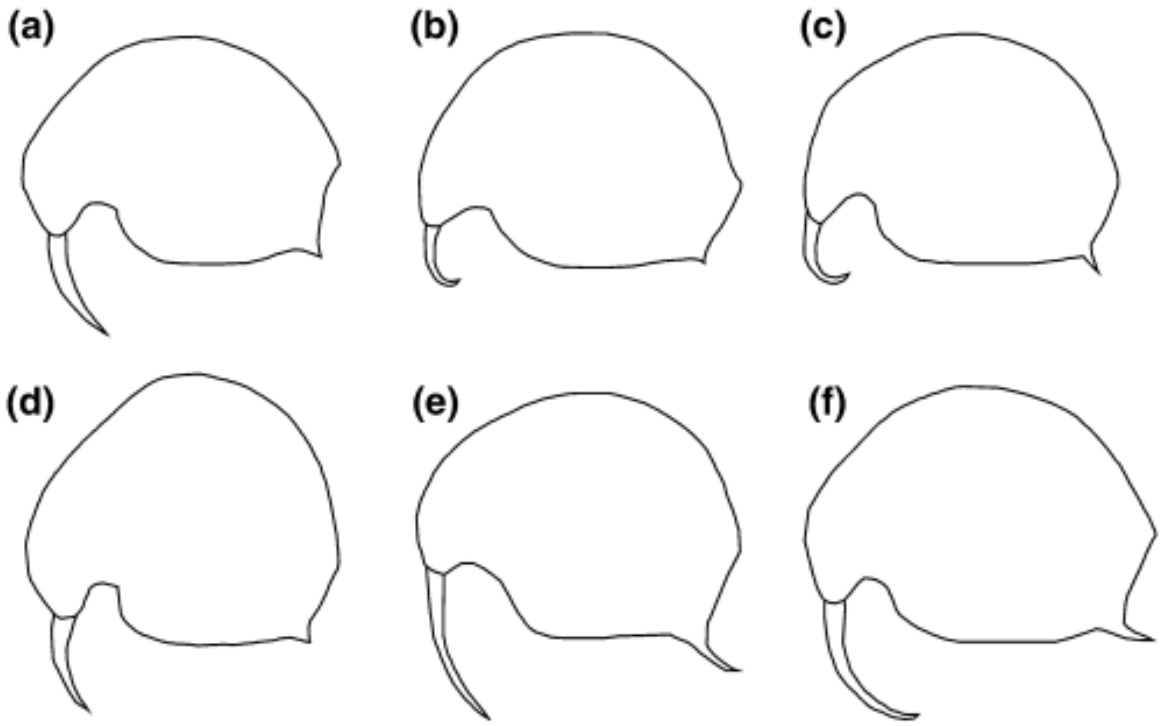
Inhoudsopgave

1 Inleiding 6
1.1 Leeswijzer 8
2 Materiaal & methode 9
2.1 Onderzoeksopzet 9
2.2 Licht microscoop 10
2.3 Scanning elektronen microscoop 11
2.4 Selectie van geschikte individuen 12
2.5 Afmetingen 12
2.6 Kopporiën 13
2.7 Achterlijfsklauw 14
2.8 Gegevens verzameling & analyse 14
3 Resultaten 16
3.1 Morfologische variëteiten 16
3.2 Statistische analyse morfologische eigenschappen 17
3.3 Post hoc analyse morfologische eigenschappen 18
3.4 Morfologische ratio's 25
3.5 Post hoc analyse morfologische ratio's 26
3.6 Overzicht metingen morfologische eigenschappen 29
3.7 Aanvullende bevindingen scanning elektronen microscoop 32
4 Discussie 34
5 Conclusie 38
5.1 Morfologische variëteiten 38
5.2 Morfologische metingen 38
5.3 Andere morfologische eigenschappen 38
5.4 Eindconclusie 38
6 Aanbevelingen 39
Literatuur 40
Bijlage 1 Logboek 42
Bijlage I Planplaatje 43

1 Inleiding

Het watervlooien genus *Bosmina* Baird, 1945, heeft in de loop der tijd voor legendarische taxonomische verwarringen gezorgd (Goulden & Frey, 1963; De Melo & Hebert, 1994; Taylor, Ishikane & Haney, 2002; Kotov, Ishida & Taylor, 2009). De basis van de verwarringen ligt bij de opdeling van het genus zelf in één, twee of vier (sub) genera. De indeling van Lieder (1983) in vier (sub) genera (*Bosmina, Eubosmina, Sinobosmina* en *Neobosmina)* is tegenwoordig het populairst. In Europa komen alleen de (sub) genera *Bosmina* en *Eubosmina* voor. Het (sub) genus *Bosmina* is een lastig genus dat in Europa uit één soort bestaat, *Bosmina longirostris,* Müller, 1785. In Noord-Amerika zijn *Bosmina freyi,* De Melo & Hebert, 1994, en *Bosmina Liederi,* De Melo & Hebert, 1994, van *B. longirostris* afgesplitst (De Melo & Hebert, 1994; Taylor *et al*., 2002). De soort *Bosmina longirostris* vertoont grote morfologische variatie en heeft hiermee een belangrijke bijdrage geleverd aan de taxonomische verwarring (Adamczuk, 2016).

Binnen de soort kunnen zes morfologische variëteiten worden onderscheiden; *B. pellucida,* Stingelin, 1895, *B. cornuta,* Jurine, 1820, *B. longirostris, B. brevicornis,* Hellich, 1877, *B. similis,* Sars, 1890, en *B. curvirostris,* Fischer, 1854, (Figuur 1) (Adamczuk, 2016). De morfologische variëteiten zijn eens omschreven als aparte soorten hierna weer ondergebracht als variëteiten van *B. longirostris* (Adamczuk, 2016; Błędzki & Rybak, 2016). Hiermee verdween het vermoeden van cryptische soorten onder *B. longirostris* .



Figuur 1: Een overzicht van de zes verschillende morfologische variëteiten; a-longirostris, b-curvirostris, c-cornuta, d-brevicornis, e-similis & f-pellucida (Adamczuk, 2016).

Tegenwoordig staat het voorkomen van cryptische soorten binnen *B. longirostris* weer ter sprake. Enkele aanleidingen voor deze hernieuwde interesse in cryptische soorten zijn het wereldwijd voorkomen in een grote verscheidenheid aan wateren, afsplitsing van Noord-Amerikaanse soorten, geobserveerde variaties van kopporiën binnen Europese populaties, de grote morfologische variatie en afwijkend genetisch materiaal uit Japan.

De soort komt wereldwijd voor in zowel ondiepe eutrofe wateren, maar ook in diepe oligotrofe meren (Adamczuk, 2016). De theorieën van het non-kosmopolitisme en continentaal endemisme stellen dat voor dergelijke soorten een zorgvuldige taxonomische revisie vereist is (Garibian *et al,* 2020). Frey (1987) zegt; ''De "soorten" waarvan wordt beweerd dat zij kosmopolitisch zijn, blijken groepen of complexen van morfologisch gelijksoortige soorten te zijn, waarvan elk lid een veel beperkter verspreidingsgebied heeft dan de groep of het complex als geheel.'' Enkele voorbeelden van groepen waarbij er soorten verscholen gingen onder een soortencomplex zijn; de revisie van het watervlooien genus *Scapholeberis,* Schoedler, 1858, (Garibian *et al*, 2020), de ontdekking van cryptische soorten onder de kosmopolitische soort *Chydorus sphaericus*, Müller, 1776, in Rusland (Klimovsky & Kotov, 2015) en een fylogenetische analyse van het genus *Ceriodaphnia,* Dana, 1853, waarbij tenminste vijf onbeschreven soorten zijn gevonden en mogelijk nog meer door de hoge genetische variatie binnen bestaande soorten (Alonso *et al.,* 2021).

Het afsplitsen van de Noord-Amerikaanse *Bosmina* soorten is een goede aanleiding om populaties elders beter te onderzoeken. Dit is mede aan de hand van laterale kopporiën gebeurt, waarvan Goulden en Frey (1963) aangaven dat dit een belangrijk kenmerk is voor het onderscheiden van soorten en genera binnen de *Bosminidae,* Baird, 1845. Binnen Europa blijken er verschillen te zijn waargenomen in laterale kopporiën (Hudec, 1989; Kappes & Sinsch, 2002). Dit is van belang, omdat de Noord-Amerikaanse soorten op basis van laterale kopporiën te onderscheiden zijn van *B. longirostris* (De Melo & Hebert, 1994; Adamczuk, 2016). De laterale kopporiën van *B. longirostris* in Europa zijn weinig onderzocht. Hudec (1989) observeerde verschillende laterale kopporiën in Slowaakse populaties van *B. longirostris* die specifiek zouden zijn voor morfologische variëteiten. Kappes & Sinsch (2002), daarentegen beweren dat er in Duitse meren ook verschillende laterale kopporiën zijn geobserveerd, maar dat deze niet specifiek aan een morfologische variëteit te koppelen zijn.

Daarnaast blijft er altijd de grote morfologische variatie binnen de soort. Ondanks de vele onderzoeken naar de morfologie van *B. longirostris* is er nog veel onduidelijk. Onderzoek naar de morfologische variëteiten *B. pellucida, B. cornuta* en *B. longirostris* suggereert dat een herindeling op soort niveau mogelijk is (Kappes & Sinsch, 2002). Kotov (2009) bekritiseert dit door het ontbreken van genetische onderbouwing in het onderzoek van Kappes en Sinsch (2002) met de aantekening dat er meer onderzoek nodig is naar *B. longirostris* in Europa.

Het commentaar van Kotov (2009) brengt het aspect van genetisch onderzoek aan het licht. Er wordt veel hoop gevestigd op DNA barcoding om de taxonomische problemen op te helderen zoals dit in andere soortgroepen al is gebeurd. Gedegen genetisch onderzoek naar *B. longirostris* in Europa ontbreekt. Wel heeft gedegen DNA onderzoek de kwestie van de indeling van de vier (sub) genera opgehelderd voor het genus *Bosmina* (Taylor *et al.,* 2002; Kotov *et al.,* 2009*).* Een Japans onderzoek toont genetische lijnen binnen *B. longirostris* aan die specifiek zijn voor Japan wat wellicht cryptische soorten aanduidt. Echter worden er in dit onderzoek geen harde conclusies getrokken over het bestaan van cryptische soorten in Japan (Ishida, 2012). Mogelijk liggen hier kansen om de taxonomische problematiek van *B. longirostris* op te lossen.

Tot op heden blijft de vraag of B. longirostris cryptische soorten herbergt in Europa en daarmee ook in Nederland onbeantwoord, ondanks het belang van de soort in de limnologie (Kotov et al., 2009; Adamczuk, 2016; Wang et al., 2019). Onderzoek naar de taxonomie van *B. longirostris* lijkt consequent vast te lopen door het ontbreken van een goede revisie van de soort (Adamczuk, 2016). Er wordt verwacht dat *B.*

longirostris uit cryptische soorten bestaat door subtiele verschillen zoals de vorm en ligging van de laterale kopporiën en de bestekeling op de klauwen (Hudec, 1989; Adamczuk, 2016). Om de cryptische soorten wel of niet aan te tonen moeten de morfologische variëteiten worden losgelaten. Er moet naar andere onderscheidende morfologische eigenschappen worden gezocht met ondersteuning van DNA onderzoek (Adamczuk, 2016). In recent genetisch onderzoek van NIOO-KNAW lijkt *Bosmina longirostris* in Nederland uit drie genetische groepen te bestaan (Cakir, 2021). Deze thesis levert een bijdrage aan de beschrijving van de morfologie van de door het NIOO-KNAW genetisch onderzochte populaties. Om te kijken of er onderscheidende morfologische kenmerken zijn tussen de drie genetische groepen is de volgende hoofdvraag opgesteld:

- **Met welke morfologische kenmerken kunnen de drie genetische groepen binnen *Bosmina longirostris* van elkaar worden onderscheiden?**

Om de hoofdvraag te beantwoorden zijn de volgende deelvragen opgesteld:

- **Welke van de zes morfologische variëteiten zijn er vertegenwoordigd in de genetische groepen?**
- **Wat zijn de verschillen van laterale kopporiën tussen de drie genetische groepen?**
- **Wat zijn de verschillen van klauwen tussen de drie genetische groepen?**
- **Welke andere onderscheidende morfologische kenmerken zijn er waarneembaar tussen de drie genetische groepen?**

Bosmina longirostris bestaat in Nederland mogelijk uit drie cryptische soorten. De zes morfologische variëteiten zijn waarschijnlijk niet te koppelen aan de drie genetische groepen. Mogelijk kunnen de genetische groepen worden onderscheiden aan de hand van de laterale kopporiën, klauwen of andere morfologische kenmerken.

1.1 Leeswijzer

De materiaal en methode voor het onderzoek wordt in hoofdstuk 2 behandeld. Na de materiaal en methode worden de resultaten gegeven. Hierna worden de resultaten en het onderzoek bediscussieerd in hoofdstuk 4. Na de discussie worden de conclusies gegeven op de deelvragen en hoofdvraag. Na de conclusie worden in hoofdstuk 6 aanbevelingen gegeven.

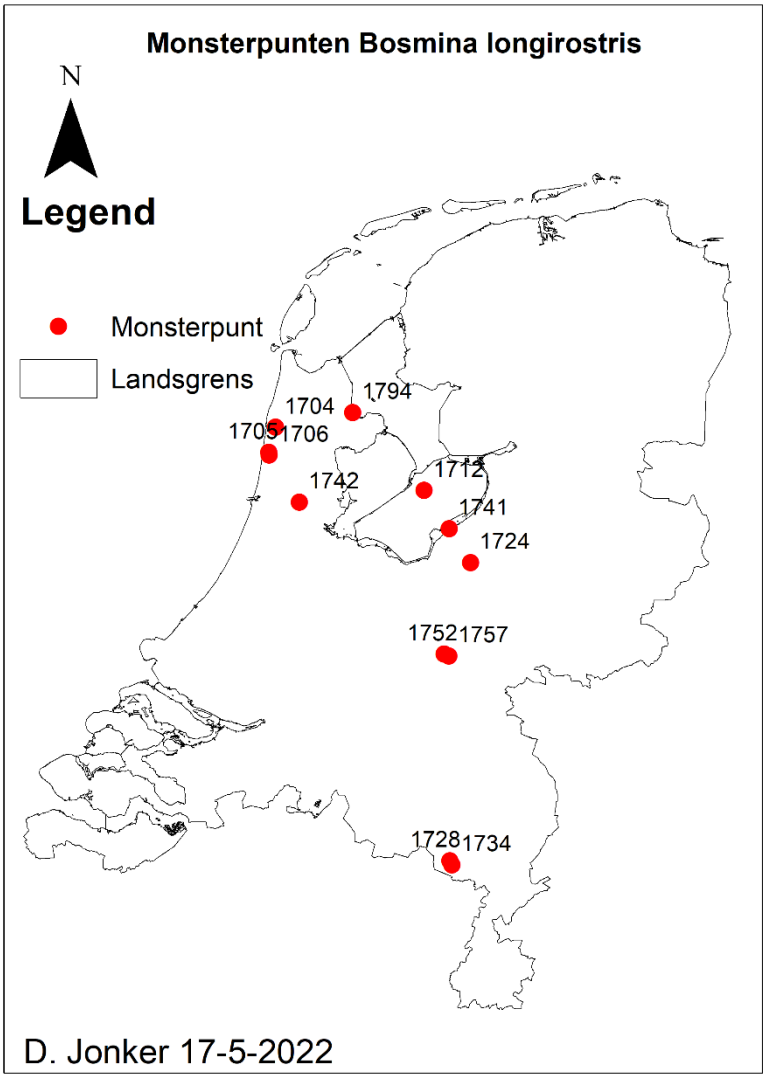
2 Materiaal & methode

2.1 Onderzoeksopzet

In genetisch onderzoek van NIOO-KNAW lijken er drie genetische groepen te zijn binnen de twaalf Nederlandse *Bosmina longirostris* populaties die zijn onderzocht (Tabel 1 & figuur 2) (Cakir, 2021). Om morfologische verschillen tussen de drie genetische groepen aan te tonen werden er metingen verricht aan volwassen, vrouwelijke individuen uit de twaalf populaties. De metingen omvatte onder andere de grootte van individuen en lichaamsdelen, maar ook tanden op bijvoorbeeld de klauwen. Met deze gegevens kon worden gezocht naar het bestaan van morfologische verschillen tussen de genetische groepen. Voor de meeste metingen werd gewerkt met een lichtmicroscoop (LM). Daarnaast werden individuen met een scanning elektronen microscoop (SEM) bekeken, waarmee kleinere details zoals haren en tanden beter zichtbaar zijn. Het onderzoek vond plaats op het hydrobiologisch laboratorium van Rijkswaterstaat Lelystad.

