©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Wissenschaft

Österreichs Fischerei Jahrgang 52/1999 Seite 57–62

Untersuchung von Perlfischen *(Rutilus frisii meidingeri,* Heckel) aus dem Wolfgangsee und dem Attersee auf genetische Unterschiede mit molekulargenetischen Markern

HELMUT FUCHS, PETER SCHLEE, OSWALD ROTTMANN, HERBERT STEIN
Institut für Tierwissenschaften der TU München-Weihenstephan, D-85350 Freising

Abstract

Genetic analysis of lake chub *(Rutilus frisii meidingeri, Heckel)* from Wolfgangsee and Attersee using molecular markers
The genetic relationship between two lake chub *(Rutilus frisii meidingeri, Heckel)* populations from Wolfgangsee and from Attersee (both in Austria) was estimated using molecular genetic methods. The RAPD-technique (random amplified polymorphic DNA) applied to 11 and 15 animals, respectively, revealed two bands showing significantly different frequencies within the tow lake chub populations. Techniques like RAMPO (random amplified microsatellite polymorphism), analysis of a part of the growth hormone gene by SSCP (single strand conformation polymorphism) or sequence analysis of a part of the cytochrome b gene did not detect any differences between the lake chub populations from Wolfgangsee and Attersee.

Zusammenfassung

Elf Perlfische aus dem Wolfgangsee und 15 Perlfische aus dem Attersee wurden mit molekulargenetischen Markern auf genetische Unterschiede untersucht. Mit der RAPD-Technik (random amplified polymorphic DNA) wurden zwei Banden gefunden, die signifikant unterschiedlich häufig in den untersuchten Populationen auftraten. Mit weiteren molekulargenetischen Methoden wie RAMPO (random amplified microsatellite polymorphism), SSCP-Analyse eines Teiles des Wachstumshormongenes und Sequenzierung von Teilstücken des Cytochrom b-Genes, konnten keine zusätzlichen Unterschiede zwischen den Perlfischen aus Wolfgang- und Attersee gefunden werden.

Einleitung

Der Perlfisch *(Rutilus frisii meidingeri,* Heckel) lebt in einigen Seen des Alpengebietes (Chiem-, Traun-, Atter-, Mond- und Wolfgangsee) und laicht in deren Zuflüssen ab. Die bestehenden Perlfischbestände sind in ihrer Existenz bedroht. Die einzige deutsche Perlfischpopulation war im Chiemsee heimisch. Jedoch gingen in den letzten 15 Jahren die Fänge zurück. Mittlerweile gilt die Perlfischpopulation des Chiemsees als verschollen oder ausgestorben.
Da die örtlichen Fischer, der Fischereiverband Oberbayern und der Bezirk Oberbayern an einem Fortbestand dieser Art im Chiemsee interessiert waren, wurde an eine Wiedereinbürgerung von Perlfischen aus dem österreichischen Attersee gedacht. Deshalb wurde beschlossen, 1995 Perlfische aus dem österreichischen Attersee in den Chiemsee einzusetzen. Kritiker dieses Vorhabens befürchteten, daß sich die Attersee-Perlfische genetisch von den ursprünglichen Chiemsee-Perlfischen unterscheiden würden. So wäre es möglich, daß Fische aus dem Attersee nicht

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

über die genetische Information verfügen, um sich in der speziellen Umgebung des Chiemsees zurechtzufinden. Sie hätten dann eine geringere Überlebenserwartung im Chiemsee, und somit wäre die aufwendige Wiederansiedelung nicht sinnvoll. Um eine Antwort auf die Frage der genetischen Distanz der Perlfischpopulationen zu erlangen, wurden 15 Perlfische aus dem Attersee für wissenschaftliche Untersuchungen freigegeben. Weitere 11 Perlfische aus dem nahegelegenen Wolfgangsee wurden gesammelt. Beide Stichproben wurden mit verschiedenen molekulargenetischen Methoden untersucht, um die Populationsstruktur der Perlfische zu erforschen. Interessant wäre ein Vergleich der Ergebnisse der österreichischen Perlfische aus Atter- und Wolfgangsee mit Proben von ursprünglichen Chiemsee-Perlfischen gewesen, doch standen keine Perlfische und auch keine Überreste wie Schuppenproben oder ähnliches zur Verfügung.

