

Franz Csaikl

Institut für Krebsforschung

Borschkegasse 8 a, 1090 Wien

DIE BEDEUTUNG VON ISOENZYMUNTERSUCHUNGEN FÜR SYSTEMATIK UND
TAXONOMIE DER UNTERGATTUNG SYLVAEMUS (ROD., MUR., APODEMUS).

Bei den verschiedensten biologischen Fragestellungen ist man mit der großen Formenvielfalt der Natur konfrontiert.

Die Aufgaben dieser Wissenschaft werden von zwei Disziplinen, der Systematik und der Taxonomie wahrgenommen.

Die allgemein akzeptierten Definitionen stammen von SIMPSON (zitiert nach MAYR 1975):

Taxonomie ist die Theorie und die Praxis der Klassifikation der Organismen.

Systematik ist die wissenschaftliche Untersuchung der Arten und der Vielgestaltigkeit der Organismen und sämtlicher Beziehungen zwischen ihnen.

Während diese Disziplinen noch vor etwa 10 - 20 Jahren durch moderne Entwicklungen in Verhaltensforschung, Physiologie, Zellbiologie, Molekularbiologie und Genetik, aber auch der Ökologie in den Hintergrund gedrängt wurden, wird in jüngster Zeit die genaue Kenntnis der Arten, ihrer Variabilität und ihrer verwandtschaftlichen Beziehungen immer notwendiger.

Es werden teilweise neue Methoden der Klassifikation notwendig, da man für manche Untersuchungen eine schnelle, exakte und noch am lebenden Tier durchgeführte Bestimmung benötigt. Zudem werden Klassifikationen benötigt, die als Ursache für Ähnlichkeiten eine gemeinsame Abstammung haben.

Genetik und Molekularbiologie lassen es als sehr wahrscheinlich erscheinen, daß morphologische Merkmale (vor allem "hard structure" - Merkmale) erst sekundär nach einer genetischen Differenzierung entstanden sind. Untersuchungen dieser genetischen Differenzierungen sowie Beschreibung und Vergleich verschiedener Genotypen ermöglichen oftmals erst Aussagen über Evolutionsvorgänge oder evolutive Zusammenhänge. Beim gegenwärtigen Wissensstand ist es aber nach wie vor unmöglich, den Genotyp direkt zu analysieren. Es ergibt jedoch einige indirekte Methoden, die es gestatten, genetische Strukturen zu untersuchen. Zu diesen gehören das Sequenzieren von Nukleotiden und Aminosäuren, DNA - DNA-Hybridisierungen, immunologische und cytogenetische Techniken. Für Untersuchungen im Bereich der Feinsystematik, also auf dem Populations- und Artniveau haben sich vor allem Proteinelektrophoresen bewährt.

Diese Methode erlaubt es auch, Zwillingsarten, die mit den herkömmlichen Merkmalen nicht oder kaum bestimmt werden können, sowohl zu identifizieren als auch Verwandtschaftsverhältnisse zu klären. Ein Beispiel aus der einheimischen Säugetierfauna ist die Gattung *Apodemus*.

Nach morphologischen Kriterien lassen sich die drei in Österreich vorkommenden Arten *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis* und *A. microps* nur unzureichend bestimmen (siehe dazu auch ZIMMERMANN 1962, BAUER 1960, NIETHAMMER 1978, STEINER 1966).

Für eine säugetierkundliche Untersuchung des Steinfeldes (Wr. Becken) wurde die "Summe der Größenklassen (SGK)"- Methode nach STEINER (1966) angewandt. Dabei wurden 11 Schädel- und Körpermaße in vorher festgelegte Größenklassen eingeordnet und die Klassenwerte summiert. In Abb. 1 sind die SGK-Werte gegen die Dicke der Incisiven (=ID) aufgetragen.

Diese Auftrennung setzt aber voraus, daß das Material vorher in Altersklassen aufgeteilt wird. Ist dies aus irgendeinem Grund nicht möglich, so ist selbst mit dieser aufwendigen Methode keine eindeutige Bestimmung möglich.

Bei elektrophoretischen Untersuchungen (Elektrophoresen) macht man sich zu Nutze, daß Proteine auf Grund ihrer Aminosäuresequenz ladbar sind und in einem elektrophoretischen Spannungsfeld wandern. Bei der Wahl geeigneter Versuchsbedingungen lassen sich sowohl Plasmaproteine als auch Enzyme aus verschiedenen Organen auftrennen (CSAIKL 1980, HARRIS & HOPKINSON 1976).