Tabel 1: Monsters gebruikt in onderzoek NIOO-KNAW, met het originele monster nummer uit de collectie van M. Soesbergen, vindplaats, datum monstername en de genetische groep.

NIOO nr	Collectie M. Soesbergen	Vindplaats	Datum	Groep
NL0067	1757	Betuwe 2	31-mei	1
NL0093	1794	Medemblik kleine vliet	19-jun	1
NL0008	1705	Egmond kasteel	10-apr	2
NL0009	1706	Egmond zeeweg	10-apr	2
NL0047	1734	Geurtjesven	10-mei	2
NL0053	1741	Veluwemeer	14-mei	2
NL0007	1704	Schoorl SBB bezoekrscentrum	9-apr	3
NL0022	1712	Lelystad Landstrekenwijk	26-apr	3
NL0036	1724	Bleeke meer	3-mei	3
NL0040	1728	Weerterbergen	10-mei	3
NL0056	1742	Oostzanerveld	20-mei	3
NL0062	1752	Blauwe kamer	31-mei	3



Figuur 2: Overzichtskaart met de monsterpunten

2.2 Licht microscoop

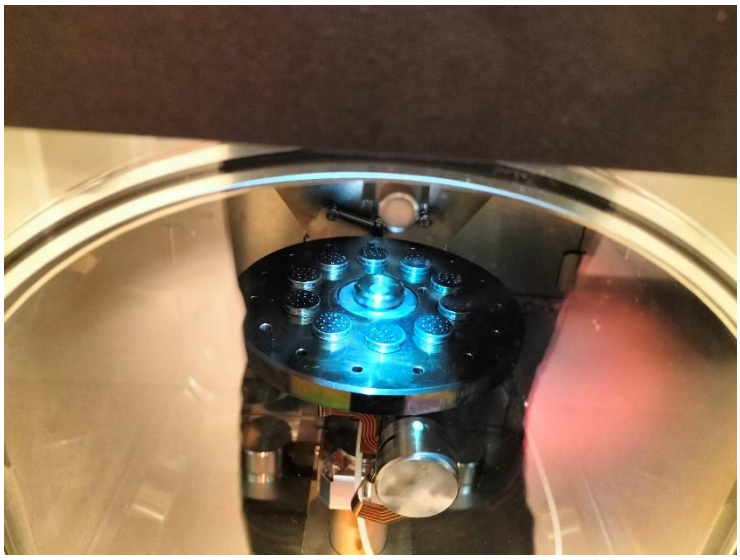
De gebruikte LM is een Olympus BX 51 met een vergroting van 40-600 keer. De LM is gekoppeld aan een computer waarop Olympus Cellsens software is geïnstalleerd. In de software werden de metingen uitgevoerd en foto's gemaakt. De individuen werden voor behandeld met een 4% natronloog oplossing om het individu op te helderen. Het ophelderen zorgt ervoor dat details zoals laterale kopporiën beter zichtbaar werden. Het proces van het ophelderen werd uitgevoerd door de individuen eerst in een druppel ethanol onder een dekglaasje te leggen. Hierna werd er aan één zijde een druppel natronloog gelegd en aan de andere zijde een tissue dat het ethanol onder het dekglaasje vandaan zoog. Hierdoor werd de druppel natronloog aan de andere zijde onder het dekglaasje gezogen. Om het preparaat vast te leggen en het contrast te verhogen werd er een druppel glycerine op dezelfde wijze onder het dekglaasje gezogen.

2.3 Scanning elektronen microscoop

De SEM die gebruikt werd is een Phenom pro X ingesteld op 10Kv. Om de individuen met de SEM te kunnen bekijken moesten deze worden voor behandeld (Laforsch & Tollrian, 2000; Juračka et al., 2016). De behandeling die gebruikt werd heet hexamethyldisilazaan dehydratatie (Lafroche & Tollrian, 2000; Juračka *et al*., 2016). De eerste stap is om de weefsels te dehydrateren door een verdunningsreeks in ethanol te doorlopen (Laforsch & Tollrian, 2000; Juračka et al., 2016). De monsters waren gefixeerd in 95% ethanol. Hierdoor was het onnodig om de verdunningsreeks te doorlopen en kon worden volstaan met twee keer 10 minuten spoelen in 100% ethanol (Laforsch & Tollrian, 2000; Juračka *et al*., 2016).

Na het spoelen werden de individuen in een glazen buisje gepipetteerd met zo min mogelijk ethanol. Hierna werd 1ml hexamethyldisilazaan (HMDS) in het buisje gepipetteerd om de structuur van de individuen vast te leggen. De HMDS verving gedurende 10 min het ethanol in het individu. Hierna werden de individuen uit de HMDS gepipetteerd op een Precision wipe van Kimtech science. De tissues zijn extra fijn van structuur waardoor de individuen er niet aan vast bleven zitten. Hierna werd er 15-30min gewacht tot de HMDS was verdampt. Als de stof was verdampt konden de individuen op een 12,5mm rond aluminium stubje worden bevestigd doormiddel van dubbelzijdig tape (TED PELLA INC. Pelco tabs 12mm). Om de individuen onbeschadigd van het papieren doekje op het stubje te krijgen werd er gebruik gemaakt van een fijn penceeltje met zachte haren. Door heel voorzichtig een individu aan te stippen bleef deze in de haren van het penceeltje hangen waarna deze heel precies op het stubje gepositioneerd kon worden. De dehydratatie werd voltooid door het stubje voor 30min in een droogstoof op 50 °C te plaatsen (Laforsch & Tollrian, 2000; Juračka *et al*., 2016). De laatste stap is het sputteren van het individu met goud (Figuur 3 & 4). De sputtermachine (Leica EM ACE 600) werd ingesteld op een goud laagdikte van 10nm. De stubjes werden bewaard in een ladekast waarvan de onderste lade was gevuld met silica korrels, dit voorkomt het aantrekken van vocht waardoor de stubjes onbruikbaar zouden worden.

Figuur 3: Sputtermachine



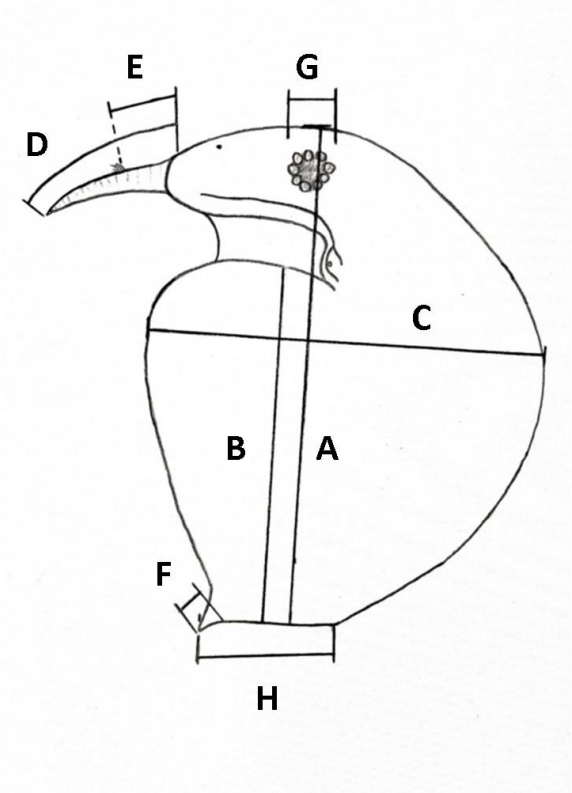
Figuur 4: Stubjes in sputtermachine

2.4 Selectie van geschikte individuen

Voor dit onderzoek werden alleen parthenogenetische volwassen vrouwelijke exemplaren gebruikt. Van mannelijke en juveniele dieren kan niet altijd de variëteit worden bepaald (Soesbergen, 2021a). Uit elke populatie werden 30 geschikte exemplaren geïsoleerd. Van deze 30 werden er 10 gebruikt voor de LM behandeling en 20 voor de SEM behandeling. Voor de SEM werden meer individuen geprepareerd om een grotere kans te genereren op individuen die goed op het stubje gepositioneerd waren. Om de morfologische variëteiten te bepalen werd er gewerkt met de determinatietabel ''De kieuwpootkreeften van de Benelux'' (Soesbergen, 2021a) en de originele beschrijvingen van de variëteiten. De determinatie werd uitgevoerd onder een binoculair (Olympus SZX12) met twee kijkers. Het voordeel van twee kijkers is dat er gemakkelijk gediscussieerd kon worden. Hiermee konden de variëteiten betrouwbaar worden gedetermineerd. Vervolgens kon er worden gekeken hoe de variëteiten waren verdeeld over de genetische groepen.

2.5 Afmetingen

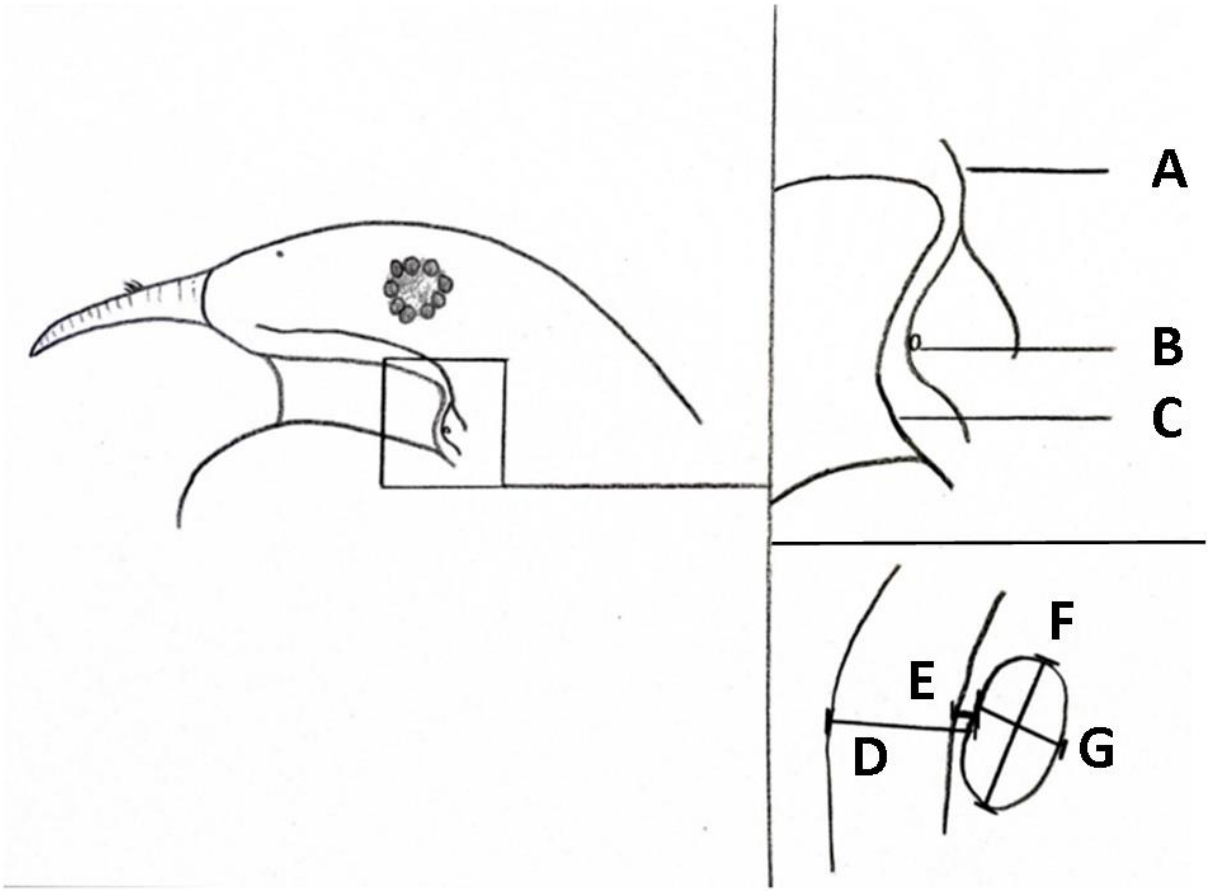
Er werden verschillende metingen verricht om te kunnen bepalen of er nog andere morfologische eigenschappen te onderscheiden waren (Figuur 5): totale lengte, lengte van het carapax, hoogte van het carapax , oogdiameter, lengte van de mucro, lengte van de antenne gemeten over de buitenkant, lengte vanaf het rostrum tot de uitsteeksels op de antenne en de hoogte van de achterrand (Kappes & Sinch, 2002). Met deze metingen konden de volgende ratio's worden berekend: lengte/hoogte, carapax lengte/hoogte, lengte vanaf het rostrum gemeten tot aan de reukstaafjes op de slurf/lengte van de antenne over de buiten kant gemeten, lengte van de antenne over de buiten kant gemeten/lichaamslengte, lengte van de mucro/lichaamslengte en de lengte van de mucro/hoogte van de achterrand (Kappes & Sinch, 2002). Aan de metingen van Kappes & Sinsch (2002) werd nog de hoogte van de achterrand toegevoegd, omdat dit bij andere watervlooien onderscheidend kan zijn (Soesbergen, 2021). Deze metingen werden uitgevoerd doormiddel van een LM en het programma Cellsense.



Figuur 5: Metingen voor morfologische eigenschappen hertekend naar Kappes & Sinsch (2002). A totale lengte, B lengte van het carapax, C hoogte van het carapax, D lengte van de slurf, E lengte van het rostrum tot uitsteeksels, F lengte mucro, G oogdiameter en H hoogte van de achterrand.

2.6 Kopporiën

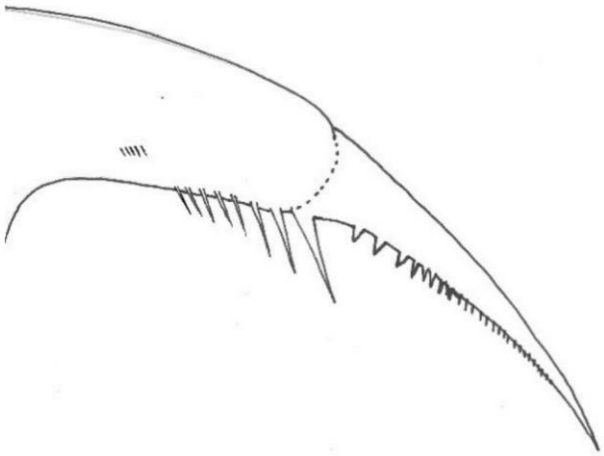
Laterale kopporiën zijn voor meerdere soorten watervlooien een belangrijk onderscheidend kenmerk (Figuur 6) (Kořínek *et al.,* 1997). Hier werd de ligging ten opzichte van de fornix (tegenaan/ervan af) genoteerd. Als de kopporie van de fornix af lag dan werd deze afstand gemeten. Daarnaast werd de lengte breedte verhouding van de kopporiën gemeten. Van de kopporiën werden LM en SEM foto's gemaakt om verschillende individuen achteraf visueel met elkaar te kunnen vergelijken.



Figuur 6: Schematische weergave van de laterale kopporie. A fornix, B laterale kopporie, C schaalrand, D afstand kopporie tot schaalrand, E afstand kopporie tot fornix, F lengte kopporie en G breedte kopporie (Eigen tekening).

2.7 Achterlijfsklauw

Er werd gekeken naar de klauw op het achterlijf en met name naar onderscheidende bestekeling (Figuur 7). De stekels op de klauw vertonen variaties in grootte en positie die slecht zijn onderzocht (Kotov *et al.*, 2009). Van de klauw werd het aantal stekels op de basis en klauw en het aantal stekels in de rij op de klauw geteld. Van elke klauw werden LM en SEM foto's gemaakt om de positie van de stekels met elkaar te kunnen vergelijken.