Zunächst war nur an eine Untersuchung mit der RAPD-Technik (Random Amplified Polymorphic DNA) gedacht. Da aber Perlfische sonst nicht für Untersuchungen zur Verfügung stehen, wurden später weitere Techniken verwendet, um soviel Informationen wie möglich durch das Probenmaterial zu gewinnen.

RAPD (random amplified polymorphic DNA, Williams et al., 1990) ist eine auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende schnelle und sensitive Fingerprinting-Technik. Mit RAPD ist es möglich, Mutationen, Deletionen oder Insertionen an vielen Orten im Genom nachzuweisen. Dazu werden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mehrere DNA-Fragmente amplifiziert und auf einem Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Anhand der entstandenen Bandenmuster können genetische Polymorphismen aufgrund der Anwesenheit oder Nichtanwesenheit von Banden nachgewiesen werden. Der Vorteil dieser Technik liegt in dem Potential, eine Untersuchung schnell und ohne Sequenzinformationen durchführen zu können. Ein Problem der Methode ist, daß die Reaktion von vielen Faktoren beeinflußt werden kann und deshalb die Reaktionsbedingungen standardisiert werden müssen.

Eine Variante von RAPD stellt RAMPO (random amplified microsatellite polymorphism, Richardson et al., 1995) dar. Mit RAMPO können von einem schon mit RAPD untersuchten Primerset weitere Polymorphismen dargestellt werden, indem die Bandenmuster aus dem Agarosegel auf eine Membrane übertragen und anschließend mit einer Sonde für eine repetitive Sequenz hybridisiert werden. Durch die parallele Verwendung von RAPD- und RAMPO-Markern können bei geringem finanziellen und zeitlichen Aufwand viele Fingerprints erzeugt werden.

Tab. 1: **Sequenzen der verwendeten RAPD-Primer**

Name	5′ 3′	Name	5′ 3′
F5	GGGAGATCAAGCCTTA	RAPD21	ACCTGCAGCG
F6	GGGAGATCAAGCCTTT	RAPD22	CTCGCTGCAG
F9	CATCTCTGGTAACATT	RAPD31	AACCCGGGTC
F10	CATCTCTGGTAACATG	RAPD32	ATATCCCGGG
F11	ACCCAAAGTCAAATT	RAPD33	ACGTCTCGAG
F12	ACCCAAAGTCAAATG	RAPD34	GGGCTCTAGA
RAPD1	ACGGTACACT	RAPD35	AGCAGGAGCT
RAPD2	ACGGTCCACG	RAPD36	ACCGCTGCAT
RAPD16	TCGGAAGCCG	RAPD37	GCATTGGCCA
RAPD17	ACGTGGCACG	RAPD38	CGGAATTCCC
RAPD18	CGATATCGGG	RAPD39	GGCCGAATTC
RAPD19	ACGGATCCCG	RAPD40	ACGGAATTCC
RAPD20	GTGCGGATCC		

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Mit der SSCP-Analyse (Orita et al., 1989) ist es möglich, ein definiertes DNA-Fragment auf Polymorphismen zu untersuchen. Voraussetzung dafür ist, daß die Information zur Konstruktion von Primern für die Amplifikation des DNA-Fragmentes mit der Polymerase-Kettenreaktion vorhanden ist. Mit der SSCP-Analyse können, wenn das System optimal konfiguriert ist, Unterschiede von nur einer Base (Punktmutation, Nielsen et al., 1995) in der Basensequenz zweier DNA-Fragmente detektiert werden.
Die SSCP-Analyse wird an Genauigkeit nur von der Sequenzierung übertroffen. Jedoch besteht bei der Sequenzierung das Problem, daß diese Technik sehr teuer und zeitaufwendig ist (Ward und Grewe, 1994).

Material und Methoden

Perlfische

Muskelgewebeproben von 15 Perlfischen aus dem Attersee und elf Perlfischen aus dem Wolfgangsee wurden vom Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde, Scharfling, zur Verfügung gestellt.

