SABINE RIEWENHERM UND HELMUT LIETH (HRSG.) 1990: VERHANDLUNGEN DER GESELLSCHAFT FÜR ÖKOLOGIE (OSNABRÜCK 1989) BAND XIX/II [POSTER]: 290-295

LEBENSZYKLUS-, ULTRASTRUKTUR-, GESAMTPROTEIN- UND ISOENZYMMUSTERUNTERSUCHUNGEN ALS METHODEN DER TAXONOMIE SCHWER IDENTIFIZIERBARER TERRESTRISCHER ENCHYTRAEIDENARTEN (OLIGOCHAETA, ANNELIDA)

Volker Brockmeyer, Kornelia Middendorf, Günter Purschke, Tina Rötting und Wilfried Westheide

ABSTRACT

Life cycle data, ultrastructural features and protein data are considered as tools in the taxonomy of the genus *Enchytraeus*. The species of this genus are often inseparable under the light microscope. Cocoon production, number of eggs, hatching success, and duration of development can be applied for the differentiation of species, but the overlapping of data occurs. Transmission electronmicroscopy of mature sperm shows distinct species-specific morphometric and structural differences, which are remarkably parallel to isoenzyme analysis by polyacrylamide gel isoelectric focusing. Total protein band pattern obtained by IEF are especially suited to identify single specimens and to differentiate between individuals even after fixation.

keywords: *life cycle data, ultrastructural features, protein data, taxonomy, Enchytraeus*

EINLEITUNG

Enchytraeiden sind charakteristische Elemente der Zersetzergesellschaften fast aller Böden gemäßigter Klimazonen. In einigen Bodentypen liegt ihr Anteil an der Gesamtbiomasse bei über 10 % (PERSSON und LOHM 1977). Die Bedeutung der Enchytraeiden für grundlegende Fragestellungen der Bodenökologie (KAIRESALO 1978, O'CONNOR 1967, PETERSON und LUXTON 1982, PHILLIPSON 1979), der angewandten Bodenbiologie (GRAEFE 1989) und der ökotoxikologischen Praxis (BETHKE-BEILFUß und WESTHEIDE 1987, RÖMBKE 1989, WESTHEIDE et al. 1989) wird zunehmend erkannt. Einer notwendig stärkeren Berücksichtigung der Tiergruppe für diese Arbeitsbereiche steht aber ihre unzulängliche taxonomische Bearbeitung entgegen. Hohe strukturelle Ähnlichkeit auf lichtmikroskopischer Ebene und eine gewisse Variabilität morphologischer Merkmale haben bisher die befriedigende Klärung ihrer Taxonomie behindert. Das Spektrum der Enchytraeidenarten in Mitteleuropa ist nur zum Teil bestimmbar. Besonders für die weit verbreiteten Arten der Gattung *Enchytraeus* fehlen sichere Diagnosen.

In dem von der VW-Stiftung geförderten Vorhaben "Lösung zoosystematischer Probleme mit biochemischen und morphologischen Methoden" sind von verschiedenen Arbeitsgruppen u.a. *Enchytraeus*-Arten beispielhaft für die Abschätzung der Aussagefähigkeit und Anwendbarkeit verschiedenster taxonomischer Methoden untersucht worden. In der Arbeitsgruppe Spezielle Zoologie, Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Osnabrück wurden hierzu 19 *Enchytraeus*-Populationen verschiedener Herkunft mit Methoden der Lebenszyklusanalyse, der Elektronenmikroskopie und der Proteinelektrophorese auf diagnostisch eindeutige Unterschiede verglichen und ihr Biospeziescharakter durch Kreuzungsexperimente überprüft.

Untersuchungen an zwei Populationen - mit den Arbeitsnamen Spec. E. und Spec. H - werden im folgenden als Beipiele für ein derartiges Vorgehen vorgestellt. Sie lassen sich als deutlich

getrennte Arten erkennen. Ihre Zuordnung zu bereits beschriebenen Taxa oder eventuell erforderliche Neubeschreibungen sollen jedoch erst im Rahmen eines Gesamtvergleichs aller Untersuchungen an der Gattung *Enchytraeus* an anderer Stelle erfolgen.