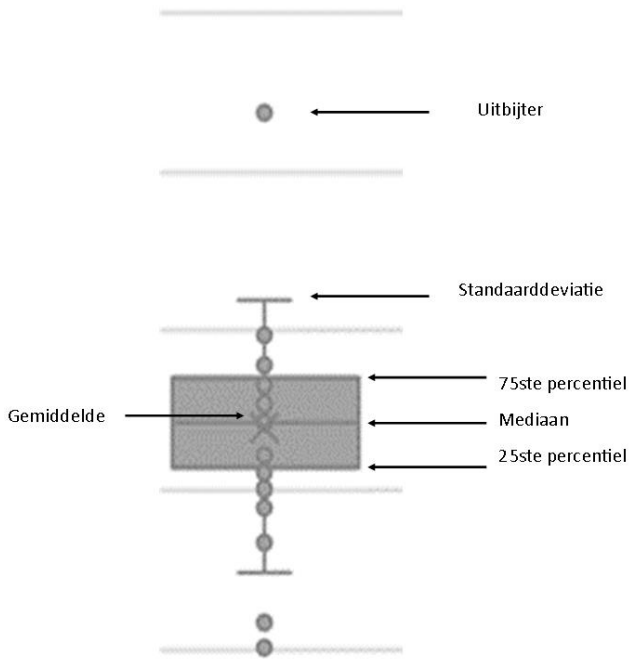
Figuur 7: Klauw van Bosmina longirostris zoals deze te zien is met een licht microscoop (Soesbergen, 2021)

2.8 Gegevens verzameling & analyse

De gegevens werden verzameld in Excel. De tabel was zo opgezet dat iedere rij een individu is en de variabelen werden gerangschikt per kolom. Om de genetische groepen te kunnen vergelijken werden de gegevens geconglomereerd onder de drie genetische groepen doormiddel van draaitabellen. De gemiddelden, de standaard deviatie en minimale en maximale waarde in een tabel samengevat in één tabel om een overzicht en een eerste vergelijking van de gegevens te krijgen. De gegevens staan digitaal opgeslagen bij het Hydrobiologisch laboratorium van Rijkswaterstaat Lelystad.

Op numerieke waardes (metingen, ratio's en tellingen) werd eerste een Levene's toets uitgevoerd om de gelijkheid van de variantie te bepalen. Een significante Levene's toets betekend een ongelijke variantie. Bij een gelijke variantie werd de standaard ANOVA uitgevoerd. Bij een ongelijke variantie werd de Welch's ANOVA uitgevoerd, omdat deze toets bestand is tegen ongelijke varianties tussen de groepen. De ANOVA's werden gebruikt om aan te toetsen of er een significant verschil aanwezig was tussen de groepen. Als er een significant verschil was aangetoond met de (Welch's) ANOVA kon er met een post hoc toets bepaald worden welke groepen er significant verschillend waren en hoe deze verschillen morfologisch zichtbaar waren. Als post hoc toets werd de Tukey HSD gebruikt als de standaard ANOVA was toegepast en de Games Howell als de Welch's ANOVA was toegepast.

Als figuur bij de post hoc werden er boxplots gebruikt (Figuur 8). In de boxplots is groep 1 met blauw, groep 2 met oranje en groep 3 met grijs aangegeven. In de boxplots is de spreiding van de gegevens met punten, de mediaan met een horizontale lijn, het gemiddelde met x en de standaarddeviatie met een dunne horizontale lijn op een verticale lijn aangegeven. Punten buiten de standaarddeviatie worden beschouwd als uitbijter.



Figuur 8: De onderdelen van een boxplot

Voor verspreiding van de morfologische variëteiten over de genetische groepen werd een frequentie tabel gemaakt van de morfologische variëteiten in de genetische groepen. Hierna werd een Chi-square test uitgevoerd tussen de drie genetische groepen. Als post hoc werden er drie Chi-square tests uitgevoerd met Bonferoni correctie. Deze correctie geeft bescherming tegen type I fouten door de alpha te delen door het aantal vergelijkingen. In dit geval waren er drie vergelijkingen waardoor de alpha 0,05/3=0,0167 werd. Met deze toetsen kan er worden bepaald hoe de groepen verschillen in aantallen van de morfologische vormen.

3 Resultaten

3.1 Morfologische variëteiten

De verdeling van zes morfologische vormen is weergegeven in tabel 2. In groep 1 was variëteit *longirostris* het meest voorkomend, voor groep 2 en 3 was dit *pellucida*. De variëteiten *cornuta, longirostris* en *pellucida* werden in elke groep waargenomen. De variëteit *brevicornis* is niet in groep 3 waargenomen en de variëteit *similis* is enkel in groep 3 waargenomen. *Curvirostris* is geen enkele keer waargenomen. De Chi-square test was significant (P=0,0000002). Alle groepen kwamen significant verschillend van elkaar uit de post hoc Chi-square test met Bonferoni correctie voor de alpha (Tabel 3).

Tabel 2: Frequentietabel morfologische variëteiten

	1	2	3
Curvirostris	0%	0%	0%
Brevicornis	8%	8%	0%
Cornuta	18%	27%	30%
Longirostris	49%	12%	8%
Pellucida	25%	53%	57%
Similis	0%	0%	5%

Tabel 3: Resultaten post hoc Chi-square tests. Significante verschillen aangegeven in rood

	P	**Significant**
1 en 2	0,002	Ja
1 en 3	1,1E-07	Ja
2 en 3	0,005	Ja
Alpha na Bonferoni correctie	0,0167	

3.2 Statistische analyse morfologische eigenschappen

Tabel 4 geeft de resultaten van de statistische analyse op de metingen. Uit de Levene's test bleek dat de variantie gelijk was in de volgende parameters; hoogte kop, lengte tot reukstaafjes, oogdiameter, lengte laterale kopporie, breedte laterale kopporie, afstand laterale kopporie schaalrand, afstand laterale kopporie fornixrand, aantal tanden basis klauw en tanden grof. Op deze parameters is daarom een ANOVA uitgevoerd. De variantie was niet gelijk in de volgende parameters; totale lengte, lengte carapax, hoogte achterrand, hoogte carapax, lengte slurf, mucro knobbels, lengte mucro en tanden grof. Op deze parameters is de Welch's ANOVA uitgevoerd. Uit de statistische analyse kwamen 10 van de 17 als significant uit de tests. De 10 significante parameters worden in paragraaf 3.4 toegelicht doormiddel van post hoc toetsing met Tukey HSD als de standaard ANOVA was gebruikt en de Games Howell als de Welch ANOVA was gebruikt.

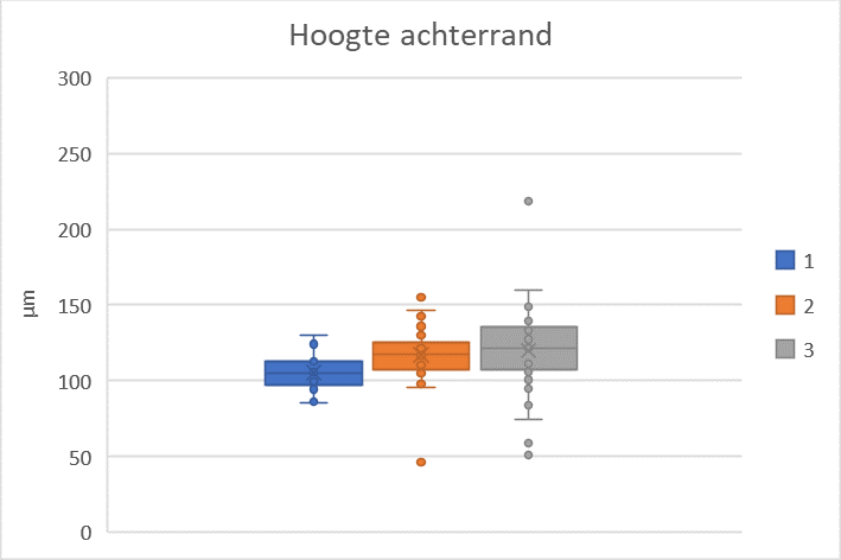
Tabel 4: Resultaten Levene's test, ANOVA en Welch's ANOVA. Significante verschillen aangegeven in rood.

	Levene's test	**ANOVA**	**Welch ANNOVA**
Parameter			
Lichaam			
Totale lengte	0,0003		0,18
Lengte carapax	0,002		0,58
Hoogte kop	0,11	0,20	
Hoogte achterrand	0,03		0,004
Hoogte carapax	0,0004		0,13
Lengte tot reukstaafjes	0,30	0,001	
Lengte slurf	0,02		4,7E-05
Mucro knobbels	0,0002		0,0008
Lengte mucro	0,004		0,003
Oogdiameter	0,054	0,03	
Laterale kopporie			
Lengte laterale kopporie	0,39	2,7E-06	
Breedte laterale kopporie	0,15	0,47	
Afstand laterale kopporie schaalrand	0,09	0,0004	
Afstand kopporie fornix	0,23	2,1E-10	
Klauw			
Aantal tanden basis klauw	0,73	0,003	
Aantal tanden klauw	0,90	0,35	
Tanden grof	0,003		0,06

3.3 Post hoc analyse morfologische eigenschappen

Hoogte achterrand

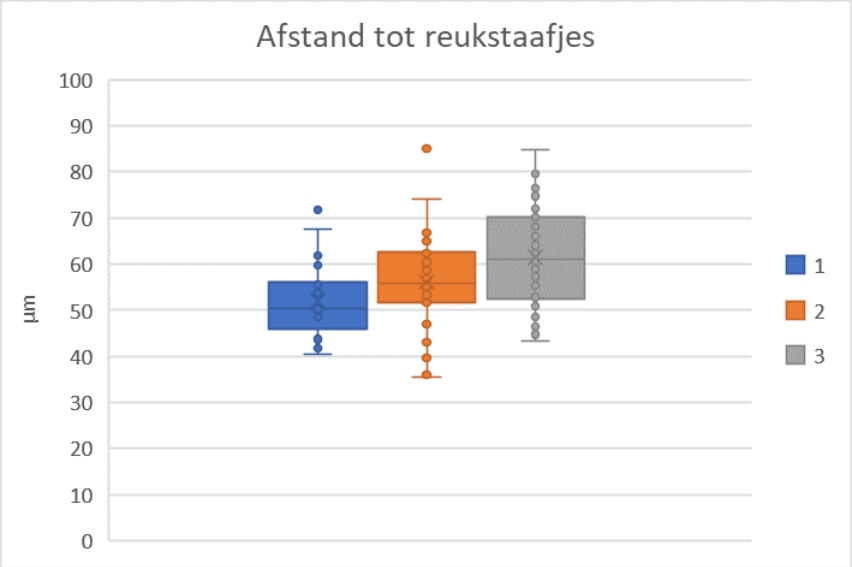
De Welch's ANOVA was significant (F=6,05; df=64; P=0,003) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 9) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Games Howell post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 significant te verschillen (P=0,002). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,009). Tussen groep 2 en 3 is geen significant verschil gevonden (P=0,8).



Figuur 9: Boxplot hoogte achterrand. Groep 1: n=20, x̄ 105 µm ±13; groep 2: n=39, x̄ 117 µm ±18; groep 3: n=50, x̄ 120 µm ±26

Lengte tot reukstaafjes

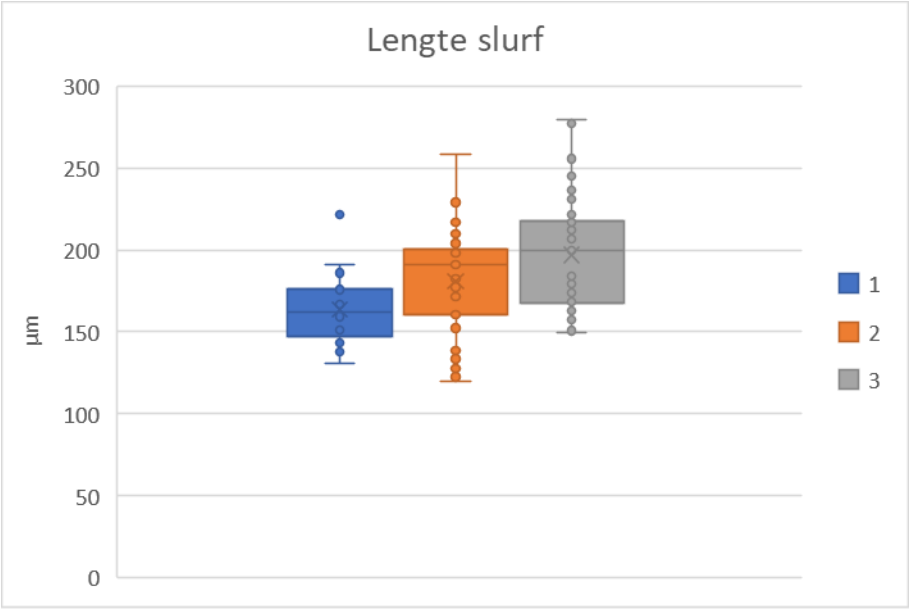
De ANOVA gaf een significant verschil (F=7,20; df=106; P=0,001). De boxplot (Figuur 10) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey hsd post hoc toets bleek dat er geen significant verschil is tussen groepen 1 en 2 (P=0,3). Groepen 1 en 3 zijn significant verschillend (P=0,001). Tussen groepen 2 en 3 is een significant verschil gevonden (P=0,036).



Figuur 10: Boxplot afstand tot reukstaafjes. Groep 1: n=20, x̄ 52 µm ±8; groep 2: n=39, x̄ 56 µm ±10; groep 3: n=50, x̄ 61 µm ±10

Lengte slurf

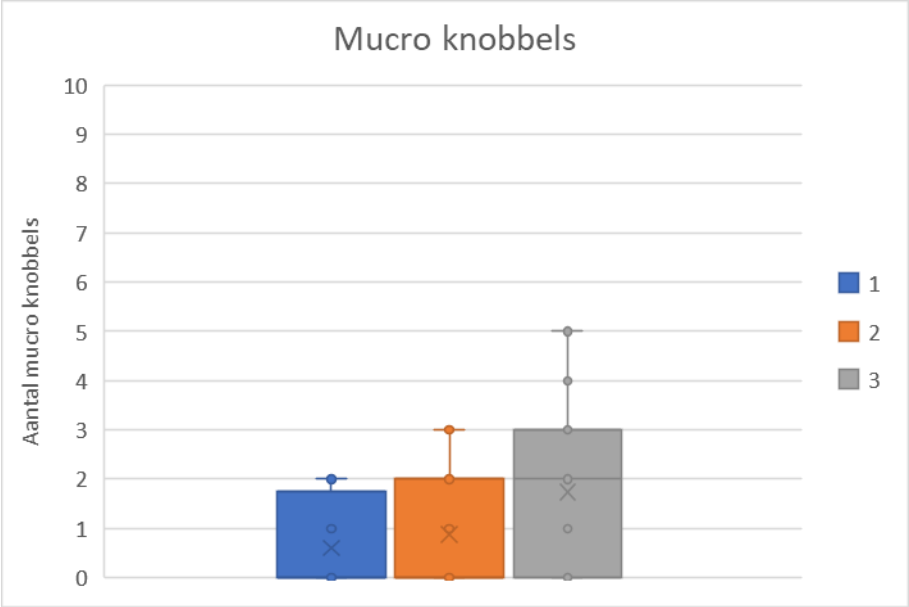
De Welch's ANOVA was significant (F=11,78; df=61; P=4,7E-05) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 11) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Games Howell post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 significant te verschillen (P=0,04). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=2,7E-05). Tussen groep 2 en 3 is geen significant verschil gevonden (P=0,06).