DNA-Präparation

Die DNA wurde nach einem leicht abgewandelten Protokoll nach Sambrook et al. (1989) aus Muskelgewebe präpariert. Abweichend von Sambrook et al. (1989) wurden die Proben vor dem Proteinase K-Verdau für 15 Minuten auf 95° C erhitzt.
Die DNA-Analyse wurde mit Hilfe mehrerer Techniken durchgeführt, dem sogenannten RAPD-Fingerprinting, dem stärker auflösenden *RAMPO Fingerprinting,* mit Hilfe von SSCP und schließlich der Sequenzanalyse (siehe Einleitung). Eine detaillierte Methodenbeschreibung findet sich bei Fuchs et al. (1998).

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Perlfische mit 25 RAPD-Primern konnten mit neun Primern beim Perlfisch keine PCR-Produkte erzeugt werden. Die Bandenmuster der Amplifikate von weiteren neun Primern waren bei allen untersuchten Fischen identisch. Polymorphe Banden traten nur bei sieben Primern auf. Darunter waren zwei Banden, die signifikant unterschiedlich häufig nur in den Perlfischpopulationen von Atter- und Wolfgangsee vorkamen. Bande 21/600 (21/600 bedeutet, daß eine Bande von etwa 600 Basenpaaren Länge mit dem Primer RAPD21 amplifiziert wurde, Abbildung 1) kam bei 91% der Perlfische aus dem Wolfgangsee und bei

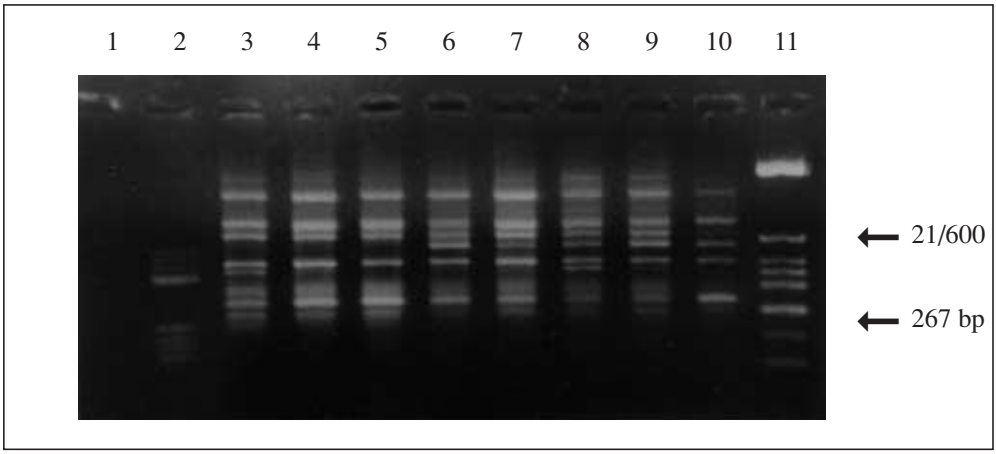

Abb. 1: RAPD-Fingerprintmuster von Perlfischen mit dem Primer RAPD21. Die Bande 21/600 ist markiert. 1: PCR ohne DNA-Template, 2: DNA-Längenabstand pBR322 HaeIII, 3–6: Perlfische aus dem Attersee, 7–10: Perlfische aus dem Wolfgangsee, 11 DNA-Längenstandard pBR328 HinfI.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

