

Identifizierung von DNA-Markern in *Daphnia* Hybrid-Komplexen: RAPD-Analyse

Andrea Ender

Synopsis

Three species *D. galeata*, *D. hyalina*, *D. cucullata*, and their hybrids were examined for inter- and intra-specific variation, using the RAPD method (Random Amplified Polymorphic DNA). Twenty-four primers were tested, and twenty of them revealed clear and reproducible amplification patterns. Eight primers were suited to document species-diagnostic RAPD markers, useful for discrimination of the three species. Species-diagnostic markers allowed the characterization of hybrids into different hybrid categories (i.e., F_1 , F_2 , and backcross hybrids). RAPD data are concordant with morphological traits and allozyme data, but provide more reliable discrimination of hybrid categories.

Daphnia longispina-Gruppe, interspezifische Hybridisierung, RAPD-Marker

Daphnia longispina group, interspecific hybridization, RAPD

Einleitung

Populationsgenetische und evolutionsbiologische Fragestellungen bei Wasserflöhen der Gattung *Daphnia* (Crustacea: Cladocera) können auf fundierte Kenntnisse der Morphologie, Systematik und Ökologie zurückgreifen (siehe PETERS & DE BERNARDI 1987). Natürliche interspezifische Hybridisierung, seit längerem von Taxonomen vermutet (e.g., FLÖSSNER & KRAUS 1986), wurde erstmals bei Populationen aus norddeutschen Seen der *Daphnia longispina*-Gruppe, *D. galeata* (G), *D. hyalina* (H) und *D. cucullata* (C) von WOLF & MORT (1986) mittels Allozymelektrophorese dokumentiert. In der Folge wurden weitere Hybrid-Komplexe dieser Arten im Raum München, der Eifel, den Niederlanden und der früheren Tschechoslowakei beschrieben (GIEßLER 1987; HEBERT et al. 1989; MÜLLER & SEITZ 1993; SCHWENK 1993; SPAAK & HOEKSTRA 1993). Der Nachweis von Introgression – Genaustausch zwischen einer Art zur anderen (oder zwischen genetisch distinkten Populationen) über F_1 - und Rückkreuzungshybride – bedarf der Identifizierung von artspezifischen Markern.

Die bisher vorliegenden Allozymdaten sind nur bedingt geeignet, Arten und Hybride sicher zu unterscheiden. Der Grund liegt in einer zu geringen An-

zahl an diagnostischen Loci, die bei einzelnen Individuen aufgrund ihrer geringen Größe (1–2 mm bei den o.g. Arten) analysiert werden können. Die verwendete RAPD-Methode (WILLIAMS et al. 1990) birgt u.a. den Vorteil, daß sehr geringe DNA-Einsatzmengen (ng-Bereich) ausreichen, genetische Analysen auf Individuumebene durchzuführen. Mit der Identifizierung von nuklearen DNA-Markern können Hybride in verschiedene Hybridklassen (F_1 , F_2 , oder Rückkreuzungshybride) eingeordnet, und das Ausmaß von introgressivem Genfluß studiert werden.

Material und Methoden

Einzelne Klone der Daphnienarten, *D. galeata* ($n = 10$), *D. hyalina* ($n = 6$), *D. cucullata* ($n = 2$) und ihre Hybride ($n = 5$), aus verschiedenen geographischen Regionen (Raum Plön, den Niederlanden, Raum München und Bodensee), wurden im Labor kultiviert. Ausgehend von einem weiblichen Tier entsteht durch parthenogenetische Reproduktion eine *iso-female line*, ein genotypisch identischer Daphnienklon (HEBERT & WARD 1972). Alle Klone waren morphologisch und genotypisch über Allozymdaten charakterisiert.

Die DNA-Isolation von Daphnienklonen (10–20 Individuen) und von einzelnen Daphnienindividuen wurden nach einer Standardmethode durchgeführt (SCHWENK 1993). Die DNA-Ausbeute betrug je nach Probenmenge zwischen 500 bis 1000 ng, bei einer Daphnie bis zu 100 ng. Aufgrund der geringen DNA-Einsatzmenge (1–5 ng) in der PCR war der DNA-Gehalt einer Daphnie für ca. 100 RAPD-Reaktionen ausreichend. RAPD-Bedingungen: Die Reaktion wurde mit dem Thermozykler *GeneAmp* PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus, PEC) durchgeführt. Reaktionsansatz (12.5 μ L): 1 x Amplifikationspuffer (PEC), 0.1 mM jedes dNTP (BM), 3 pmol Primer (Operon, USA), 0.25 U *AmpliTaq*[®] (PEC) und 1–5 ng DNA-Matrize. RAPD-Programm: Vordenaturierung 85°C für 2.30 min, 40 Zyklen je 92°C für 20 s, 38°C für 15 s und 72°C für 1 min (*ramp*: 1.42 min).