Figuur 11: Boxplot lengte slurf. Groep 1: n=20, x̄ 164 µm ±21; groep 2: n=39, x̄ 181 µm ±30; groep 3: n=50, x̄ 197 µm ±34

Mucro knobbels

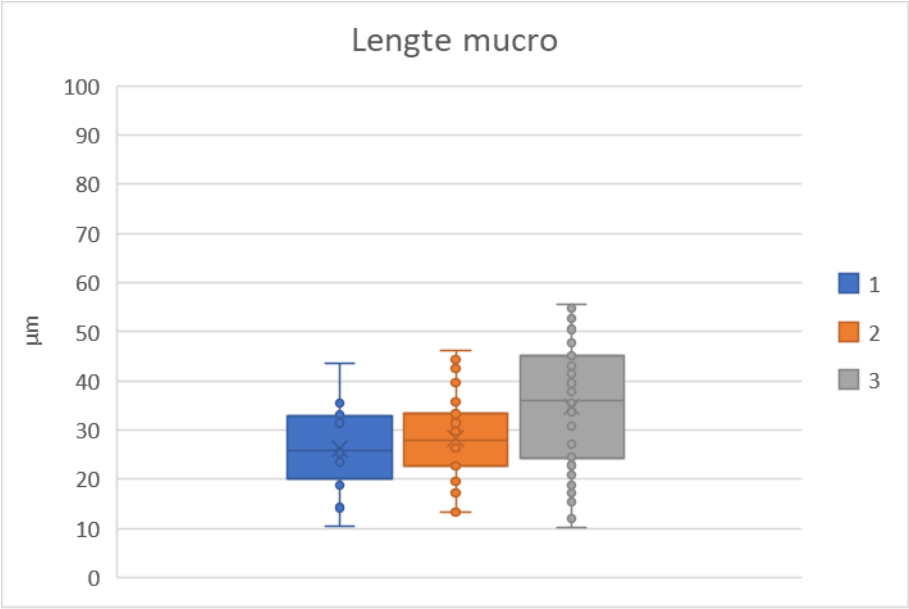
De Welch's ANOVA was significant (F=8,1; df=61; P=0,0008) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 12) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Games Howell post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 niet significant te verschillen (P=0,6). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,0007). Tussen groep 2 en 3 is ook een significant verschil gevonden (P=0,008).



Figuur 12: Boxplot aantal mucro knobbels Groep 1: n=20, x̄ 1 ±1; groep 2: n=39, x̄ 1 ±1; groep 3: n=50, x̄ 2 ±2

Lengte mucro

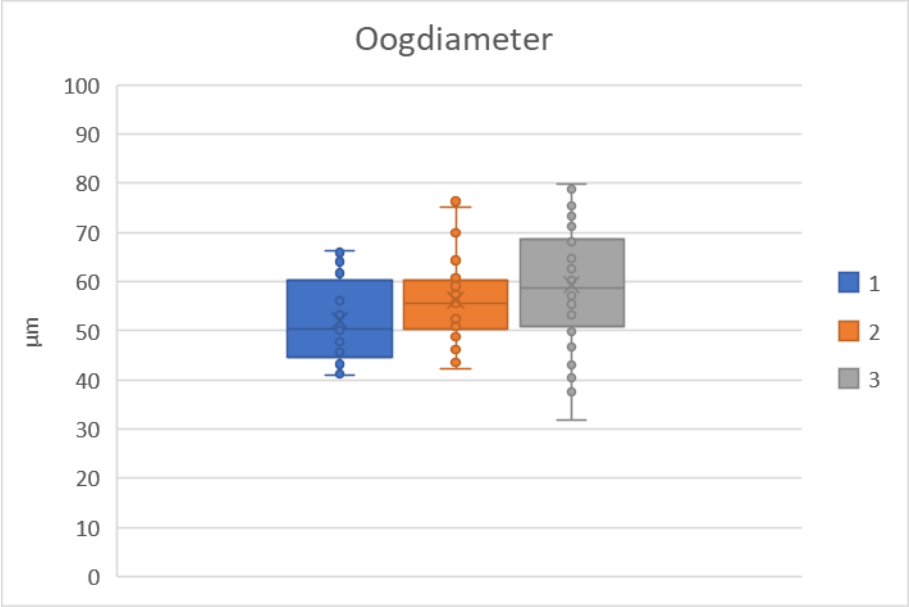
De Welch's ANOVA was significant (F=6,3; df=57; P=0,003) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 13) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Games Howell post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 niet significant te verschillen (P=0,6). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,004). Tussen groep 2 en 3 is een significant verschil gevonden (P=0,02).



Figuur 13: Boxplot lengte mucro. Groep 1: n=20, $\bar{x}$ 26 µm ±8; groep 2: n=39, $\bar{x}$ 28 µm ±9; groep 3: n=50, $\bar{x}$ 35 µm ±12

Oogdiameter

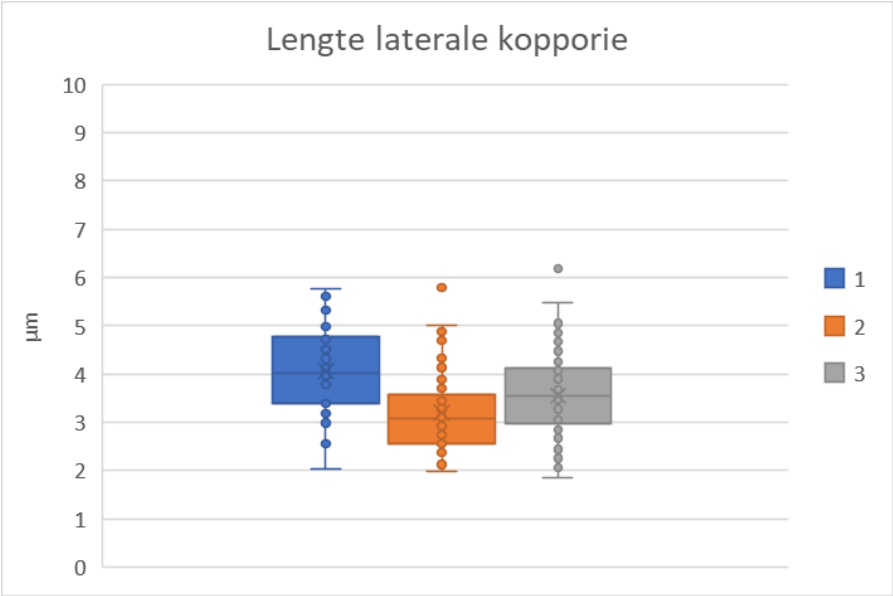
De ANOVA was significant (F=3,7; df=106; P=0,03) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 14) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey HSD post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 niet significant te verschillen (P=0,3). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,02). Tussen groep 2 en 3 is geen significant verschil gevonden (P=0,3).



Figuur 14: Boxplot oogdiameter. Groep 1: n=20, $\bar{x}$ 52 µm ±9; groep 2: n=39, $\bar{x}$ 56 µm ±9; groep 3: n=50, $\bar{x}$ 59 µm ±12

Lengte laterale kopporie

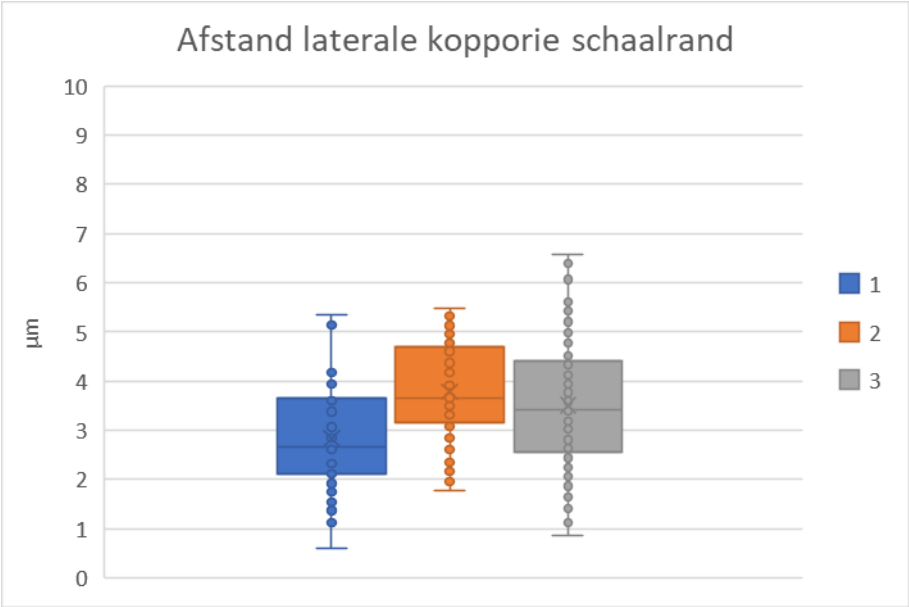
De ANOVA was significant (F=13,7; df=200; P=2,7E-06) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 15) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey HSD post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 significant te verschillen (P=1,6E-06). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,005). Tussen groep 2 en 3 is ook een significant verschil gevonden (P=0,01).



Figuur 15: Boxplot lengte laterale kopporie. Groep 1: n=34, x̄ 4,1 µm ±0,9; groep 2: n=72, x̄ 3,2 µm ±0,7; groep 3: n=97, x̄ 3,6 µm ±0,8

Afstand laterale kopporie schaalrand

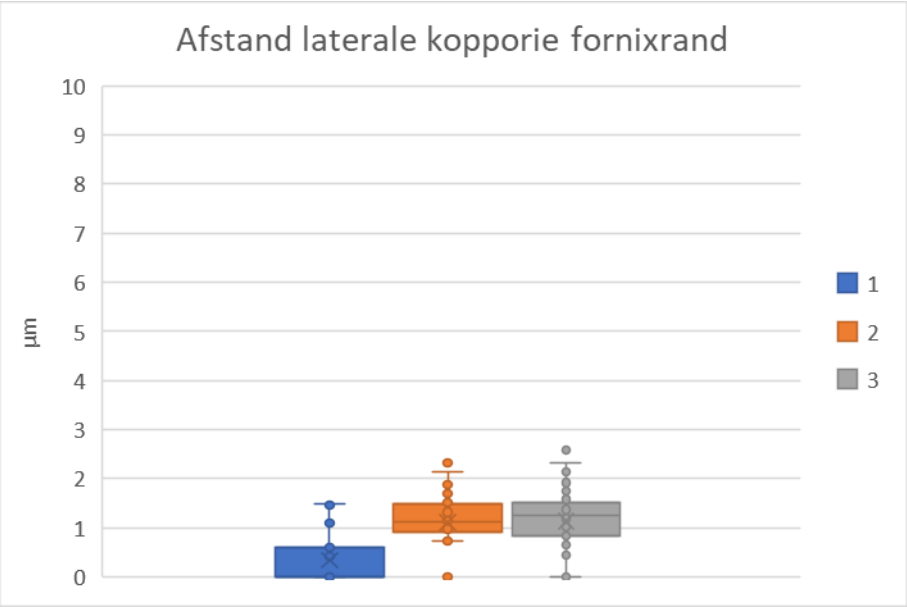
De ANOVA was significant (F=8,2; df=200; P=0,0004) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 16) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey HSD post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 significant te verschillen (P=0,0002). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,008). Tussen groep 2 en 3 is geen significant verschil gevonden (P=0,3).



Figuur 16: Boxplot afstand laterale kopporie tot schaalrand. . Groep 1: n=34, x̄ 2,8 µm ±1,1; groep 2: n=72, x̄ 3,8 µm ±1,0; groep 3: n=97, x̄ 3,5 µm ±1,2

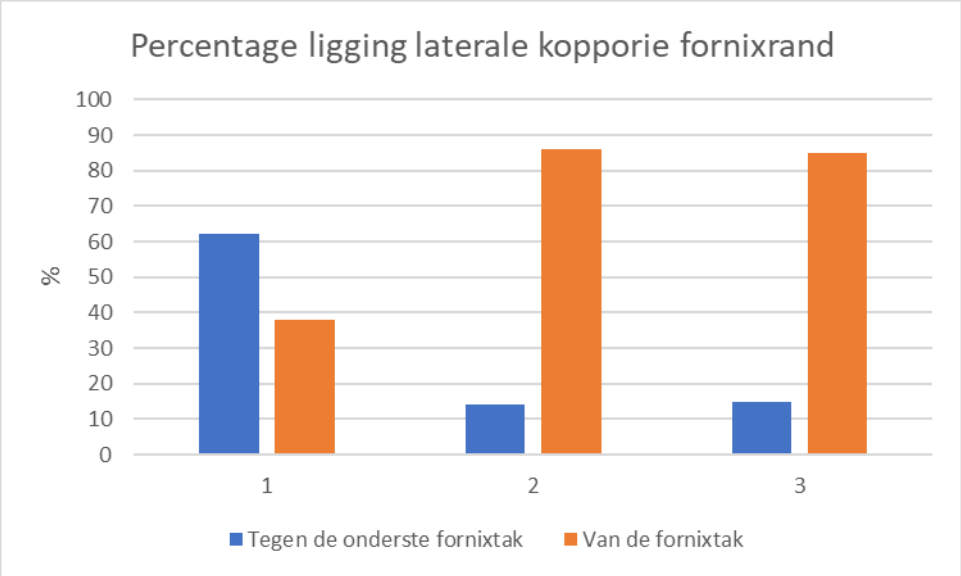
Afstand kopporie fornixrand

De ANOVA was significant (F=25,0; df=200; P=2,1E-10) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 17) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey HSD post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 significant te verschillen (P=6E-09). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=5E-10). Tussen groep 2 en 3 is geen significant verschil gevonden (P=0,97).



Figuur 17: Boxplot afstand laterale kopporie fornixrand. . Groep 1: n=34, x̄ 0,3 µm ±0,5; groep 2: n=72, x̄ 1,1 µm ±0,6; groep 3: n=97, x̄ 1,1 µm ±0,6

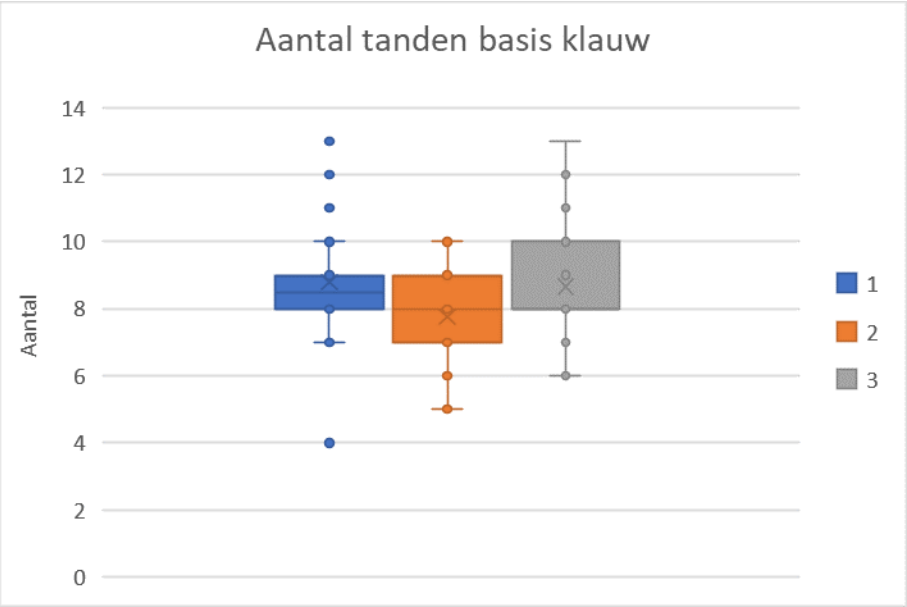
De afstand van de laterale kopporie tot de fornixrand is in groep 1 kleiner dan bij de andere groepen. Als de nul waardes worden genoteerd als tegen de fornixrand en de andere als van de fornixrand dan blijkt dat de kopporie bij groep 1 vaker tegen de fornixrand gelegen is (groep 1 62%, groep 2 14% en groep 3 15%) (Figuur 18). De Pearson's Chi-square toets geeft een significant verschil (df=2; P= 3,5E-16). Uit de post hoc Pearson's Chi-square met Bonferoni correctie (Alpha=0,0167) blijkt dat groep 1 significant verschillend is van groep 2 (P= 2,7E-12) en 3 (P= 8,5E-12). Groep 2 en 3 zijn niet significant verschillend (P= 0,8).



Figuur 18: Percentage ligging laterale kopporie fornixrand. Groep 1 n=34; groep 2 n=72; groep 3 n=97

Aantal tanden basis klauw

De ANOVA was significant (F=6,2; df=143; P=0,003) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 19) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey HSD post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 significant te verschillen (P=0,01). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is niet significant (P=0,9). Tussen groep 2 en 3 is ook een significant verschil gevonden (P=0,006).