Ergebnisse

Lebenszyklusanalyse

Von je 5 Tieren in einer Petrischale (55 mm Durchmesser, etwa zur Hälfte mit 1,5 % Knoop-Nährlösungsagar gefüllt, Haferflocken im Überschuß als Futter) wurden unter konstanten Bedingungen (21 °C, 85 % relative Luftfeuchte im Klimaschrank ohne Beleuchtung) Daten der Fortpflanzung über 30 Tage registriert. Jede Versuchsreihe bestand aus 20 Parallelen.

Deutliche Unterschiede zwischen den Populationen von Spec. E und Spec. H zeigen sich in der Kokonproduktion (Zahl der Kokons pro Individuum x Tag) und der durchschnittlichen Zahl der Eier in den Kokons (Abb. 1). Spec. H produzierte wesentlich mehr Kokons als Spec. E; die Eizahl/Kokon ist jedoch bei Spec. H geringer, so daß sich recht ähnliche Werte für die Eiproduktion ergeben. Nicht signifikant unterschiedlich sind Schlupfrate (Eifertilität) und Dauer der Embryonalentwicklung (Abb. 1).

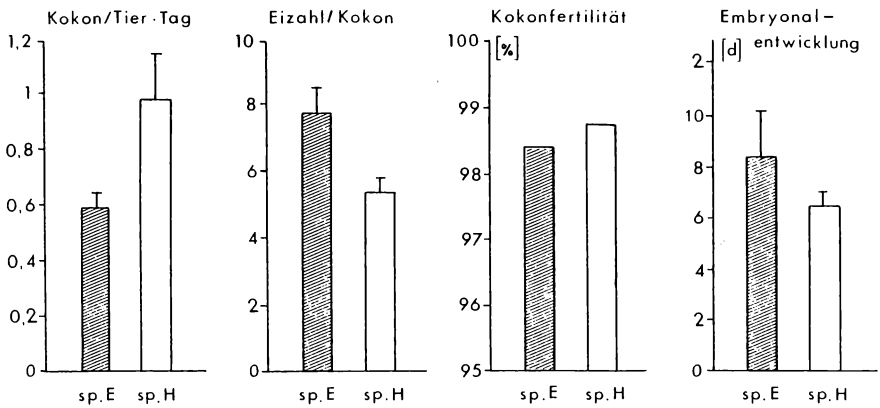

Abb. 1: Lebenszyklusdaten von *Enchytraeus* spec. E. und *Enchytraeus* spec. H.

Elektronenmikroskopie

Aus dem großen Spektrum ultrastruktureller Charaktere wurden die reifen Spermien gewählt und ihre einzelnen Abschnitte und Organellen qualitativ und quantitativ in Serienschnittanalysen unter dem Transmissionselektronenmikroskop miteinander verglichen. Vermessen wurden die Länge des Akrosoms, die Länge des Kerns, die Länge des Mittelstücks, die Zahl der Windungen des Zellkerns und die Windungszahl der Mitochondrien im Mittelstück. Unterschiede in der Form weist das Akrosom auf, dessen Spitze bei Spec. E annähernd gleichmäßig gerundet, bei Spec. H dagegen vorn deutlich abgeflacht ist (Abb. 2A-B). Die Mittelstücklänge ist mit 0,9 μm gleich. Unterschiede sind auch in der Akrosomlänge (0,9 bzw. 0,7 μm) und in der Kernlänge (14,7 bzw. 12,5 μm) vorhanden. Am deutlichsten unterschieden sich die beiden Arten in der Zahl der korkenzieherförmigen Kernwindungen: Spec. E hat durchschnittlich 19,5, Spec. H. 41,2 Kernwindungen zwischen Akrosom und Mittelstück.