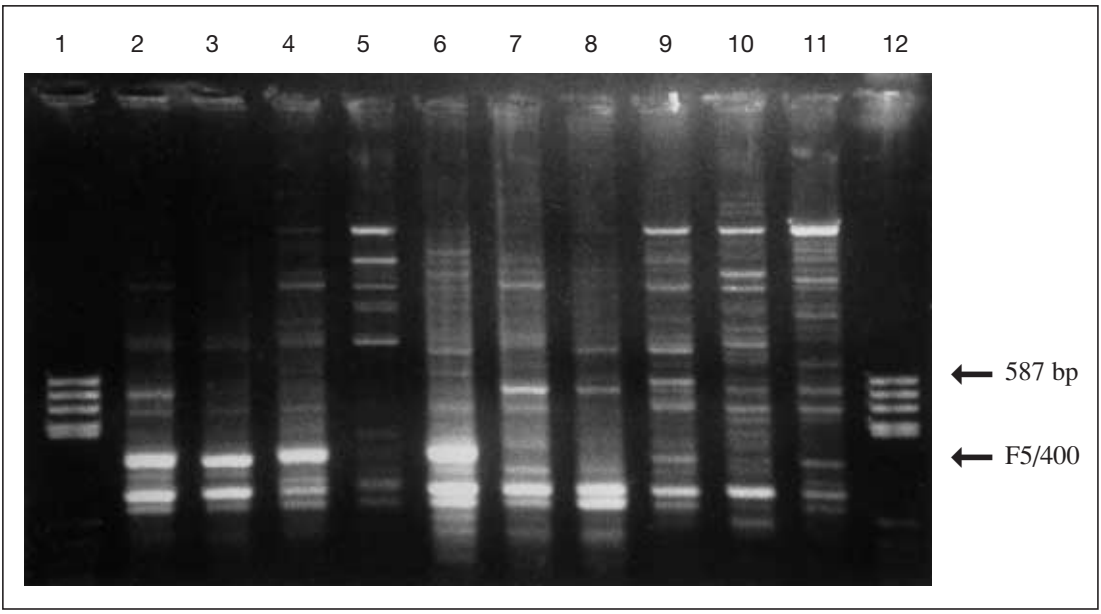

Abb. 2: RAPD-Fingerprints von Perlfischen mit dem Primer F5. Die Bande F5/400 ist markiert. 1,12: DNA-Längenstandard pBR322 HaeIII, 2–6: Perlfische aus dem Attersee, 7–11: Perlfische aus dem Wolfgangsee

58% der Perlfische aus dem Attersee vor ($p<5\%$). Die Bande F5/400 (Abbildung 2) zeigt Helligkeitsunterschiede, was auf unterschiedliche Fragmentmengen bei gleicher Länge hindeutet. Mit dem Primer F5 konnten sehr viele Fragmente amplifiziert werden. 80% der Attersee-Perlfische wiesen eine besonders helle Bande von etwa 400 Basenpaaren Länge auf. Bei den Fischen aus dem Wolfgangsee herrschte die weniger helle Variante vor (zehn von elf Fischen). An diesem Locus unterscheiden sich die beiden Populationen mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,1%.

Mit der RAMPO-Technik konnten keine weiteren Polymorphismen beim Perlfisch gefunden werden. Die meisten RAMPO-Banden ließen sich von einer starken RAPD-Bande ableiten.

Mit der SSCP-Methode wurden die mit den Primern CC1 und CC2 erzeugten DNA-Fragmente auf Polymorphismen untersucht. Die Primer CC1 und CC2 amplifizierten ein PCR-Produkt, das das Intron IV sowie Teile der Exons IV und V des Wachstumshormongenes des Perlfisches enthält. Die SSCP-Muster aller untersuchten Perlfische waren identisch.

Mit den Primern H15149 und L14841 nach Kocher et al. (1989) konnten PCR-Produkte aus dem Cytochrom b-Gen der Perlfische amplifiziert werden. Die PCR-Produkte von je fünf Fischen aus dem Attersee und fünf aus dem Wolfgangsee wurden mit einem ABI 373 A Automatic DNA Sequencer direkt sequenziert. Es konnten keine Sequenzunterschiede festgestellt werden. An einigen Stellen war bei manchen Fischen die genaue Sequenz einer Base vom Sequenzierautomaten nicht zu ermitteln. An solchen Positionen wurde mit Hilfe von Restriktionsenzymen zusätzlich überprüft, ob an dieser Stelle mehrere Sequenzvarianten vorliegen. Es konnte in keinem Fall ein Polymorphismus nachgewiesen werden.