Figuur 19: Boxplot aantal tanden basis klauw. . Groep 1: n=28, $\bar{x}$ 9 ±2; groep 2: n=51, $\bar{x}$ 8 ±1; groep 3: n=67, $\bar{x}$ 9 ±2

Samenvatting van de post hoc analyse

Tabel 5 vat de post hoc analyse van de morfologische metingen samen. Uit de analyse bleek dat er twee parameters waren waarbij er een significant verschil is tussen alle drie de vergelijkingen; lengte slurf en lengte laterale kopporie. Van zeven waren er tenminste twee van de vergelijkingen significant verschillend; hoogte achterrand, lengte tot reukstaafjes, mucro knobbels, lengte mucro, afstand laterale kopporie schaalrand, afstand laterale kopporie fornixrand, tegen of van de fornixrand en aantal tanden klauw. Bij de parameter oogdiameter was enkel de vergelijking tussen groep 1-3 significant verschillend.

Tabel 5: Samenvatting van post hoc analyse. Significante verschillen aangegeven met rood.

	Vergelijking		
Parameter	**1-2**	**1-3**	**2-3**
Lichaam			
Hoogte achterrand	0,017354195	0,008856499	0,816376
Lengte tot reukstaafjes	0,311519402	0,001653755	0,035921
Lengte slurf	0,04063564	2,71327E-05	0,056338
Mucro knobbels	0,570595725	0,000714067	0,007534
Lengte mucro	0,643830822	0,00409544	0,016335
Oogdiameter	0,324840413	0,024737895	0,327312
Laterale kopporie			
Lengte laterale kopporie	1,57584E-06	0,004935707	0,012606
Afstand laterale kopporie schaalrand	0,000220837	0,008101745	0,27227
Afstand kopporie fornixrand	5,98372E-09	5,00163E-10	0,97274
Tegen of van de fornixrand	2,7E-12	8,5E-12	0,8
Klauw			
Aantal tanden basis klauw	0,01438489	0,9256388	0,005858

3.4 Morfologische ratio's

Met de morfologische metingen konden ratio's worden berekend vooraf werden acht ratio's vastgesteld die wellicht interessant konden zijn; totale lengte/hoogte, lengte/hoogte carapax, mucro/achterrand, lengte mucro/totale lengte, lengte/breedte laterale kopporie, totale lengte/lengte tot reukstaafjes, totale, lengte/lengte slurf en lengte tot reukstaafjes/lengte slurf. Van deze acht ratio's werd er voor vier een ANOVA gebruikt en voor de andere een Welch ANOVA vanwege ongelijke variantie (Tabel 6). Bij vier ratio's is een significant verschil gevonden; lengte mucro/hoogte achterrand, lengte mucro/totale lengte, totale lengte/lengte tot reukstaafjes en totale lengte/lengte slurf. De post hoc analyse wordt in paragraaf 3.6 toegelicht.

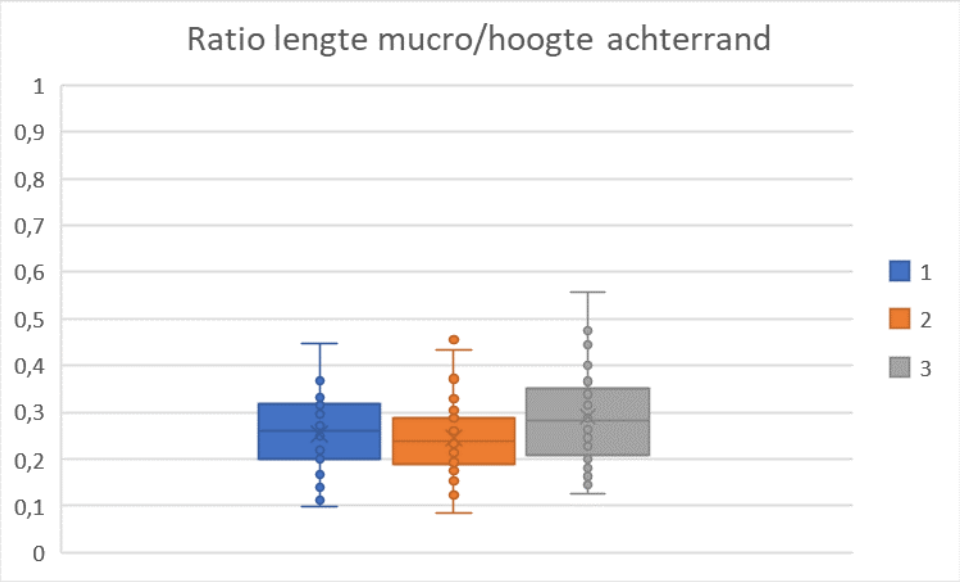
Tabel 6: Resultaten Levene's toets, ANOVA en Welch ANOVA. Significante verschillen aangegeven met rood.

	Levene's test	**ANOVA**	**Welch ANNOVA**
Lichaam			
Totale lengte/hoogte carapax	0,102032	0,069923	
Totale lengte/hoogte achterrand	0,588276051	0,562703667	
Lengte carapax/hoogte carapax	0,00381		0,245298
Lengte mucro/hoogte achterrand	0,34181	0,048787	
Lengte mucro/totale lengte	0,198	0,014525	
Totale lengte/lengte tot reukstaafjes	0,0011		0,000764
Totale lengte/lengte slurf	0,007849		0,000166
Lengte tot reukstaafjes/lengte slurf	0,850047	0,735645582	
Laterale kopporie			
Lengte/breedte laterale kopporie	0,040617		0,121631

3.5 Post hoc analyse morfologische ratio's

Lengte mucro/hoogte achterrand

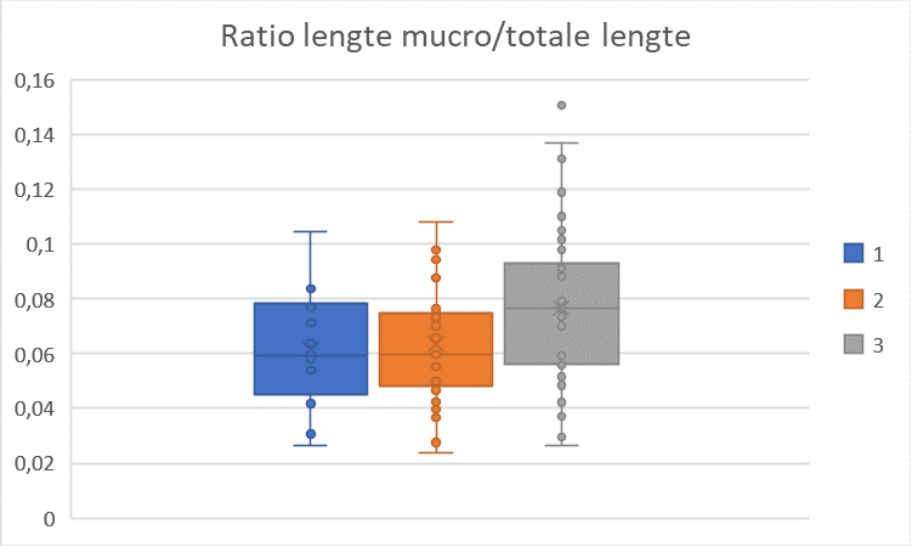
De ANOVA was significant (F=3,1; df=106; P=0,05) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 20) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey HSD post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 niet significant te verschillen (P=0,9). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is niet significant (P=0,3). Tussen groep 2 en 3 is geen significant verschil gevonden (P=0,05).



Figuur 20: Boxplot ratio lengte mucro/hoogte achterrand. Groep 1: n=20, $\bar{x}$ 0,25 ±0,09; groep 2: n=39, $\bar{x}$ 0,25 ±0,08; groep 3: n=50, $\bar{x}$ 0,29 ±0,1

Lengte mucro/totale lengte

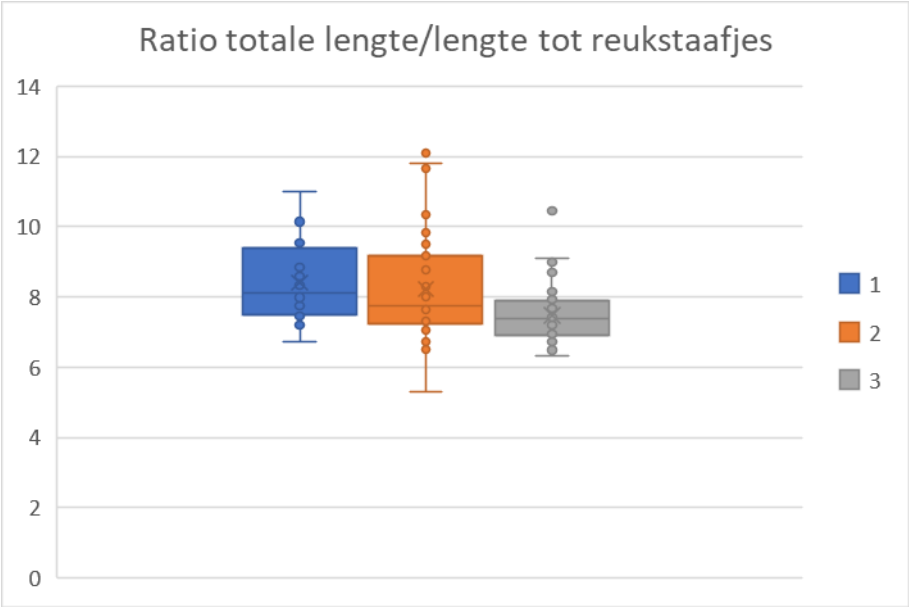
De ANOVA was significant (F=4,4; df=106; P=0,01) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 21) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Tukey HSD post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 niet significant te verschillen (P=0,9). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is niet significant (P=0,051). Tussen groep 2 en 3 is een significant verschil gevonden (P=0,04).



Figuur 21: Boxplot ratio lengte mucro/totale lengte Groep 1: n=20, $\bar{x}$ 0,06 ±0,02; groep 2: n=39, $\bar{x}$ 0,06 ±0,02; groep 3: n=50, $\bar{x}$ 0,08 ±0,03

Totale lengte/lengte tot reukstaafjes

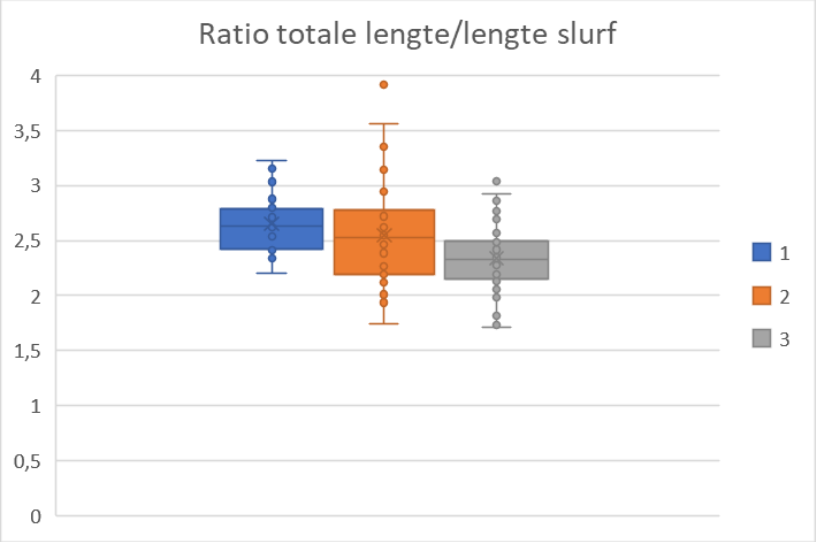
De Welch's ANOVA was significant (F=8,5; df=44; P=0,0008) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 22) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Games Howell post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 niet significant te verschillen (P=0,9). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,006). Tussen groep 2 en 3 is een significant verschil gevonden (P=0,02).



Figuur 22: Boxplot ratio totale lengte/lengte tot reukstaafjes. Groep 1: n=20, $\bar{x}$ 8,4 ±1,1; groep 2: n=39, $\bar{x}$ 8,2 ±1,5; groep 3: n=50, $\bar{x}$ 7,5 ±0,75

Totale lengte/lengte slurf

De Welch's ANOVA was significant (F=10,3; df=52; P=0,0002) wat betekend dat één of meerdere groepen significant verschillend zijn. De boxplot (Figuur 23) toont de spreiding van de gegevens. Uit de Games Howell post hoc toets blijken de groepen 1 en 2 niet significant te verschillen (P=0,5). De vergelijking tussen groep 1 en 3 is significant (P=0,0003). Tussen groep 2 en 3 is een significant verschil gevonden (P=0,04).



Figuur 23: Boxplot totale lengte/lengte slurf. Groep 1: n=20, $\bar{x}$ 2,70 ±0,3; groep 2: n=39, $\bar{x}$ 2,5 ±0,5; groep 3: n=50, $\bar{x}$ 2,3 ±0,3

Samenvatting post hoc analyse ratio's

Uit de post hoc analyse bleek dat de ratio's tussen groep 1 en 2 niet significant verschillend zijn (Tabel 7). Tussen groep 1 en 3 bleken de totale lengte/lengte tot reukstaafjes en totale lengte/lengte slurf significant verschillend te zijn. Tussen groep 2 en 3 bleken alle ratio's significant verschillend te zijn.

Tabel 7: Samenvatting van de post hoc vergelijkingen ratio's. Significante verschillen aangegeven in rood.

	Vergelijking		
	1-2	**1-3**	**2-3**
Parameter			
Lichaam			
Lengte mucro/hoogte achterrand	0,9	0,3	0,0504
Lengte mucro/totale lengte	0,9	0,051	0,04
Totale lengte/lengte tot reukstaafjes	0,9	0,006	0,02
Totale lengte/lengte slurf	0,5	0,0003	0,04

3.6 Overzicht metingen morfologische eigenschappen

De morfologie van de groepen kan worden omschreven aan de hand van de gegevens en analyse. Er zijn geen kenmerken gevonden die uniek zijn voor een bepaalde groep, daarom wordt de morfologische variatie binnen de groepen omschreven. Tabel 8 geeft het gemiddelde, de standaard deviatie en de minimale en maximale waarde van de metingen aan de groepen. Van de ratio's worden de lengte van de mucro/hoogte van de achterrand en de totale lengte/lengte tot de reukstaafjes niet meegenomen in de beschrijving. De redenen hiervoor zijn dat lengte van de mucro/hoogte van de achterrand in de post hoc niet significant was en dat de totale lengte/lengte tot de reukstaafjes een vergelijkbaar resultaat gaf als de totale lengte/lengte slurf.

Groep 1

In deze groep werden vier morfologische variëteiten waargenomen; *longirostris, pellucida, cornuta* en *brevicornis*. De variëteiten *similis* en *curvirostris* ontbreken in deze groep. De meest voorkomende variëteit in deze groep was longirostris (49%) gevolgd door pellucida (26%). Deze groep is significant verschillend van de andere groepen in de verdeling van de morfologische variëteiten.

Gemiddeld kleinere dieren dan groep 2 en 3 met een totale lengte van $\bar{x}$ 431µm ±41µm, een carapax lengte van $\bar{x}$ 301µm ± 43, een kop hoogte van $\bar{x}$ 130µm ±17, een achterrand hoogte van $\bar{x}$ 105µm ±13 en een carapax hoogte van $\bar{x}$ 332µm ±44. Van de metingen aan het lichaam bleek de hoogte van de achterrand significant te verschillen met de andere groepen, dit is gemiddeld lager dan bij de andere groepen.

De slurven $\bar{x}$ 164µm ± 21 en zijn gemiddeld korter dan bij groep 2 en 3. De lengte tot de reukstaafjes ($\bar{x}$ 52µm ±8) is niet verschillend van groep 2 en korter dan groep 3. De ratio van de totale lengte/lengte slurf is $\bar{x}$ 2,7 ±0,3 en is significant verschillend van groep 3.

De lengte van de mucro's ($\bar{x}$ 26µm ±8) is ongeveer gelijk aan groep 2, maar korter dan bij groep 3. Op de mucro's zitten 0 tot 2 knobbels ($\bar{x}$ 1 ±1). De verschillen in de mucro's van groep 1 en 3 zijn significant. De ratio mucro/totale lengte is $\bar{x}$ 0,06 ±0,02 en gaf geen significant verschil met groep 2 en 3.

De oogdiameter was kleiner dan in de andere groepen ($\bar{x}$ 52µm ±9) en significant verschillend van groep 3, maar niet significant verschillend van groep 2.