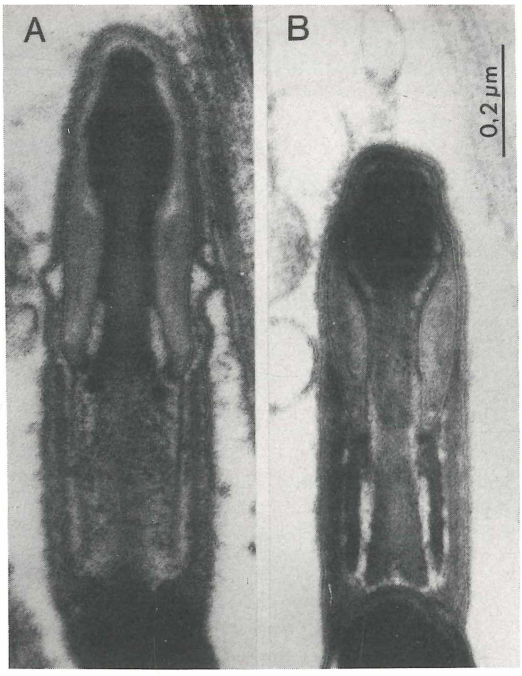

Abb. 2: A-B: Spermienmorphologie. Vergleich der Akrosome. A. *Enchytraeus* spec. E; B. *Enchytraeus* spec. H.

Proteinelektrophorese

Für taxonomische Zwecke geeignete Daten sind aus der vergleichenden Untersuchung einzelner Proteine (Isoenzyme) und aus dem Gesamtproteinmuster gewonnen worden. In beiden Fällen wurde als elektrophoretisches Trennverfahren überwiegend die Isoelektrische Fokussierung (IEF) in dünnen (0,5 mm) Polyacrylamidgelen mit pH-Gradienten von 4 - 9 benutzt. Als Proben dienten wasser- bzw. pufferlösliche Gesamtextrakte von Einzeltieren.

Untersucht wurden 20 Enzymsysteme mit z.T. jeweils mehreren Loci - insgesamt ca. 35 - die sämtlich für Spec. E und Spec. H typische, ihnen eigene Bandenmuster zeigen. Überschneidungen kommen in keinem Fall vor, so daß jedes einzelne der untersuchten Enzymsysteme diagnostischen Wert besitzt und zur Identifizierung seines Trägers geeignet ist (Abb. 3A-C).

Auch die beiden Gesamtproteinmuster sind spezifisch und erlauben eine eindeutige Identifizierung von Spec. E. und Spec. H. Diese Muster ergeben sich nach IEF unter nativen (Abb. 3E) und auch unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff, 2 % Mercaptoethanol; Abb. 3D). Da auch die Verwendung alkoholfixierter Tiere möglich ist, deren Proteinanteil unter bestimmten Bedingungen wieder in Lösung gebracht werden kann, lassen sich ebenfalls fixierte einzelne Individuen auf diese Weise identifizieren.

Kreuzungsversuche

Bis zu 30 juvenile oder adulte Tiere von Spec. E und Spec. H wurden zusammen in Versuchsgefäßen unter den üblichen Standard-Zuchtbedingungen gehalten. Die Nachkommen dieser Tiere wurden elektrophoretisch auf einige Enzyme - und damit indirekt auf ihren Genotyp - hin untersucht. Kreuzungen zwischen Individuen von Spec. E. und Spec. H kommen danach nicht vor. Die beiden Populationen repräsentieren echte Biospezies.