Durch die Koppelung von Elektrophorese mit einem topographischen Nachweis von Enzymaktivitäten wird eine Trennschärfe erreicht, die es ermöglicht, multiple molekulare Enzymformen innerhalb eines Individuums darzustellen. Diese heißen "Isozyme" oder "Isoenzyme". Als Ursache für die Entstehung solcher Isoenzyme fungieren drei verschiedene molekulare Ursachen.

- 1) Multiple Genloci
- 2) Multiple Allelie
- 3) Sekundäre Isoenzyme

Letztere entstehen durch physiologische Vorgänge oder durch biochemische Degradationen während der Präparation, jedoch nie auf Grund unterschiedlicher Aminosäuresequenz.

Multiple Genloci sind durch Genduplikationen im Zuge der Evolution entstanden (OHNO 1970). Es resultieren zwei Genprodukte, die mit einer Enzymreaktion nachweisbar sind, aber eine andere Wanderungsgeschwindigkeit oder -richtung haben.

Als Beispiel seien hier jene Enzyme genannt, von denen eine Form in den Mitochondrien, die andere im Cytosol aktiv ist. Beide werden jedoch vom chromosomalen Genom kodiert.

Multiple Allelie ist die Hauptursache für die große genetische Variabilität der Organismen. Liegen in einem diploiden Individuum zwei verschiedene Allele für ein bestimmtes Gen vor, so ist dieses Individuum heterozygot und es kommt zur Produktion verschiedener Polypeptidketten. Unterscheiden sich diese in ihren ladbaren Aminosäuren, so sind im Versuch mindestens zwei Banden zu unterscheiden (siehe dazu CSAIKL 1980).

An einem Locus können nun zwei Organismen völlig identisch sein, wenn sie homozygot oder heterozygot für die gleichen Allele sind; zu 50 % identisch sein, wenn ein Organismus homozygot, der andere heterozygot ist; oder als dritte Möglichkeit, völlig verschieden sein, wenn sie homozygot oder heterozygot für verschiedene Allele sind (AVISE 1974).

Für systematische Fragestellungen gibt es nun zwei verschiedene Auswertungsmöglichkeiten: a) die Suche nach differentialdiagnostischen Allelen bzw. Loci, b) die Berechnung eines Koeffizienten über alle untersuchten Loci, der die verschiedenen Allelfrequenzen der untersuchten Arten (bzw. Individuen bei intraspezifischen Untersuchungen) in ein metrisches Maß umrechnet; dieses spiegelt dann die Ähnlichkeit (oder Unähnlichkeit-Distanz) zwischen den Arten (bzw. Populationen einer Art) wieder.

In der Vergangenheit sind mehrere solcher Koeffizienten beschrieben worden, so von NEI (1975), ROGERS (1972) und SOKAL & SNEATH (1963). Für die genetische Distanz D nach NEI gilt $D = -\ln I$, wobei I die Identität zweier Populationen ist. NEI definiert die Identität zweier Populationen am J -ten Locus als

$$I_J = \frac{x_i y_i}{(x_i^2 + y_i^2)^{1/2}}$$

x_i und y_i bezeichnen dabei die Frequenzen des i -ten Allels in den entsprechenden Populationen X und Y .

Die durchschnittliche Identität I über alle untersuchten Loci ist definiert als

$$I = \frac{J_{xy}}{(J_x J_y)^{1/2}}$$

J_x , J_y und J_{xy} sind dabei die arithmetischen Mittel über alle Loci (I_J) von x_i^2 , y_i^2 und $x_i y_i$.

Tabelle 1 gibt eine Aufstellung der genetischen Ähnlichkeit verschiedener Tiergruppen wieder.

Ein Teil der Werte ist nach den Formeln von ROGERS (1972) berechnet, welche mit den nach NEI kalkulierten gut vergleichbar sind (AVISE 1976)

Auf Grund der von mir bei einem Vergleich der Arten *A.sylvaticus* und *A.flavicollis* gefundenen Allelefrequenzen ergeben sich für I und D die Werte $I = 0,918$ und $D = 0,085$.