Relatief grote, langgerekte kopporiën (Lengte $\bar{x}$ 4,1µm ±0,9, breedte $\bar{x}$ 1,9µm ±0,7) die dicht bij de schaalrand ($\bar{x}$ 2,8µm ±1,1) en fornixrand ($\bar{x}$ 0,3µm ±0,5) liggen laten deze groep significant verschillen van de andere groepen. De laterale kopporie ligt bij deze groep vaker tegen de fornixrand (62%) dan bij de andere groepen (groep 2 14%, groep 3 15%).

De tanden rij aan de basis van de klauw bestaat uit $\bar{x}$ 9 ±2 tanden en is significant verschillend van groep 2. Op de klauw staat een rij tanden van $\bar{x}$ 17 ±4 tanden waarvan de eerste $\bar{x}$ 6 ±1 grof zijn.

Groep 2

In deze groep werden vier morfologische variëteiten waargenomen; *longirostris, pellucida, cornuta* en *brevicornis*. De variëteiten *similis* en *curvirostris* ontbreken in deze groep. De meest voorkomende variëteit in deze groep was *pellucida* (52%) gevolgd door *cornuta* (28%). Deze groep is significant verschillend van de andere groepen in de verdeling van de morfologische variëteiten.

Gemiddeld grotere dieren dan groep 1 en kleiner dan groep 3 met een totale lengte van $\bar{x}$ 448µm ±37, een carapax lengte van $\bar{x}$ 309µm ±24, een kop hoogte van $\bar{x}$ 139µm ±22, een achterrand hoogte van $\bar{x}$ 117µm ±18 en een carapax hoogte van $\bar{x}$ 355µm ±33. Alleen de hoogte van de achterrand is groter dan bij groep 1 en is significant verschillend. Er zijn geen verschillen gevonden tussen groep 2 en 3 aan de afmetingen van het lichaam.

De slurven ($\bar{x}$ 181µm ±30) en de lengte tot de reukstaafjes ($\bar{x}$ 56µm ±10) zit gemiddeld tussen groep 1 en 3. De lengte van de slurf is significant verschillend van groep 1 en de lengte van de reukstaafjes is significant verschillend van groep 3. De ratio van de totale lengte/lengte slurf is $\bar{x}$ 2,5 ± 0,5 en is significant verschillend van groep 3.

De lengte van de mucro's ($\bar{x}$ 28µm ±9) is ongeveer gelijk aan groep 1, maar korter dan bij groep 3. Op de mucro's zitten 0 tot 3 knobbels ($\bar{x}$ 1 ±1). De mucro's zijn significant verschillend van groep 3 betreft de lengte en het aantal knobbels hierop. De ratio mucro/totale lengte is $\bar{x}$ 0,06 ± 0,02 en was significant verschillend met groep 3.

De oogdiameter was $\bar{x}$ 56µm ±9 en niet significant verschillend van de andere groepen.

Relatief kleinere laterale kopporiën dan de andere groepen (Lengte $\bar{x}$ 3,2µm ±0,7, breedte $\bar{x}$ 1,7µm ±0,6) die ver van de schaalrand ($\bar{x}$ 3,8µm ±1) en fornixrand ($\bar{x}$ 1,1µm ±0,6) liggen net als groep 3. Van de laterale kopporiën ligt 86% van de fornixrand af. De kopporiën zijn significant verschillend met groep 1 op alle parameters. De lengte van de laterale kopporie is het enige significante verschil met groep 3.

De tanden rij aan de basis van de klauw bestaat uit $\bar{x}$ 8 ±1 tanden. Op de klauw staat een rij tanden van $\bar{x}$ 16 ±4 tanden waarvan de eerste $\bar{x}$ 6 ±1 grof zijn. De klauw is alleen significant verschillend met de tanden aan de basis van de klauw van groep 1.

Groep 3

In deze groep werden vier morfologische variëteiten waargenomen*; longirostris*, *pellucida, cornuta* en *similis.* De variëteiten *brevicornis* en *curvirostris* ontbreken in groep 3. De meest voorkomende variëteit in deze groep was *pellucida* (52%) gevolgd door *cornuta* (28%). Deze groep is significant verschillend van de andere groepen in de verdeling van de morfologische variëteiten.

Gemiddeld grotere dieren dan groep 1 en 2 met een totale lengte van $\bar{x}$ 455µm ±67, een carapax lengte van $\bar{x}$ 313µm ±45, een kop hoogte van $\bar{x}$ 142µm ±27, een achterrand hoogte van $\bar{x}$ 120µm ±26 en een carapax hoogte van $\bar{x}$ 354µm ±57. De hoogte van de achterrand is significant verschillend met groep 1, maar niet met groep 2. De andere parameters met betrekking tot de grootte van het lichaam waren niet significant verschillend.

De slurven ($\bar{x}$ 197µm ±34) en de lengte tot de reukstaafjes ($\bar{x}$ 61µm ±10) zijn gemiddeld langer dan groep 1 en 2. De lengte tot de reukstaafjes is significant groter dan bij groep 1 en 2. De lengte van de slurf is alleen significant groter dan groep 1. De ratio van de totale lengte/lengte slurf is $\bar{x}$ 2,3 ± 0,3 en is significant verschillend van groep 1 en 2.

De lengte van de mucro's ($\bar{x}$ 35µm ±12) is gemiddeld langer dan bij groep 1 en 2. Op de mucro's zitten 0 tot 5 knobbels ($\bar{x}$ 2 ±2). De mucro is significant verschillend van groep 1 en 2. De lengte mucro/totale lengte is $\bar{x}$ 0,08 ± 0,03 en significant verschillend van groep 2.

De oogdiameter was $\bar{x}$59 ±12 en significant verschillend van groep 1, maar niet significant verschillend van groep 2.

De laterale kopporiën zitten gemiddeld tussen groep 1 en 2 in qua lengte ($\bar{x}$ 3,6µm ±0,8) en breedte ($\bar{x}$ 1,8µm ±0,6). De afstand tot de schaalrand ($\bar{x}$ 3,5µm ±1,2) en fornixrand ($\bar{x}$ 1,1µm ±0,6) is ongeveer gelijk aan groep 2, maar groter dan bij groep 1. Groep 3 is op alle parameters significant verschillend van groep 1. Groep 2 is alleen significant verschillend in de lengte van de laterale kopporie.

De tanden rij aan de basis van de klauw bestaat uit $\bar{x}$ 9 ±2 tanden. Op de klauw staat een rij tanden van $\bar{x}$ 18 ±4 tanden waarvan de eerste $\bar{x}$ 6 ±0 grof zijn. Er is geen significant verschil in de klauwen met de andere groepen.

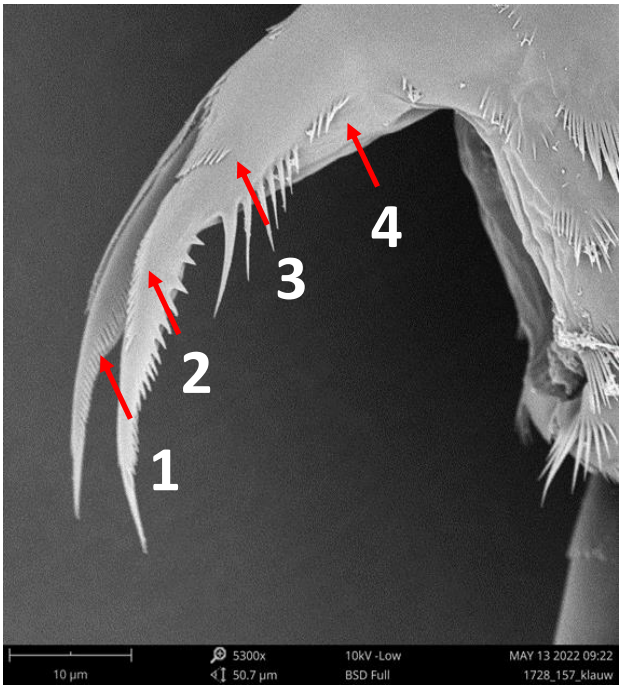
Tabel 8: Gemiddelde, standaard deviatie en minimale en maximale waardes per groep

	Groep 1			Groep 2			Groep 3		
	Gemiddelde	SD	Min-max	Gemiddelde	SD	Min-max	Gemiddelde	SD	Min-max
Parameter									
Lichaam									
Totale lengte µm	431	41	323-520	448	37	363-555	455	67	322-609
Lengte carapacs µm	301	43	209-386	309	24	257-363	313	45	217-427
Hoogte kop µm	130	17	103-165	139	22	82-206	142	27	83-212
Hoogte achterrand µm	105	13	86-130	117	18	46-155	120	26	50-218
Breedte carapacs µm	332	44	208-420	355	33	289-461	354	57	259-482
Lengte tot reukstaafjes µm	52	8	41-72	56	10	35-85	61	10	43-85
Lengte slurf µm	164	21	131-222	181	30	120-258	197	34	150-279
Mucro knobbels	1	1	0-2	1	1	0-3	2	2	0-5
Lengte mucro µm	26	8	11-44	28	9	13-46	35	12	10-56
Oogdiameter µm	52	9	41-66	56	9	42-77	59	12	32-80
Laterale kopporie									
Lengte laterale kopporie µm	4,1	0,9	2,0-5,8	3,2	0,7	2,0-5,8	3,6	0,8	1,9-6,2
Breedte laterale kopporie µm	1,9	0,7	0,8-3,4	1,7	0,6	0,6-3,3	1,8	0,6	0,6-3,7
Afstand laterale kopporie schaalrand µm	2,8	1,1	0,6-5,4	3,8	1,0	1,8-5,5	3,5	1,2	0,9-6,6
Afstand kopporie fornix µm	0,3	0,5	0-1,6	1,1	0,6	0-2,3	1,1	0,6	0-2,6
Klauw									
Aantal tanden basis klauw	9	2	4-13	8	1	5-10	9	2	6-13
Aantal tanden klauw	17	4	12-26	16	4	10-27	18	4	12-28
Tanden grof	6	1	4-7	6	1	4-8	6	0	5-8
Ratio's									
Lengte mucro/totale lengte	0,06	0,02	0,026-0,10	0,06	0,02	0,024-0,11	0,08	0,03	0,026-0,15
Totale lengte/lengte slurf	2,70	0,30	2,2-3,2	2,50	0,50	1,7-3,9	2,30	0,30	1,7-3,0

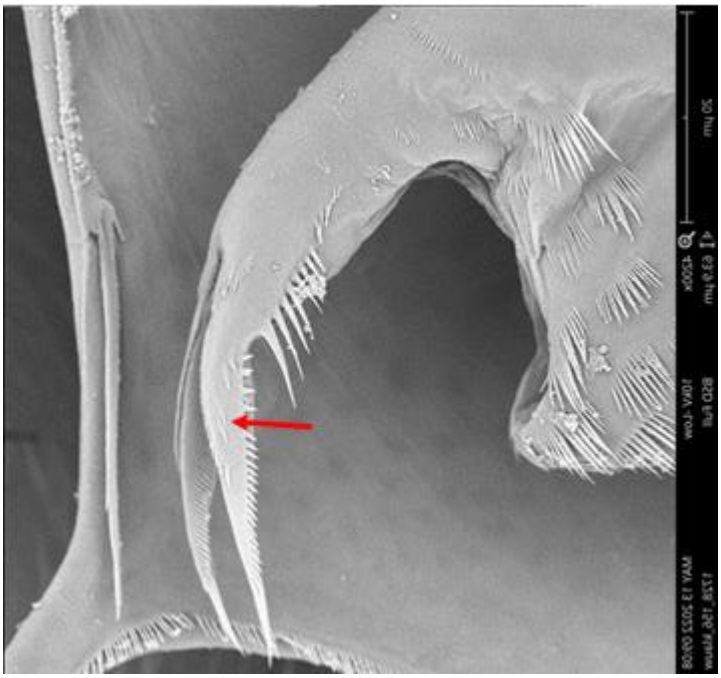
3.7 Aanvullende bevindingen scanning elektronen microscoop

Tijdens het bekijken van de kopporiën en klauwen met de SEM vielen enkele eigenschappen op. Deze eigenschappen zijn een plooi die wel of niet aanwezig is ter hoogte van de fornixrand en rijen stekels op de klauw waar voor het onderzoek nog weinig overbekend was.

Op de klauwen staan vier rijen stekels die lichtmicroscopisch onzichtbaar zijn (Figuur 24). De eerste rij staat aan de binnenkant van de klauw. De tweede staat boven op de klauw. De derde staat boven de rij aan de basis van de klauw. De vierde rij staat voor de rij aan de basis van de klauw. Alle vier de rijen bestaan uit fijne stekels. Daarnaast hadden sommige individuen ook stekels op de zijkant van de klauw (Figuur 25). Beide figuren zijn van dieren uit populatie 1728 (Groep 3).

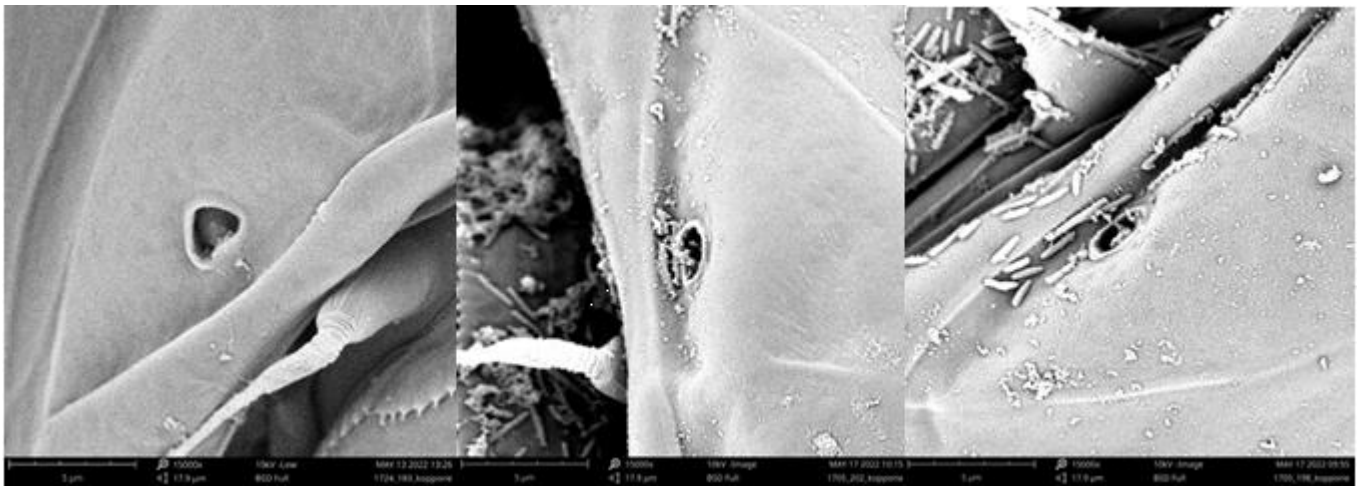


Figuur 24: : Rode pijltjes wijzen de rijen met stekels aan die lichtmicroscopisch onzichtbaar zijn. 1: stekelrij binnenkant klauw, 2: stekelrij bovenkant klauw, 3: stekelrij boven stekelrij basis klauw en 4: stekelrij voor de rij aan de basis van de klauw.