Ergebnisse

Nach Optimierung relevanter Reaktionsparameter im RAPD-Ansatz wurden klare reproduzierbare Amplifikationsmuster erhalten. Bei einem *screening* von 24

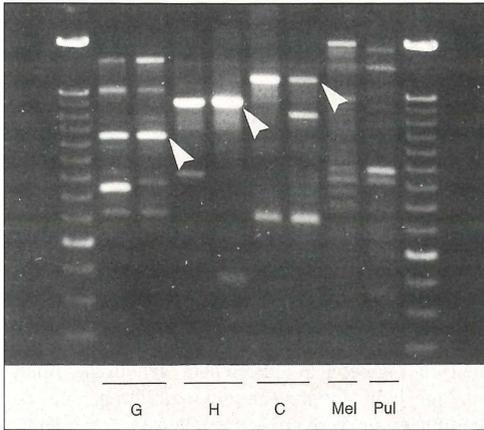


Abb. 1
Beispiel für artdiagnostische RAPD-Marker mit Primer OPC-04 (*D. galeata* = G, *D. hyalina* = H, *D. cucullata* = C). Die Pfeile zeigen auf artspezifische Banden: G = 1150 bp, H = 1400 bp und C = 1650 bp. Außengruppe: *D. pulex* »melanic« (Mel) und *D. pulex* (Pul). Längensstandard 100 bp ladder (Gibco).

Fig. 1
Example of species diagnostic RAPD markers generated with primer OPC-04 (*D. galeata* = G, *D. hyalina* = H, *D. cucullata* = C). Arrows indicate species-diagnostic bands: G = 1150 bp, H = 1400 bp und C = 1650 bp. Outgroup: *D. pulex* »melanic« (Mel) und *D. pulex* (Pul). Size marker: 100 bp ladder.

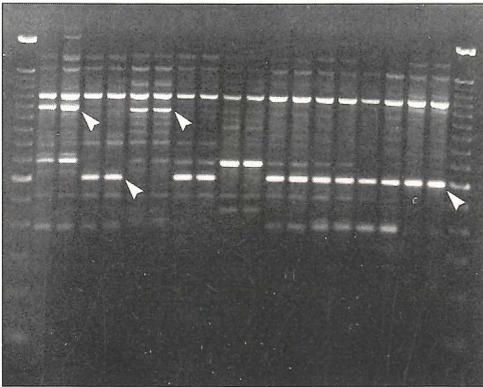


Abb. 2
Darstellung intraspezifischer Variation von neun allopatrischen *D. galeata*-Klonen mit Primer OPB-04 (je 2 Replikate nebeneinander). Die Pfeile zeigen Beispiele für polymorphe Banden. Längensstandard 100 bp ladder.

Fig. 2
The fingerprint patterns, generated with primer OPB-04, demonstrate intra-specific variation for nine allopatric *D. galeata* clones (two replicates for each clone). Arrows indicate examples of polymorphic bands. 100 bp ladder.

Primern ergaben 20 – je nach betrachteter taxonomischer Ebene – informative Muster. Auf interspezifischer Ebene wurden mit 8 Primern insgesamt 42 artspezifische RAPD-Marker detektiert, die eine eindeutige Unterscheidung der drei untersuchten Arten erlauben. Artdiagnostische RAPD-Marker waren in allen untersuchten Klonen innerhalb der jeweiligen Art monomorph (konstant) und fehlten jeweils in den Klonen der verwandten Arten sowie bei der Außengruppe *D. pulex* bzw. *D. pulex* »melanic« (Abb. 1).

Die Untersuchungen zur intraspezifischen Variabilität erbrachten Informationen über klonale Diversität bzw. geographische Variation. Abb. 2 zeigt ein Beispiel für intraspezifische Variation bei neun allopatrischen *D. galeata*-Klonen.

Nach der Identifizierung artdiagnostischer Marker erfolgten RAPD-Analysen der Hybridklone mit den entsprechenden informativen Primern. Hierzu wurden synthetische Hybride erstellt (DNA der Elternarten G + H und G + C zu gleichen Teilen in der PCR-Reaktion). Die RAPD-Fingerprints von synthetischen Hybriden zeigten zu 90% das erwartete, aus beiden »Eltern« resultierende additive Bandenmuster. Diese Methode erlaubt somit eine Identifikation von Hybriden. Die RAPD-Fingerprints der natürlichen G x H-Hybriden weisen prozentual mehr *D. hyalina*-als *D. galeata*-Marker auf. Das Verhältnis bei acht Primern, informativ in bezug auf artdiagnostische Marker, betrug ca. 2:1 (G x H-Hybride: 59% H:32% G, 75% H:25% G und 47% H:33% G).