Die von mir erhobenen Daten sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

In ihr sind die Zahl der untersuchten Loci, die gefundenen Allele (Anzahl und Frequenz) sowie die Heterozygotität angegeben.

Von den 29 von mir bei *A.sylvaticus* und *A. flavicollis* untersuchten Genprodukten wiesen 4 (LDH B, LDH C = X, s-NADP-MDH und SOD) differenzialdiagnostische, allelische Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit auf.

A. microps unterscheidet sich von *A. sylvaticus* in 5 Genprodukten (LDH B, S-NADP-MDH, SOD, Tf, PA) und von *A.flavicollis* nur in 2 (Tf und PA).

Zur Differentialdiagnose wurden nur jene Genprodukte herangezogen, für welche beide Allele des entsprechenden Gens verschieden waren. Das heißt, es wurden auch jene Genprodukte, die in der einen Art homozygot, in der anderen jedoch heterozygot in Bezug auf dieses eine Allel waren, ausgeschieden.

Ein Differentialdiagnostisches Genprodukt für alle 3 untersuchten Arten konnte nicht gefunden werden.

Damit werden erstmals Merkmale vorgestellt, die eine eindeutige Identifikation dieser 3 Arten erlauben (Abb. 2, Tabelle 3).

Die größere Ähnlichkeit zwischen *A.fl.* und *A.m.* steht zwar in direktem Gegensatz zur Ähnlichkeit der untersuchten morphologischen Merkmale, bestätigt aber die Ähnlichkeitsverhältnisse dieser Arten bezüglich ihrer relativen Hodengewichte (KRATOCHVIL 1971).

Diese große Ähnlichkeit spiegelt sich auch in den von mir berechneten Werten von I bzw. D wieder.

Diese Werte stellen die beiden Arten auf das Niveau von weit voneinander differenzierten verschiedenen geographischen Populationen einer Art.

Dieses Ergebnis reicht zwar noch nicht aus, den Artcharakter von *A. flavicollis* in Frage zu stellen, wie es noch WETTSTEIN (1925), SCHAEFER (1935) und DALIMIER (1955) auf Grund von Körpermaßen getan haben, weist aber auf die äußerst nahe Verwandtschaft dieser Arten hin.

L i t e r a t u r

- AVISE, J.C., 1974: Systematic value of electrophoretic data. System.Zool. 23, 465.
- AVISE, J.C., 1976: Genetic differentiation during speciation. In: Molecular Evolution. (F.J.AYALA, ed.), 106. Sinauer Ass.Inc.Sunderland. Mass.
- BAUER, K., 1960 : Die Säugetiere des Neusiedlersee-Gebietes. Bonn.Zool.Beitr. 11, 141.
- CSAIKL, F., 1980: Beiträge zur Systematik der Gattung Apodemus (Rod.Mur) im Steinfeld, Niederösterreich. Diss.Univ. Wien.
- DALIMIER, P., 1955: Note sur une collection de mulots Apodemus sylvaticus (L.) de la region de Torgny. Bull.Inst.Roy. Sci.Nat.Belg., Brüssel, 31/78, 1.
- HARRIS, H. and D.A.HOPKINSON, 1976: Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publ. Comp.Amsterdam.
- KRATOCHVIL, J., 1971: Die Hodengröße als Kriterium der europäischen Arten der Gattung Apodemus (Rod., Mur). Zool.Listy 20(4), 293-306.
- MAYR, E., 1975: Grundlagen der zoologischen Systematik. P.Parey, Hamburg, Berlin.
- NEI, M., 1975: Molecular population genetics and evolution. North-Holland Publ.Comp., Amsterdam-Oxford.
- NIETHAMMER, J., 1978: Handbuch der Säugetiere Europas. (Hrsg.) Akad.Verl.Ges., Wiesbaden.
- OHNO, S., 1970: Evolution by Gene Duplication. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- ROGERS, J.S., 1972: Measures of genetic similarity and genetic distance, Studies in genetic VII (Univ.Texas Publ. 7213), 145.