Da nicht alle zur Verfügung stehenden Perlfische sequenziert werden konnten und dadurch noch die Möglichkeit bestand, daß die nichtsequenzierten Fische Träger von anderen Varianten am untersuchten Locus wären, wurden die PCR-Produkte der Primer H15149 und L14841 aller Perlfische mit der SSCP-Technik analysiert. Alle Perlfische zeigten das gleiche SSCP-Bandenmuster. Aufgrund dieser Ergebnisse gilt die in Abbildung 3 angegebene Sequenz für das Teilstück des Cytochrom b-Genes.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

```
  1 CTACTAGGAT TATGTTTAAT TACCCAAATC CTAACAGGAT TATTCTTAGC TATGCAC-
TAT
 61 ACCTCTGACA TCTCAACCGC ATTTTCATCA GTAACCCATA TTTGCCGAGA CGTCAAC-
TAT
121 GGCTGGCTTA TCCGAAACCT GCACGCTAAT GGGGCATCCT TCTTCTTCAT CTGTCTT-
TAT
181 ATACATATCG CACGAGGCCT ATACTACGGA TCATACCTTT ATAAAGAAAC CTGAAA-
CATT
```

Diskussion

Nur mit der RAPD-Technik konnten Polymorphismen beim Perlfisch aufgezeigt werden. Weder die Sequenzierung eines Teilstückes des Cytochrom b-Genes, noch die SSCP-Analyse des Intron IV des Wachstumshormongenes zeigten Polymorphismen auf. Bei Untersuchungen von Lauben *(Alburnus alburnus,* L.) und Brachsen *(Abramis brama,* L.) verschiedener Gewässer wurden im identischen Teil des Cytochrom b-Genes ebenfalls keine Polymorphismen gefunden (Fuchs et al., 1998). Jedoch liegt je ein Polymorphismus im Intron IV des Wachstumshormongenes beider Arten (Schlee et al., 1996, Gross et al., 1996). Dies zeigt, daß das Intron IV des Wachstumshormongenes bei den Cypriniden eine hohe Mutationsrate besitzt. Das Fehlen von Polymorphismen in diesem Abschnitt der DNA beim Perlfisch deutet eine nahe Verwandtschaft der untersuchten Fische an. Diese These wird von der Tatsache unterstützt, daß auch mit RAMPO-Fingerprints keine Polymorphismen, die die Herkünfte unterscheiden, gefunden werden konnten. Bei der Untersuchung des Perlfischmaterials mit der RAPD-Technik war es nur mit wenigen Primern möglich, polymorphe Bandenmuster zu erzeugen. Im Vergleich zu RAPD-Analysen bei Lauben und Brachsen aus dem Main und Donaugebiet (Fuchs et al., 1998a, Fuchs et al., 1998b) mit den gleichen Primern, erzeugten bei den Perlfischen weit mehr Primer bei allen Fischen ein identisches Bandenmuster. Dies führt zu dem Schluß, daß die Perlfischpopulationen von Attersee und Wolfgangsee genetisch sehr ähnlich sind. Andererseits können die Populationen nicht als genetisch identisch bezeichnet werden, da die genetische Distanz zwischen den Perlfischpopulationen von Attersee und Wolfgangsee von null verschieden sind. Dies begründet sich aus den signifikanten Unterschieden der Frequenzen der Banden 21/600 und F5/400.

Insgesamt kann gesagt werden, daß auf Grund der ziemlich großen Ähnlichkeit zwischen den zwei natürlichen Populationen der Besatz des Chiemsees aus genetischer Sicht zu vertreten ist.

LITERATUR

Chiou C.-S., Chen H. T. and Chang W. C. 1990. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp *(Cyprinus carpio)*. Biochimica et Biophysica Acta, 1087: 91–94.

Fuchs H., Schlee P., Rottmann O. and Stein H. 1998. Differentiation of bleak *(Alburnus alburnus)* populations from rivers Main and Donau with molecular genetic markers. Journal of Animal Breeding and Genetics, 115 (im Druck).

Fuchs H., Gross R., Rottmann O. and Stein H. 1998. Application of molecular genetic markers to the differentiation of bream *(Abramis brama L.)* populations from rivers Main and Danube. Journal of Applied Ichthyology, 14: 49–55.