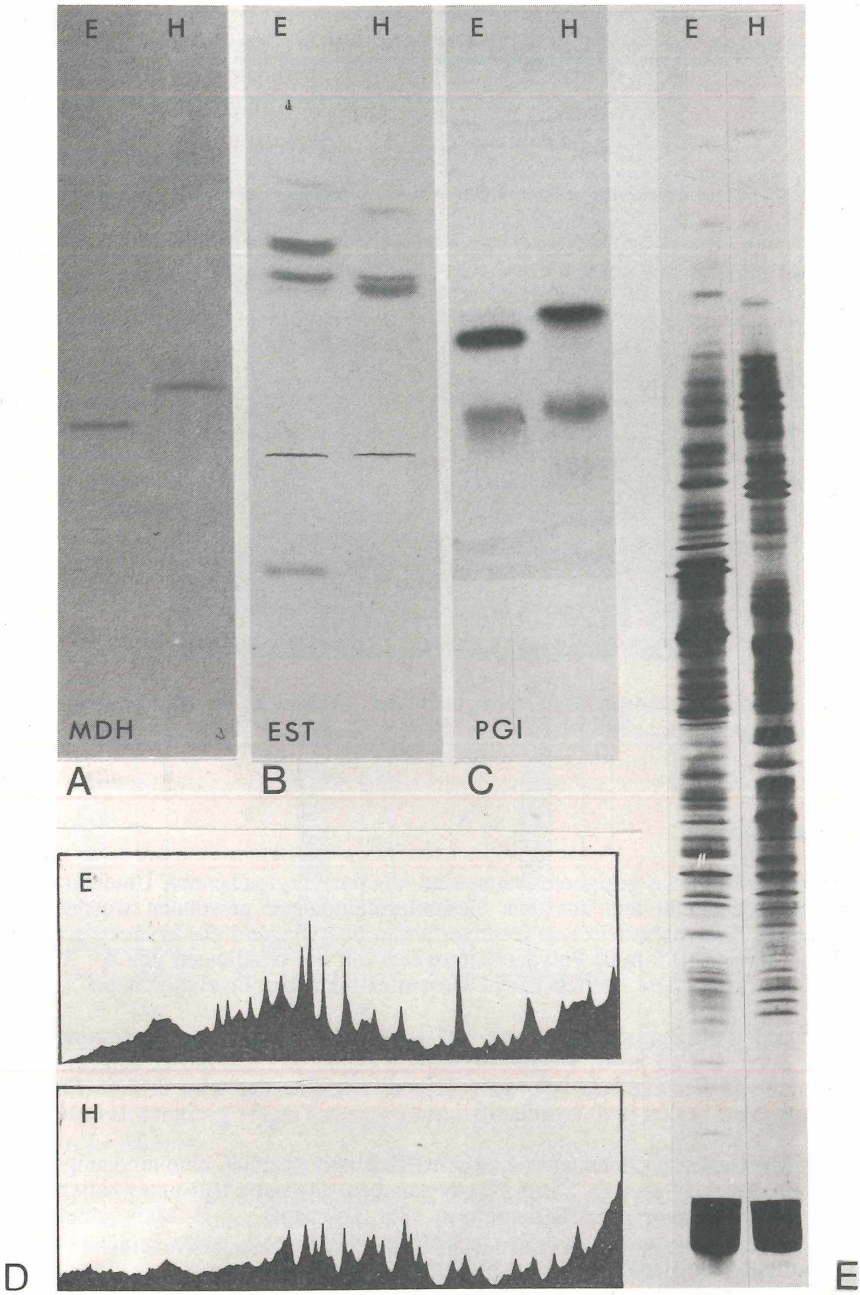

Abb. 3: **A - E:** Proteinelektrophorese von *Enchytraeus* spec. E. und *Enchytraeus* spec. H./ **A - C:** Isoenzymdarstellung der Malatdehydrogenase (MDH), Esterasen (EST), Phosphoglucoisomerase (PGI) nach IEF in 0,5 mm PAA-Gelen; T = 5 %, C = 3%; pH 4-9./ **E:** Gesamtproteinmuster einzelner Tiere bei beiden Arten nach IEF in einem pH-Gradienten von 4-9 (nativ) und anschließender Silberfärbung./ **D:** Umsetzung des Gesamtproteinmusters (siehe E) einzelner Tiere nach IEF in einem pH-Gradienten von 4-9 unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff, 2 % Mercaptoethanol) in ein Scannerprofil.