- SCHAEFER, H., 1935: Studien an mitteleuropäischen Kleinsäugetern
mit besonderer Berücksichtigung der Rassenbildung.
Arch.Naturgesch. N.F. Leipzig, 4, 535.
- SOKAL, R.R. and P.H.A.SNEATH, 1963: Principles of numerical
taxonomy. Freeman, San Francisco.
- STEINER, H.M., 1966: Studien an der Gattung Apodemus (Mur., Mamm.)
in den Donauauen bei Wien. Diss.Univ.Wien.
- WETTSTEIN, O., 1925: Beiträge zur Säugetierkunde Europas II.
Arch.Naturgesch. 92, Abt. A, 64.
- ZIMMERMANN, K., 1966: Die Untergattungen der Gattung Apodemus Kaup.
Bonn.Zool.Beitr. 13, 198.

untersuchte Tierarten	Lokal- populationen	Sub- oder Semispecies	Species	Genera
<u>Evertebraten</u>				
Dros. willistoni	0,97	0,79	0,47	
Dros. obscura	0,99	0,82		
Dros. repleta	1,00	0,88	0,78	
<u>Vertebraten</u>				
Lepomis	0,98	0,84	0,54	
Cyprinidae	0,99			0,59
Taricha	0,95	0,84	0,63	0,31
Sceloporus ^x	0,89	0,79		
Mus ^x	0,95	0,77		
Apodemus		0,918		
Dipodomys ^x	0,97		0,61	0,16
Preomyscus ^x	0,95		0,65	

Tab. 1: Genetische Ähnlichkeit verschiedener Tiergruppen
 x genet. Ähnlichkeit nach Rogers Formeln
 berechnet (bis auf Apodemus nach Avise 1976).

Enzyme	Apodemus flavicollis					Apodemus sylvaticus					Apodemus microps					Gewebe
	untersuchte Tiere (No.)	Loci	gefundene Allele (No.)	Allelfrequenzen	Heterozygotität	untersuchte Tiere (No.)	Loci	gefundene Allele (No.)	Allelfrequenzen	Heterozygotität	untersuchte Tiere (No.)	Loci	gefundene Allele (No.)	Allelfrequenzen	Heterozygotität	
SDH	17	0	1	1	0	21	0	1	1	0	2	0	1	1	0	HMolyesat
EC 1.1.1.14																
LDH	23	A	1	1	0	21	A	1	1	0	2	A	1	1	0	- " -
EC 1.1.1.27	23	B	1	1	0	21	B	1	1	0	2	B	1	1	0	- " -
	6	X	1	1	0	11	X	1	1	0	-					Hoden
NAD-MDH	23	s	1	1	0	21	s	1	1	0	2	s	1	1	0	HMolyesat
EC 1.1.1.37	23	s	1	1	0	21	s	1	1	0	2	s	1	1	0	- " -
NADP-MDH	17	s	1	1	0	21	s	1	1	0	2	s	1	1	0	Leber
EC 1.1.1.40																
NADP-IDH	17	s	unauswertbar			21	s	unauswertbar			2	s	unauswertbar			- " -
EC 1.1.1.42	17	s	1	1	0	21	s	1	1	0	2	s	1	1	0	Herz
6-GPD	23	0	3	0,196	0,511	21	0	2	0,075	0,139	2	0	2	0,750	0,375	HMolyesat
EC 1.1.1.44				0,652					0,925					0,250		
				0,152												
G-6-PD	23	0	1	1	0	21	0	1	1	0	2	0	1	1	0	- " -
EC 1.1.1.49																
SOD	23	A	1	1	0	21	A	1	1	0	2	A	1	1	0	- " -
EC 1.15.1.1																
AAT	23	s	1	1	0	21	s	1	1	0	2	s	1	1	0	- " -
EC 2.6.1.1	17	s	1	1	0	21	s	1	1	0	2	s	1	1	0	Herz
CPK	17	A	1	1	0	21	A	1	1	0	2	A	1	1	0	Muskel
EC 2.7.3.2	17	B	1	1	0	21	B	1	1	0	2	B	1	1	0	- " -
	17	C	1	1	0	21	C	1	1	0	2	C	1	1	0	Hirn
	17	0	1	1	0	21	0	1	1	0	2	0	1	1	0	Muskel
AK	17	0	1	1	0	21	0	1	1	0	2	0	1	1	0	Muskel
EC 2.7.4.3																
Est. D	23	D	2	0,043	0,081	21	D	1	1	0	2	D	1	1	0	HMolyesat
EC 3.1.1.1				0,957												
ADA	23	0	2	0,804	0,315	21	0	1	1	0	2	0	2	0,750	0,375	- " -
EC 3.5.4.4				0,196										0,250		
Ald	17	A	1	1	0	21	A	1	1	0	2	A	1	1	0	Niere
EC 4.1.2.13	17	B	1	1	0	21	B	1	1	0	2	B	1	1	0	Muskel
	17	C	1	1	0	21	C	1	1	0	2	C	1	1	0	Hirn
	17	D	1	1	0	21	D	1	1	0	2	D	1	1	0	- " -
	23	0	1	1	0	21	0	1	1	0	2	0	1	1	0	HMolyesat
GLO I																
EC 4.4.1.5																
PGI	23	0	1	1	0	21	0	1	1	0	2	0	1	1	0	- " -
EC 5.3.1.9																
Iib	23	A	1	1	0	21	A	1	1	0	2	A	1	1	0	- " -
	23	B	1	1	0	21	B	1	1	0	2	B	1	1	0	- " -
TF	2	0	1	1	0	6	0	1	1	0	2	0	1	1	0	Serum
PA	2	0	1	1	0	6	0	1	1	0	2	0	1	1	0	- " -