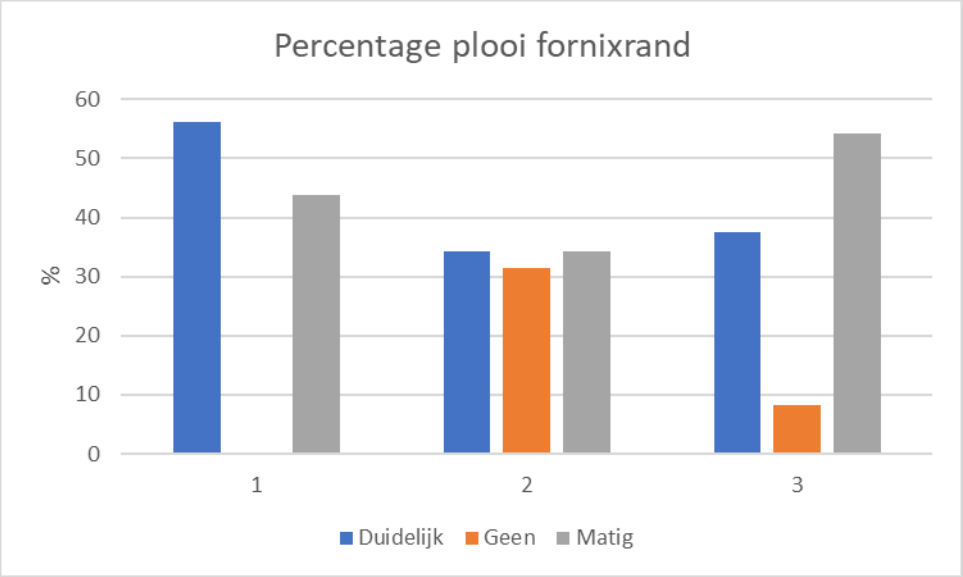


Figuur 25: Sterke stekels op klauw (Rode pijl)

De plooi bij de kopporie is in alle groepen gevonden (Figuur 27). Er was een variatie te zien van een diepe plooi, matige plooi tot geen plooi (Figuur 26). Wanneer de plooi aanwezig was lag de kopporie hierin. De Pearson's Chi-square toets is significant (df=1; P= 2,15E-05). Uit de post hoc Chi-square (Alpha= 0,00167) bleek dat er een significant verschil tussen groep 1 en 2 is (P= 6,7E-09). Groep 1 en 3 zijn niet significant verschillend (P= 0,002). Groep 2 en 3 zijn significant verschillend (P= 0,0001).



Figuur 26: Links naar rechts; geen plooi, matige plooi en diepe plooi in fornixrand. Links populatie 1724 (groep 3), midden en rechts populatie 1705 (groep 2)



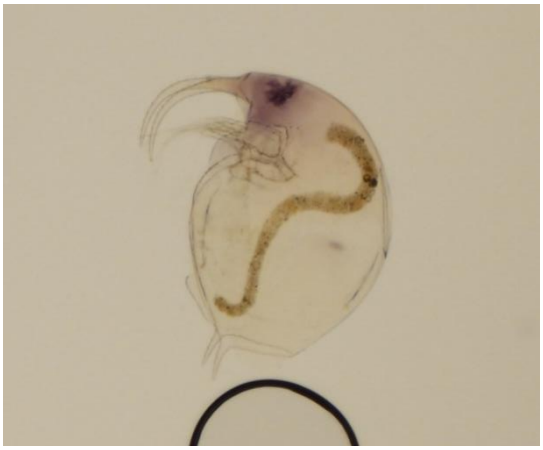
Figuur 27: Percentage plooi fornixrand

4 Discussie

Uit de resultaten blijkt dat de variatie binnen de groepen groot is. Ondanks de gevonden significante verschillen kunnen individuen uit de groepen niet morfologisch worden onderscheiden, wel kan groep 1 worden onderscheiden van groep 2 en 3 als er meerdere dieren worden bekeken. Figuren 28, 29 en 30 tonen dieren die de typische bouw van iedere groep hebben. Door de grote variaties is er een grote overlap in de morfologische eigenschappen van de groepen waardoor veel van deze significante verschillen ongeschikt zijn als determinatie kenmerk. De variatie kan ook worden verklaard doordat het niet zeker is of de gemeten individuen ook daadwerkelijk tot de genetische groep behoren waar deze inzitten. Het is goed mogelijk dat de cryptische soorten in hetzelfde water voorkomen waardoor de metingen vervuild kunnen raken. Om dit probleem in de toekomst te verhelpen hebben zijn er extra individuen uit de populaties geïsoleerd voor genetische analyse door het NIOO-KNAW. Als aanvulling zijn de laterale kopporiën van deze individuen opgemeten. Voor nu wordt de assumptie aangenomen dat de populaties voornamelijk uit één genetische groep bestaat. In het monster van populatie 1752 waren alleen juveniele exemplaren aanwezig. Deze populatie is daarom buiten de metingen gelaten. Er is geen nieuw monster genomen, omdat er genoeg andere monster in deze genetische groep zaten.

Figuur 28: Voorbeeld van een typisch dier uit groep 1(1757 nr 32)

Figuur 29:Voorbeeld van een typisch dier uit groep 2(1705 nr 43)



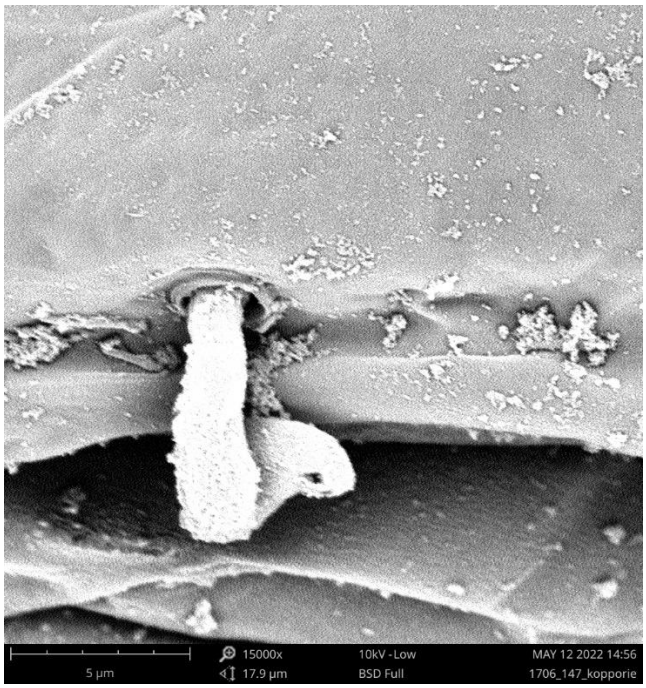
Figuur 30: Voorbeeld van een typisch dier uit groep 3 (1712 nr 95)

De morfologische variëteiten komen verspreid over de genetische groepen voor. In alle groepen zijn vier verschillende vormen gevonden. Opvallend is dat variëteit *curvirostris* niet is waargenomen. De variëteit *brevicornis* is niet waargenomen in groep 3. Daarnaast is de variëteit *similis* wel in groep 3, maar niet in groep 1 en 2 waargenomen. Groep 1 heeft *longirostris* als meest voorkomende variëteit en is hierin te onderscheiden van groep 2 en 3. In groep 2 en 3 is pellucida de meest voorkomende variëteit. Dit alles maakt dat de groepen significant van elkaar verschillen. Doordat de groepen niet zuiver één, maar allemaal vier variëteiten vertonen lijken de variëteiten eerder een effect van factoren uit de omgeving zoals predatie (Post *et al.,* 1995; Kerfoot & Mcnaught, 2010), temperatuur, pH etc. (Sakamoto & Hanazato, 2009; Adamczuk, 2016). Onderzoek naar monoklonale populaties van *Bosmina longirostris* tonen aan dat de variëteiten niet erfelijk onbuigzaam zijn. Het is mogelijk dat een *pellucida* vrouw bijvoorbeeld een *longirostris* of *cornuta* kloon voortbrengt (Sakamoto & Hanazato 2009; Sakamoto *et al.,* 2007). Daarnaast blijkt dat de vorm van de slurf tot op zekere hoogte kan veranderen onder invloed van en predatie (Sakamoto *et al*., 2007). Het is onduidelijk welke soort *Bosmina* er is gebruikt door Sakamoto & Hanazato (2009) en Sakamoto *et al.* (2007). De opmerking die Kotov (2009) maakt over het ontbreken van genetische onderbouwing bij de conclusie van Kappes en Sinch (2002) dat *cornuta*, *longirostris* en *pellucida* goede soorten zijn lijkt terecht. Als de groepen andere soorten representeren dan kan het zijn dat de reactie op factoren zoals predatie anders is waardoor groep 1 bijvoorbeeld meer variëteit *longirostris* laat zien terwijl groep 2 en 3 juist reageren door variëteit *pellucida* te vertonen.

De metingen aan het lichaam waren weinig onderscheidend voor de groepen. De hoogte van de achterrand was significant voor groep 1. Voor determinatie doeleinden lijkt deze eigenschap weinig onderscheidend door de grote overlap in de groepen.

De lengte van de slurf was significant tussen groep 1 en de andere groepen en is te koppelen aan het meer voorkomen van variëteit *longirostris* met korte slurf in groep 1 en het meer voorkomen van variëteit *pellucida* met lange slurf in groep 2 en 3. Dit effect lijkt niet direct zichtbaar bij de lengte van de mucro. De lengte van de mucro in groep 2 is amper langer dan die van groep 1 en niet significant verschillend. Groep 3 daar en tegen is wel significant verschillend door de gemiddeld langere mucro. Bij predatie door copepoden wordt de lengte van de mucro groter (Sakamoto & Hanazato 2009; Sakamoto et al., 2007). Wellicht is dit van invloed geweest op de verschillen tussen de groepen.

Een kenmerk dat veel belovend lijkt is de laterale kopporie. Een voordeel van de laterale kopporie tegenover de metingen aan het lichaam en uitsteeksels daarvan is dat dit kenmerk niet onderhevig is aan verschillende variaties die worden geïnduceerd door predatie etc. (De Melo & Hebert, 1994). De laterale kopporie is in groep 1 langer en ligt vaker tegen de fornixrand aan dan bij groep 2 en 3 waar deze vaker ervan af ligt. De afstand van de laterale kopporie tegenover de fornixrand en schaalrand is bij groep 2 en 3 dan ook groter dan bij groep 1. Op de foto's van de SEM leek de kopporie bij alle groepen regelmatig in een soort plooi te liggen. De vraag is echter of dat deze plooi een artefact is van het dehydrateren of een kenmerk dat er altijd is. Daarnaast werd met de SEM bij sommige individuen een soort excretie geobserveerd die uit de laterale kopporie komt (Figuur 26). Kořínek *et al.* (1997) beschrijven deze excretie uit de laterale kopporiën ook, en verwijst naar Havel (1978) voor een mogelijke verklaring van de functie. Havel (1978) beschrijft een klierachtig weefsel dat achter het schild bij de kopporie ligt en vermoed dat de uitscheiding bestaat uit polysachariden. De exacte functie van de kopporiën is nog steeds niet bekend (Kotov, 2013).



Figuur 31: Excretie uit laterale kopporie

In monster 1706 werden twee individuen aangetroffen die qua ligging van de laterale kopporie niet pasten in het beeld van *Bosmina*. De laterale kopporiën lagen hiervoor te ver van de schaalrand (10µm en 20 µm) en buiten de fornixrand. Deze afstand hoort eerder bij de Amerikaanse soorten of een ander (sub) genus. Deze twee individuen zijn daarom buiten de analyse gelaten.

De tanden op de basis van de klauw en de klauw blijken niet onderscheidend te zijn voor de groepen. Er is een significant verschil gevonden tussen de tanden op de basis van de klauw groep 1 en 2. Dit verschil is lastig te duiden, omdat groep 3 niet verschillend is van groep 1 en 2. Het gemiddelde aantal tanden van groep 2 is 8 en bij groep 1 en 3 is dat 9 . In deze meting is ook een grote overlap. Waarschijnlijk betreft dit een valse significantie (type I error) en moet deze worden genegeerd. Problemen bij het bekijken van de klauwen waren dat deze vaak in het carapax getrokken waren en dat de tanden op de lichtmicroscoop slecht zichtbaar zijn. Er is een poging gedaan om individuen op te vouwen op de SEM stubjes, zodat de klauw zichtbaar zou zijn. Dit bleek nog niet zo eenvoudig, veel klauwen raakte hiermee beschadigd of de klauwen waren nog verscholen tussen de kieuwpoten waardoor deze niet zichtbaar waren. Een oplossing voor toekomstig onderzoek is de dieren laten verstikken. Monster 1742 was verstikt en het abdomen met klauw lag bij bijna elk individu buiten het carapax. Het viel op dat er op de klauwen meer stekelrijen aanwezig waren dan van tevoren gedacht. Hierin was variatie aanwezig, maar deze rijen waren minder vaak goed te zien dan de rijen die wel geteld zijn.

De gebruikte methode om individuen op te helderen met natronloog voor de lichtmicroscoop werkte uitstekend. Door het ophelderen werden de kopporie en de fornixrand contrastrijker ten opzichte van de schaal wat het meten makkelijker en preciezer maakte. De klauwen waren door het ophelderen vaker zichtbaar doordat het carapax doorzichtig werd.

Bij andere soorten is bekend dat parthenogenetische vrouwtjes soms niet morfologisch te onderscheiden zijn. Tijdens dit onderzoek is enkel gekeken naar parthenogenetische vrouwtjes. In soorten *Chydorus belyaevae* en *Chydorus biovatus* kunnen de parthenogenetische vrouwelijke individuen niet worden onderscheiden (Klimovsky & Kotov, 2015). Betrouwbare morfologische verschillen tussen deze soorten worden enkel gevonden bij adulte mannelijke individuen (Klimovsky & Kotov, 2015). Het probleem met mannetjes is dat deze vaak in minder grote aantallen worden aangetroffen en vaak maar voor een korte

periode in de populatie aanwezig zijn (Klimovsky & Kotov, 2015). Mogelijk kunnen morfologische verschillen worden gevonden in mannelijk exemplaren van *Bosmina longirostris.*

Burckhardt (1943) schreef; ''Consequently, no one will identify the species of *Bosmina* on the basis of its shape.'' (''Niemand zal de soorten van *Bosmina* identificeren op basis van zijn vorm.''). Tot op heden heeft deze uitspraak standgehouden. Echter kan er worden gesteld dat groep 1 wel morfologisch te onderscheiden is van de andere groepen als er genoeg dieren worden bekeken en doorgemeten.

5 Conclusie

5.1 Morfologische variëteiten

De kritische opmerking van Kotov (2009) dat er geen genetische onderbouwing is in het artikel van Kappes en Sinch (2002) voor het benoemen van deze morfologische variëteiten *pellucida*, *cornuta* en *longirostris* als goede soorten is terecht. De morfologische variëteiten kunnen niet als aparte soorten worden beschouwd zoals Kappes en Sinch (2002) concluderen.

5.2 Morfologische metingen

De morfologische metingen hebben de grote variatie binnen de groepen aangetoond. Er zijn geen verschillen tussen de groepen gevonden waarmee direct kan worden bepaald om welke groep het gaat.

De laterale kopporiën lijken anders in groep 1 dan in groep 2 en 3. In groep 1 ligt de laterale kopporie gemiddeld dichter bij de fornixrand en schaalrand. Dit komt doordat de laterale kopporie in groep 1 meestal tegen de fornixrand gelegen is terwijl deze in groep 2 en 3 meestal er van af ligt.

In de klauwen zijn geen verschillen geobserveerd in de analyse. Echter kan er niet worden geconcludeerd dat deze verschillen er niet zijn, omdat de klauwen meestal slecht zichtbaar waren.

5.3 Andere morfologische eigenschappen

Op de SEM foto's lijken de laterale kopporiën regelmatig in een plooi te liggen dit is een kenmerk dat niet is meegenomen in de analyse, omdat de plooi werd waargenomen bij alle groepen en het onduidelijk was of het een artefact van de dehydratatie methode voor de SEM betrof.

Op de klauwen staan meer stekelrijen dan dat in de determinatieliteratuur gebruikt worden. Hier zijn geen verschillen gevonden tussen de groepen, omdat de stekels op de klauw en aan de basis geteld zijn. Daarnaast waren de nieuwe stekelrijen meestal te slecht of niet zichtbaar om hier een goede analyse op te doen. De SEM foto's laten wel zien dat er variatie is in klauwen die beter beschreven moet worden om verschillen tussen de groepen te kunnen vinden.

5.4 Eindconclusie

Er zijn geen morfologische eigenschappen gevonden waarmee de genetische groepen aan de hand van één dier direct kunnen worden onderscheiden. Wel heeft het onderzoek de variatie van *Bosmina longirostris* beter vastgelegd voor Nederland. Er is nu een richting duidelijk waarin de genetische groepen mogelijk kunnen verschillen. Zo verschilt groep 1 van groep 2 en 3 door het meer voorkomen van de *longirostris* vorm en de andere ligging van de laterale kopporie ten opzichte van de fornix- en schaalrand. De metingen aan het lichaam blijken vooralsnog weinig onderscheidend. De slurf en het percentage van de morfologische variëteiten laten wel een onderscheid zien tussen groep 1 en de andere groepen. Het blijft wel nuttig om metingen aan de grootte van de dieren en morfologische variëteiten mee te nemen, omdat dit een goed beeld oplevert van de variatie binnen de soort. De configuratie van de rijen stekels op de klauw en de aantallen stekels in deze rijen is mogelijk een andere richting om verschillen te zoeken tussen de groepen.