Gross R., Schlee P., Stein H. and Rottmann O. 1996. Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream, *Abramis brama L.* using heteroduplex analysis. Journal of Fish Biology, 48: 1283–1287.

Ho W. K. K., Wong M-W. and Chan A. P. Y. 1991. Cloning and sequencing of the grass carp *(Ctenopharyngodon idellus)* growth hormone gene. Biochimica et Biophysica Acta, 1090: 245–248.

Hong Y. and Schartl M. 1993. Sequence of the growth hormone (GH) gene from the silver carp *(Hypophthalmichthys molitrix)* and evolution of GH genes in vertebrates. Biochimica et Biophysica Acta, 1174: 285–288.

Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Pääbo S., Villablanca F. X. and Wilson A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 86: 6196–6200.

Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

Nielsen, D. A., Novoradovsky A., Goldman D. 1995. SSCP primer design based on single-strand DNA structure predicted by a DNA folding program. Nucleic Acids Research, 23 (12): 2287–2291.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), 86: 2766–2770.
Richardson T., Cato S., Ramser J., Kahl G. and Weising K. 1995. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphism markers. Nucleic Acids Research, 23 (18): 3798–3799.
Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/N.Y.
Schlee P., Fuchs H., Blusch J., Werner T., Rottmann O. and Stein H. 1996. Nucleotide substitution in the growth hormone intron of the cyprinide *Alburnus alburnus*. Journal of Fish Biology, 48: 1275–1277.
Ward R. D. and Grewe P. M. 1994. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 4 (3): 300–325.
Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J. and Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18 (22): 6531–6535.
Yu K. and Pauls K. P. 1992. Optimization of the PCR programm for RAPD analysis. Nucleic Acids Research, 20 (10): 2606.

Danksagung

Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Bayerischen Landesfischereiverbandes durchgeführt.

Fischereiwirtschaft und Fischereibiologie

Die Äschen *(Thymallinae)* der Mongolei aus den drei verschiedenen Entwässerungsgebieten

JOHANNES SCHÖFFMANN
Lastenstraße 25, A-9300 St. Veit/Glan

Abstract

The grayling species *(Thymallinae)* of the three different catchment areas of Mongolia.
In rivers ending in the drainageless central basin lives *Thymallus brevirostris,* in the catchment of rivers mouthing towards the Arctic Sea lives *Thymallus nigrescens,* and in rivers of the pacific drainage area the Amur grayling *(Thymallus grubei)* is found. In 1897 G. Littledale brought a specimen from the "south slopes of Altai mountains" to the British Museum, which was later described by G. Boulenger as a new genus and species *Phylogephyra altaica*. An expedition carried out in summer 1998 did not verify the existence of graylings in waters at the south slope of Altai.

Das Entstehungszentrum der Äschen wird in den Bergen Südsibiriens und in der nördlichen Mongolei vermutet, wo die meisten Formen und Arten dieser Unterfamilie der Lachsähnlichen *(Salmonidae)* zu finden sind (Swetowidow, 1936).
Das hydrogeographische Netz der Mongolei wird in drei Richtungen entwässert: zum nördlichen Eismeer, zum Stillen Ozean und zum zentralasiatischen abflußlosen Becken (siehe Abb. 1). Jedes dieser Einzugsgebiete beherbergt eigene Äschenarten bzw. -unterarten.
Das Einzugsgebiet des nördlichen Polarmeeres ist die Heimat der **arktischen Äsche** *(Thymallus arcticus* PALLAS, 1776) (siehe Abb. 2), die mit zahlreichen Unterarten über ganz Sibirien und über die Beringstraße bis zur Ostküste Nordamerikas verbreitet ist. Die arktische Äsche unterscheidet sich von der europäischen Äsche *(Thymallus thymallus* L. 1758) vor allem durch

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Österreichs Fischerei

Jahr/Year: 1999

Band/Volume: 52

Autor(en)/Author(s): Fuchs Helmut, Schlee Peter, Rottmann Oswald, Stein Herbert

Artikel/Article: Untersuchung von Perlfischen (Rutilus frisii meidingeri, Heckel) aus dem Wolfgangsee und dem Attersee auf genetische Unterschiede mit molekulargenetischen Markern 57-62