Tab. 2: Elektrophoretische Ergebnisse

1. LDH B	langsames Allel A. sylvaticus
	schnelleres Allele 2.
2. Tf	langsames Allel A. microps
	schnelleres Allel A. flavicollis

Tab. 3: Biochemisch - genetischer Schlüssel für die
UG Sylvaemus bei einem paarweisen Vergleich
der drei Arten.

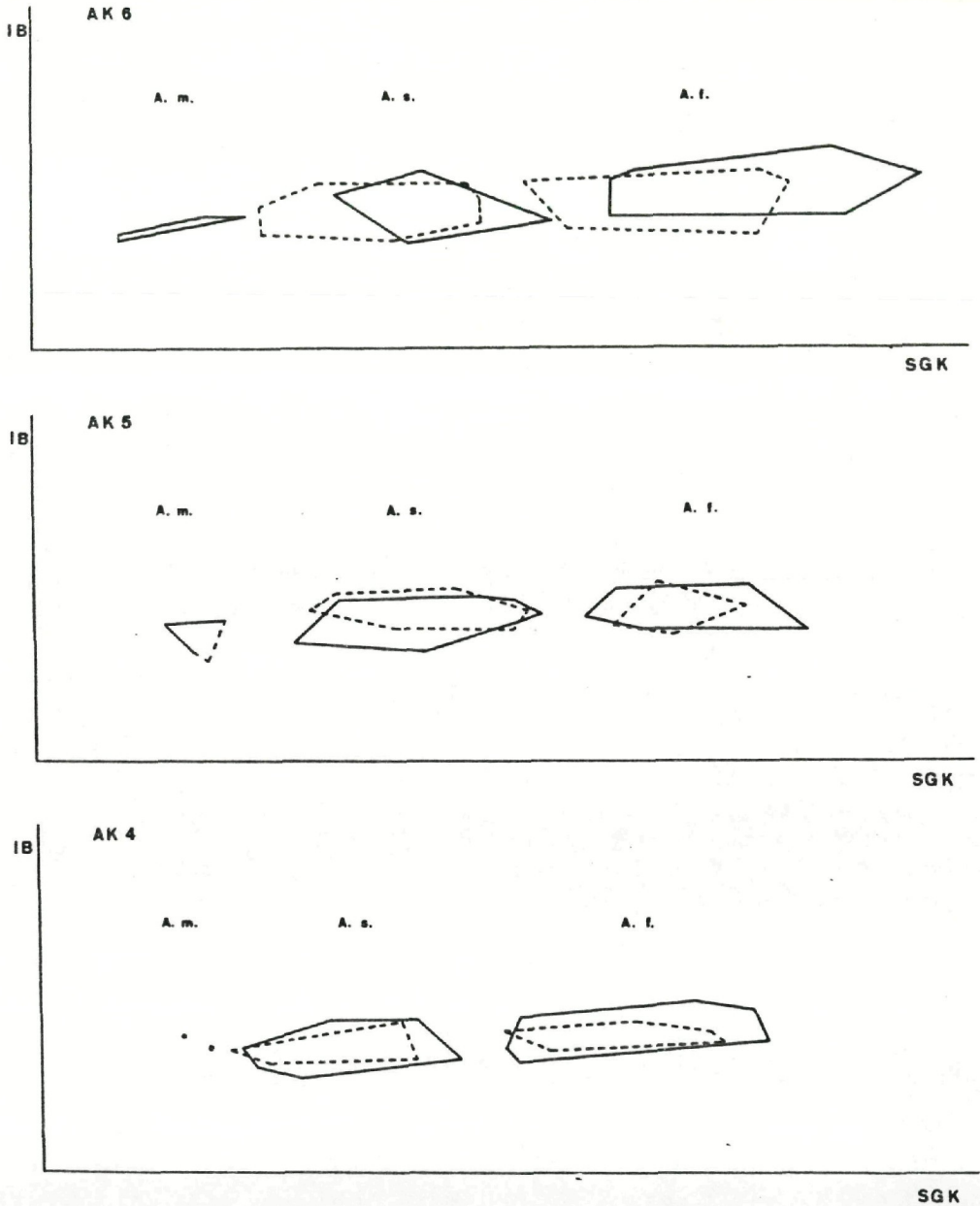


Abb. 1: Korrelationsdiagramm. Abhängigkeit von Incisiven-
dicke (Ordinate) und Summe der Größenklassen (SGK)
(Abszisse) der Altersklassen (AK) 4 - 6 verschie-