Diskussion

Die Identifizierung artdiagnostischer RAPD-Marker für die drei untersuchten Arten der *Daphnia longispina*-Gruppe erlaubt eine eindeutige Charakterisierung der Arten und Hybriden auf DNA-Ebene. Die mit Hilfe der artspezifischen Marker bestimmten taxonomischen Identitäten der untersuchten Klone stehen im Einklang mit den morphologischen Befunden und den Allozymdaten. Bisher stand zur Diskriminierung ein begrenztes Potential von zwei Allozym-Markern zur Verfügung (AO, AAT; WOLF & MORT 1986). Mit Hilfe der RAPD-Methode konnte die Zahl artdiagnostischer Marker für *D. galeata* und *D. hyalina* jeweils auf 12 und für *D. cucullata* auf 18 erhöht werden. Für *D. cucullata* gilt die Einschränkung einer zu geringen Stichprobengröße.

Untersuchungen mit synthetischen Hybriden zeigten, daß eine Identifikation von natürlichen Hybriden mittels der RAPD-Methode durchführbar ist. Die untersuchten Hybridklone waren über morphologische Merkmale und Allozymdaten als vermeintliche F₁-Hybride charakterisiert. Dagegen zeigt

ten die Resultate der RAPD-Analyse, daß die G x H-Hybride nicht als F₁-Hybride eingeordnet werden können. Die G x H-Hybride sind möglicherweise Rückkreuzungen von F₁-Hybriden mit der parentalen Spezies *D. hyalina*, da anteilig mehr *D. hyalina*- als *D. galeata*-Marker detektiert wurden. In Verbindung mit definierten Kreuzungsexperimenten wird zukünftig eine genaue Einordnung der Hybride in verschiedene Hybridklassen möglich sein. Damit können Ausmaß und Richtung introgressiven Genflusses erstmals quantifiziert werden.

Dank

Das Projekt wurde mit Unterstützung der DFG (Mo 492/1-2) durchgeführt.

Literatur

- FLÖBNER, D. & K. KRAUS, 1986: On the taxonomy of the *Daphnia hyalina-galeata* complex (Crustacea: Cladocera). *Hydrobiol.* 137: 97–115.
- GIEBLER, S., 1987: Mikroevolution und Populationsgenetik im *Daphnia galeata/hyalina/cucullata*-Komplex (Crustacea: Cladocera), eine Freilandanalyse. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- HADRY, H., BALLICK, M. & B. SCHIERWATER, 1992: Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1: 55–63.
- HEBERT, P.D.N., SCHWARTZ, S.S. & J. HRBACEK, 1989: Patterns of genotypic diversity in Czechoslovakian *Daphnia*. *Heredity* 62: 207–216.
- HEBERT, P.D.N. & R.D. WARD. 1972. Inheritance during parthenogenesis in *Daphnia magna*. *Genetics* 71: 639–642.
- MÜLLER, J. & A. SEITZ, 1993: Habitat partitioning and differential vertical migration of some *Daphnia* genotypes in a lake. *Arch. Hydrobiol.* 39: 167–174.
- PETERS, R.H. & R. DE BERNARDI (eds.), 1987: *Daphnia*. Memorie dell' Instituto Italiano di Idrobiologia. Vol. 45. Verbania, Pallanza.
- SCHWENK, K. 1993: Interspecific hybridization in *Daphnia*: distinction and origin of hybrid matrilines. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1289–1302.
- SPAAK, P. & J.R. HOEKSTRA, 1993: Clonal structure of the *Daphnia* population in Lake Maarsseveen: Its implications for diel vertical migration. *Arch. Hydrobiol.* 39: 157–165.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & S.V. TINGEY, 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are use-

ful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531–6535.

- WOLF, H.G. & M.A. MORT, 1986: Inter-specific hybridization underlies phenotypic variability in *Daphnia* populations. *Oecologia* 68: 507–511.

Adresse

Dipl.-Biol. Andrea Ender
Abt. Ökologie & Evolution, Fachbereich Biologie,
J.W. Goethe-Universität
Siesmayerstr. 70, 60054 Frankfurt am Main.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie](#)

Jahr/Year: 1995

Band/Volume: [24_1995](#)

Autor(en)/Author(s): Ender Andrea

Artikel/Article: [Identifizierung von DNA-Markern in Daphnia Hybrid-Komplexen: RAPD-Analyse 117-119](#)