6 Aanbevelingen

De thesis heeft twee kansrijke kenmerken opgeleverd om verder te zoeken naar morfologische verschillen voor cryptische soorten onder *Bosmina longirostris*. De laterale kopporie en de tanden en stekelrijen op de klauwen. Als vervolg op deze thesis is het aan te bevelen om de metingen aan de laterale kopporiën en klauwen door te zetten in combinatie met verder genetisch onderzoek. Echter is het niet mogelijk om de individuen eerst te sequensen en daarna te bekijken met de LM of SEM. De gebruikte voorbehandeling voor het ophelderen van de individuen en de voorbehandeling voor de SEM zijn anderzijds niet geschikt voor genetisch onderzoek. Daarom moeten eerst in een preparaat in ethanol de metingen aan de kopporie worden verricht zonder opheldering en hierna de sequentie van het individu worden gedaan. Op deze manier kunnen de metingen aan de individuen één op één worden gekoppeld aan de genetica.

Voor de klauwen is dit lastiger te doen, omdat een individu na de SEM behandeling ongeschikt is voor DNA-barcodering. Als er blijkt dat individuen aan de hand van de laterale kopporie tot een groep toebedeeld kunnen worden dan kunnen er individuen worden bekeken met de SEM en kunnen de klauwen ook tot een groep worden toebedeeld. Of het moet blijken dat een populatie slechts uit één genetische groep bestaat. Een andere manier is grotere aantallen meten waardoor er duidelijker clusters ontstaan waarmee de groepen onderscheiden kunnen worden.

Literatuur

Adamczuk, M. (2016). Past, present, and future roles of small cladoceran *Bosmina longirostris* (OF Müller, 1785) in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*, *767*(1), 1-11. https://doi.org/10.1007/s10750-015-2495-7

Alonso, M., Neretina, A. N., & Ventura, M. (2021). Ceriodaphnia smirnovi (Crustacea: Cladocera), a new species from the Mediterranean Region, and a phylogenetic analysis of the commonest species. *Zootaxa*, *4974*(1), 146. https://doi.org/10.11646/zootaxa.4974.1.

Burckhardt, G. (1943). Gibt es verbindungsgliedern zwischen ''den beiden *Bosmina*-species''?. Zeitschrift für Hydrologie, 9(1-2) : 128-148.

Cakir, B. N. (2021). Searching for cryptic water flea species by building a Dutch reference database of DNA barcodes. NIOO Netherlands institute of Ecology.

De Melo, R. D., & Hebert, P. D. (1994). A taxonomic reevaluation of North American Bosminidae. *Canadian Journal of Zoology*, *72*(10), 1808-1825. https://doi.org/10.1139/z94-245

Frey, D. G. (1987). The taxonomy and biogeography of the Cladocera. In Cladocera (pp. 5-17). Springer, Dordrecht. https://doi.org/ 10.1007/978-94-009-4039-0_2

Garibian, P. G., Neretina, A. N., Taylor, D. J., & Kotov, A. A. (2020). Partial revision of the neustonic genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Crustacea: Cladocera): decoding of the barcoding results. PeerJ, 8, e10410. https://doi.org/10.7717/peerj.10410

Goulden, C. E., & Frey, D. G. (1963). The occurrence and significance of lateral head pores in the genus *Bosmina* (Cladocera). Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 48(3), 513-522. https://doi.org/10.1002/iroh.19630480304

Havel L., (1978). Ultrastructure and taxonomical value of head pores in the genus *Bosmina* (Cladocera). Dissertation. Charles University, Prague.

Hudec, I. (1989). Rozšírenie a biológia čel'ade *Bosminidae* (Crustacea, Cladocera) na Slovensku. BIOLOGIA BRATISLAV*,* 44 (10), 995-1006. Geraadpleegd op 12-4-2022, afkomstig van: https://www.researchgate.net/publication/313614156_Rozsirenie_a_biologia_cel%27ade_Bosminidae_Crustacea_Cladocera_na_Slovensku

Ishida, S. (2012). Phylogenetic and phylogeographic studies of Japanese Cladocera to test the hypothesis of glacial refugia for freshwater zooplankton species in the Far East. Graduate school of life sciences Tohoku university.

Juračka, P. J., Sacherová, V., Dobiášovská, I., Bovšková, D., Novosadová, Z., Kořínek, V., & Petrusek, A. (2016). Simplification of preparation techniques for scanning electron microscopy of Cladocera: preparing filtering limbs and ephippia for efficient studies of ultrastructure. Crustaceana, 89(1), 47-62. https://doi.org/10.1163/15685403-00003513

Kappes, H., & Sinsch, U. (2002). Morphological variation in *Bosmina longirostris* (OF Müller, 1785)(Crustacea: Cladocera): consequence of cyclomorphosis or indication of cryptic species?. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 40(3), 113-122. https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2002.00184.x

Kerfoot, W. C., & McNaught, A. S. (2010). Two-step dialogue between the cladoceran *Bosmina* and invertebrate predators: Induction and natural selection. Limnology and oceanography, 55(1), 403-419. https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.1.0403

Klimovsky, A. I., & Kotov, A. A. (2015). Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) van centraal Yakutia. 3. Taxa van de soortengroep *Chydorus sphaericus* SL (Anomopoda, Chydoridae). Journal of Zoology, 94(11), 1257-1257. https://doi.org/10.7868/S0044513415110057

Kořínek, V., Sacherová, V., & Havel, L. (1997). Subgeneric differences in head shield and ephippia ultrastructure within the genus *Bosmina* Baird (Crustacea, Cladocera). Hydrobiologia, 360(1), 13-23. https://doi.org/10.1023/A:1003181706280

Kotov, A. A. (2013). On the homology of the frontal head pore in Cladocera (Crustacea: Branchiopoda). *Invert. Zool.*, *10*, 281-290. Geraadpleegd op 30-5-2022, afkomstig van: https://web.archive.org/web/20190428054430id_/http://kmkjournals.com/upload/PDF/IZ/IZ%20Vol%2010/invert10_2%20281_290%20Kotov.pdf

Kotov, A. A., Ishida, S., & Taylor, D. J. (2009). Revision of the genus *Bosmina* (Cladocera: Bosminidae), based on evidence from male morphological characters and molecular phylogenies. Zoological Journal of the Linnean Society, 156(1), 1-51. https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00475.x

Laforsch, C., & Tollrian, R. (2000). A new preparation technique of *daphnids* for Scanning Electron Microscopy using hexamethyldisilazane. Archiv für Hydrobiologie, 587-596. https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/149/2000/587

Lieder, U. (1983). Revision of the Genus *Bosmina* BAIRD, 1845 (Crustacea, Cladocera). Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie, 68(1), 121-139. https://doi.org/10.1002/iroh.19830680108

Post, D. M., Frost, T. M., & Kitchell, J. F. (1995). Morphological responses by *Bosmina longirostris* and *Eubosmina tubicen* to changes in copepod predator populations during a whole-lake acidification experiment. Journal of Plankton Research, 17(8), 1621-1632. https://doi.org/10.1093/plankt/17.8.1621

Sakamoto, M., & Hanazato, T. (2009). Proximate factors controlling the morphologic plasticity of *Bosmina*: linking artificial laboratory treatments and natural conditions. Hydrobiologia, 617(1), 171-179. https://doi.org/10.1007/s10750-008-9544-4

Sakamoto, M., Chang, K. H., & Hanazato, T. (2007). Plastic phenotypes of antennule shape in *Bosmina longirostris* controlled by physical stimuli from predators. Limnology and Oceanography, 52(5), 2072-2078. https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.5.2072

Soesbergen, M. (2021a). De kieuwpootkreeften van de Benelux.

Soesbergen, M. (2021b). Abnormalities in two *Bosmina longirostris* sl (OF Müller, 1785) populations (Crustacea: Branchiopoda: Bosminidae). International Journal of Fauna and Biological Studies 2021; 8(2): 107-112. https://doi.org/10.22271/23940522.2021.v8.i2b.819

Taylor, D. J., Ishikane, C. R., & Haney, R. A. (2002). The systematics of Holarctic *bosminids* and a revision that reconciles molecular and morphological evolution. Limnology and Oceanography, 47(5), 1486-1495. https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.5.1486

Wang, L., Zhuang, H., Zhang, Y., & Wei, W. (2019). Diversity of the *Bosmina* (Cladocera: *Bosminidae*) in China, revealed by analysis of two genetic markers (mtDNA 16S and a nuclear ITS). BMC evolutionary biology, 19(1), 1-12. https://doi.org/10.1186/s12862-019-1474-4

Bijlage 1 Logboek

Logboek Thesis Dave Jonker				
Datum	**Wat**	**Met wie**	**WAAR**	**Uren**
18-1-2022	Planplaatje	Martin Soesberge	Thuis/online	2
1-2-2022	Planplaatje & Vooronderzoek	Zelf	Kantoor rws	2
2-2-2022	Planplaatje & Vooronderzoek	Zelf	Kantoor rws	2
14-2-2022	Planplaatje & Vooronderzoek	Martin Soesberge	Kantoor rws	4
15-2-2022	Planplaatje & Vooronderzoek	Zelf	Kantoor rws	4
17-2-2022	Planplaatje & Vooronderzoek	Zelf	Kantoor rws	2
1-3-2022	Kringgesprek en werken aan voor	Sander	Online/kantoor rws	2
7-3-2022	Verwerken feedback vooronderzo	Zelf	Kantoor rws	4
8-3-2022	Verwerken feedback vooronderzo	Zelf	Kantoor rws	2
9-3-2022	Verwerken feedback vooronderzo	Zelf	Kantoor rws	4
11-3-2022	Verwerken feedback vooronderzo	Zelf	Thuis	4
15-3-2022	Verwerken feedback vooronderzo	Zelf	Thuis	4
16-3-2022	Verwerken feedback vooronderzo	Zelf	Kantoor rws	1
21-3-2022	Verwerken feedback vooronderzo	Zelf	Kantoor rws	1
22-3-2022	Werken aan m&m SEM	Martin Soesberge	Kantoor rws	8
30-3-2022	Overleg met Rene over SEM meth	Rene van Wezel	Laboratorium	2
31-3-2022	Bekijken van populaties	Martin Soesberge	Laboratorium	4
1-4-2022	Bekijken van populaties	Martin Soesberge	Laboratorium	4
4-4-2022	Werken aan intro en m&m	Zelf	Kantoor rws	6
8-4-2022	Werken aan intro en m&m	Zelf	Thuis	8
11-4-2022	Uittesten ophelderen en metinger	Martin Soesberge	Laboratorium	8
12-4-2022	Schrijven intro, maken van tekenir	Zelf	Kantoor rws	8
13-4-2022	Uitesten van preparatie technieke	Martin Soesberge	Laboratorium	8
14-4-2022	SEM foto's maken	Martin Soesberge	Laboratorium	8
19-4-2022	Metingen LM en vooronderzoek s	Zelf	Laboratorium	8
20-4-2022	Metingen LM	Zelf	Laboratorium	8
21-4-2022	Metingen LM	Zelf	Laboratorium	6
28-4-2022	Metingen LM	Zelf	Laboratorium	6
29-4-2022	Feedback verwerken	Zelf	Kantoor rws	4
1-5-2022	metingen LM	Zelf	Laboratorium	4
3-5-2022	metingen LM	Zelf	Laboratorium	4
6-5-2022	omschrijven m&m vt	Zelf	Laboratorium	1
9-5-2022	prepareren SEM materiaal	Zelf	Laboratorium	8
10-5-2022	prepareren SEM materiaal en bek	Martin	Laboratorium	8
11-5-2022	Bekijken van populaties SEM en is	Zelf	Laboratorium	8
12-5-2022	Bekijken van populaties SEM en is	Zelf	Laboratorium	8
13-5-2022	Bekijken populaties SEM	Zelf	Laboratorium	8
16-5-2022	Verwerken feedback Martin	Zelf	Kantoor rws	2
17-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	8
18-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	8
19-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	8
20-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	8
23-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	8
24-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	8
25-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	6
26-5-2022	Gegevens analyse	Zelf	Kantoor rws	8
27-5-2022	Discussie	Zelf	Kantoor rws	6
30-5-2022	Discussie en conclusie	Zelf	Kantoor rws	8
31-5-2022	Discussie en conclusie	Zelf	Kantoor rws	8
1-6-2022	Hele thesis controloren	Zelf	Kantoor rws	4
2-6-2022	Hele thesis controloren	Zelf	Kantoor rws	4
3-6-2022	Hele thesis controloren	Zelf	Kantoor rws	4
6-6-2022	Laaste controle	Zelf	Thuis	2
Som uren				283

Bijlage I Planplaatje

WAT: onderwerp (kennisgebied)

Het onderzoek naar zoöplankton is volledig stil komen te liggen na de invoering van de Kaderrichtlijn water (KRW) in 2000. De reden hiervoor was dat er geen zoöplankton was opgenomen in de KRW. Door een veranderende blik op waterbeheer is de interesse in zoöplankton teruggekeerd. Er is tegenwoordig meer aandacht voor de draagkracht van aquatische ecosystemen en hiermee ook voor zoöplankton door de cruciale rol die zoöplankton inneemt in het systeem. Zoöplankton consumeert onder andere primaire producenten (algen) en is voedsel voor vis(broed) en macrofauna. Doordat er ruim 20 jaar achterstand is opgelopen in zoöplankton onderzoek en technologische ontwikkelingen in DNA en microscopie hebben plaatsgevonden worden in veel soortgroepen nieuwe taxonomische inzichten opgedaan. Om deze reden moet ook de kennis over de Nederlandse zoöplankton worden geactualiseerd. Een soort waar in DNA onderzoek (NIOO KNAW) aanwijzingen zijn gevonden dat het mogelijk om drie genetische groepen gaat is *Bosmina longirostris.* Er zijn al zes morfologische variëteiten gevonden in *Bosmina longirostris; cornuta, pellucida, longirostris, brevicornis, similis* en *curvirostris*. Echter zijn de zes morfologische variëteiten nog niet als soort erkend. Daarnaast blijft het onduidelijk of er cryptische soorten in de soort *Bosmina longirostris* verscholen zijn.

HOE: deelvragen en methodes

- Welke morfologische vormen zijn er vertegenwoordigd in de genetische groepen?
- Wat zijn de verschillen van laterale kopporiën tussen de drie genetische groepen?
- Wat zijn de verschillen van klauwen tussen de drie genetische groepen?
- Welke andere onderscheidende morfologische kenmerken zijn er waarneembaar tussen de drie genetische groepen?

Voor de morfologische verschillen worden verschillende exemplaren bekeken met een lichtmicroscoop en een scanning electronen microscoop. De DNA barcoding wordt uitgevoerd door het NIOO-KNAW, zij maakten ook de fylogenetische bomen.

WAT: vraag

Met welke morfologische kenmerken kunnen de drie genetische groepen binnen *Bosmina longirostris* van elkaar worden onderscheiden?

WAAROM: reden/relevantie onderzoek

Hernieuwde interesse in zoöplankton door een verschuiving in focus van de waterbeheerders naar draagkracht van de watersystemen. Hier speelt zoöplankton een belangrijke rol in als consument van de eerste orde en voedsel voor vis(broed) en macrofauna. Daarnaast is de taxonomie niet meer actueel door 20 jaar achterstand in onderzoek. Verder worden er nieuwe taxonomische inzichten opgedaan door technologische ontwikkelingen in DNA en microscopie. Zo doende wordt er verwacht dat er binnen *Bosmina longirostris* cryptische soorten verscholen gaan. Dit is van belang voor limnologische studies, omdat deze cryptische soorten wellicht andere ecologische eigenschappen bezitten.

WAT: hypothesen / verwachte uitkomsten

Bosmina longirostris bestaat in Nederland mogelijk uit drie cryptische soorten die morfologisch verschillen van elkaar, zij hebben laterale kopporiën en/of klauwen. De zeven morfologische variëteiten zijn waarschijnlijk niet te koppelen aan de drie genetische groepen. Daarnaast zouden er mogelijk andere morfologische kenmerken aanwezig kunnen zijn die verschillend zijn voor de drie genetische groepen.