dener Fangzeit. Männchen: —, Weibchen:

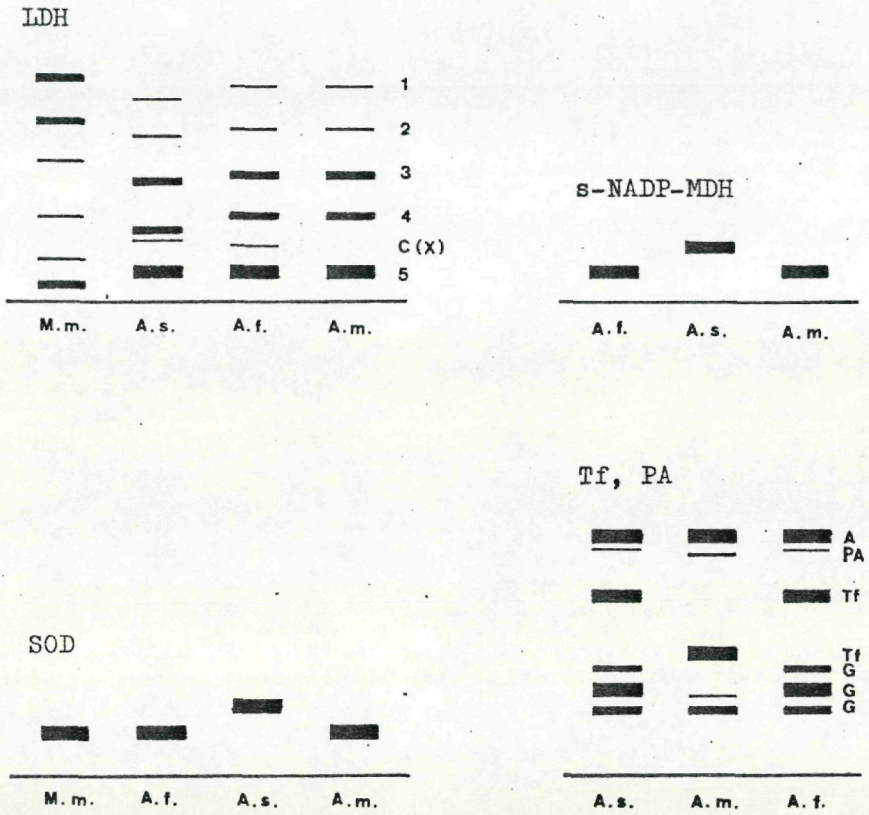


Abb. 2: Artspezifische Isoenzymmuster

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [BFB-Bericht \(Biologisches Forschungsinstitut für Burgenland, Illmitz 1](#)

Jahr/Year: 1983

Band/Volume: [47](#)

Autor(en)/Author(s): Csaikl Franz

Artikel/Article: [Die Bedeutung von Isoenzymuntersuchungen für Systematik und Taxonomie der Untergattung Sylvaemus \(Rod., Mur., Apodemus\) 225-237](#)