DISKUSSION

Alle drei vorgestellten Methoden - Vergleich von Lebenszyklusdaten, Vergleich von Ultrastrukturmerkmalen und Vergleich von Proteindaten - ermöglichen die eindeutige Unterscheidung und Identifizierung der beiden Arten, auch wenn sie nicht alle drei in gleichem Maße dazu geeignet sind. Besonders bei den Lebenszyklusdaten, die als Zählergebnisse bei einer größeren Stichprobe annähernd einer Normalverteilung unterliegen können, ergaben sich bei unseren Untersuchungen mehr oder weniger breite Überschneidungen bei der Betrachtung einer größeren Zahl von Arten. Einige dieser Arten sind dann nicht mehr mit Hilfe derartiger Daten voneinander zu trennen.
Lebenszyklusdaten sind für taxonomische Fragestellungen auch deshalb nur mit Einschränkung nutzbar zu machen, weil sie stark von feinen, teilweise nicht registrierbaren Unterschieden in den Kulturbedingungen abhängig sind. Aussagen lassen sich daher wohl immer nur aus direkten Vergleichen übereinstimmender Versuchsserien ziehen. Vergleiche mit Literaturwerten sind nur bedingt möglich.

Die morphometrischen Daten der Spermien zeigen, daß die Unterschiede deutlich und die Standardabweichungen innerhalb der Meßreihen relativ gering sind. Eine Artzuordnung mit Hilfe mehrerer morphometrischer Einzeldaten ist bei den meisten *Enchytraeus*-Arten problemlos möglich. Deutliche Hinweise für die Speziesidentifizierung liefern qualitative Unterschiede in der Spermienstruktur - hier die Form des Akrosoms. Besonders eindeutig sind die diskreten Merkmale der Elektrophoresedaten.

Zusammen mit weiteren neuen Methoden, die im Rahmen des Projekts von anderen Arbeitsgruppen an den Enchytraeen beispielhaft eingesetzt wurden, demonstrieren die hier vorgestellten Verfahren verschiedene Möglichkeiten, sonst schwer zu trennende Arten eindeutig zu charakterisieren und damit für ökologische Arbeiten nutzbar zu machen.

LITERATUR

BETHKE-BEILFUß D., WESTHEIDE W., 1987: Subletale Schädigungen terrestrischer Enchytraeiden (Oligochaeta, Annelida) durch Pflanzenbehandlungsmittel: Veränderungen der Kokonproduktion und der Eifertilität. - Verhdlg. Ges. f. Ökologie 16: 417-422.

GRAEFE U., 1989: Zersetzergesellschaften als Standortzeiger - Vorschlag für ein Klassifikationssystem auf der Grundlage von Zootaxozönosen. - Verh. Ges. f. Ökologie (Osnabrück 1989) Bd. XIX/I (Tagungsführer): 76.

KAIRESALO P., 1978: Ecology of enchytraeids in meadow forest soil in southern Finland. - Ann. Zool. Fennici 15: 210-220.

O'CONNOR F.B., 1967: Enchytraeidae. - Soil Biology, A. Burges, F. Raw (eds.), Academic Press New York: 213-257.

PERSSON T., LOHM U., 1977: Energetical signifcance of soil- and litterinhibiting annelids and arthropods in a Swedish grassland ecosystem. - Ecol. Bull. (Stockholm) 23: 1-211.

PETERSON H., LUXTON M., 1982: A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. - Oikos 39: 287-388.

PHILLIPSON J. et al., 1979: Enchytraeid numbers, biomass and respiratory metabolism in a beech woodland - Whytham Woods, Oxford. - Oecologia 43: 173-193.

RÖMBKE J., 1989: *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a test organism in terrestrial laboratory systems. - Arch. Toxicol., Suppl. 13: 402-405.

WESTHEIDE W., BETHKE-BEILFUß D., HAGENS M., BROCKMEYER V., 1989: Enchytraeiden als Testorganismen. Voraussetzungen für ein terrestrisches Testverfahren und Testergebnisse. - Verhdlg. Ges. f. Ökologie 17: 793-798.

Adresse

V. Brockmeyer
K. Middendorf
Dr. G. Purschke
T. Rötting
Prof. Dr. W. Westheide
Spezielle Zoologie/Fachbereich Biologie/Chemie
Universität Osnabrück
Postfach 44 69
D-W-4500 Osnabrück

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: 19_2_1990

Autor(en)/Author(s): diverse

Artikel/Article: Lebenszyklus-, Ultrastruktur-, Gesamtprotein- und Isownzymmusteruntersuchungen als Methoden der Taxonomie schwer identifizierbarer terrestrischer Enchytraeidenarten (Oligochaeta, Annelida) 290-295