# Populationsgenetische Analyse von Flußbarschpopulationen mittels DNA-Fingerprinting

Andreas R. Wagner

**Synopsis**
The fragment patterns of 127 perch (*Perca fluviatilis* L.) from three riverine (Mosel, Saar, Spree) and two lacustrine populations were analysed for their between and within genetic differentiation with multilocus DNA-fingerprinting. We were able to detect significant differences between the populations by in their average band numbers. Between riverine and lacustrine populations, the observed genetic differences were larger than within these two groups. This lead to the assumption that the extent of genetic differentiation between perch populations was influenced more by habitat structure than by geographic isolation.

*Flußbarsch (Perca fluviatilis L.), DNA-Fingerprinting, Populationsgenetik, Fluß- und Seepopulationen*

*European perch (Perca fluviatilis L.), DNA-fingerprinting, population genetics, lacustrine and riverine populations*

## 1. Einleitung

Der europäische Flußbarsch (*Perca fluviatilis* L.) ist eine euryöke Süßwasserfischart, die mit Ausnahme sehr schnell fließender Gewässer, alle Gewässertypen einschließlich der Brackwasserbereiche der Ostsee besiedelt (CRAIG 1987). Der europäische Flußbarsch ist von den britischen Inseln, außer der iberischen Halbinsel und Italien, in ganz Eurasien verbreitet.
Die genetische Variabilität einer Art wird auch durch die Variabilität der Umwelt mitbestimmt. Es wird deshalb allgemein angenommen, daß Habitatgeneralisten eine größere genetische Variabilität als Habitatspezialisten besitzen, da erstere ein größeres Anpassungspotential an verschiedene Umweltsituationen besitzen (NEVO & al. 1984). In früheren Untersuchungen zeigte sich aber beim Flußbarsch auf der Ebene des Enzympolymorphismus, untersucht mittels Isoenzymelektrophorese, eine geringe genetische Variabilität (GYLLENSTEIN & al. 1985, KOTSINAS & al. 1988, BODALY 1989, WAGNER 1992).

Mit der Entwicklung neuer genetischer Marker (sog. DNA-Sonden) ist es möglich geworden, die genetische Variabilität direkt auf der DNA-Ebene zu bestimmen (DNA-Fingerprinting). Die dabei ermittelte Variabilität ist häufig um ein vielfaches größer als auf der Proteinebene. Bei Untersuchungen an Flußbarschen aus zwei Seen (KOHLER & SEITZ 1993) mittels DNA-multilocus Fingerprinting zeigte sich jedoch eine sehr große genetische Ähnlichkeit beider Populationen. In der nun vorliegenden Untersuchung soll auf einer größeren geographischen Ebene und in verschiedenen Gewässersystemen nachgeprüft werden, ob diese einfache genetische Strukturierung ein Kennzeichen der Art ist, oder ob es möglich ist, Proben aus unterschiedlichen Habitaten genetisch mit Hilfe des multi-locus Fingerprintings zu differenzieren.

## 2. Material und Methoden

Es wurden insgesamt 127 Individuen aus fünf geographisch isolierten Gebieten, zwei Seepopulationen (Weinfelder Maar, Meerfelder Maar) und drei Flußpopulationen (Saar, Mosel, Spree), untersucht. Die Flußbarsche wurden bei Elektrobefischungen der Gewässer oder mit Stellnetzen gefangen.

Allen Individuen wurde etwa 1,5 ml Blut entnommen und mit ungefähr dem doppelten Volumen APS (Anticoagulant Preservative Solution)-Puffer (ARCTANDER 1988) konserviert.

Die DNA-Extraktion erfolgte aus etwa 0,5–1,0 ml Blut-Puffer-Gemisch nach der Salting-out Methode (MILLER & al. 1988).

Der Restriktionsverdau der DNA erfolgte mit dem Restriktionsenzym Hin*f*I. Nach dem Verdau wurden die Fragmente in einem 0,6 %igen Agarose Gel in 1xTBE für ca. 42 Stunden bei 23 mA und 40 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Denaturierung in Alkali Puffer (NaOH 0,5 mol/l, NaCl 1,5 mol/l) und anschließender Neutralisierung in Ammoniumpuffer ($NH_4Cl$ 1,5 mol/l) wurde die DNA mit einem Southern-Blot auf eine Nylonmembran (Amersham, Hybond N+) übertragen. Die Nylonmembranen wurden für 1 Stunde bei 35 °C prähybridisiert und danach über Nacht mit der Digoxigenin markierten Sonde $(GATA)_4$ (Fresenius AG) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen in Dig-AP Konjugat (Boehringer Mannheim) inkubiert und die hybridisierten Fragmente mit BCIP (5-Brom 4-Chlor 3-Indolyl Phosphat) und NBT ( Nitroblau Tetrazolium Salz) angefärbt.

Die Auswertung der Banden erfolgte mit einem Video-Scanner und dem Fingerprint-Auswerteprogramm Bio-Image V 4.6J (Millipore).

Aus den Blots wurde nach Populationen getrennt die mittlere Bandenzahl und die Band-Sharing-Frequenzen (Bsf) (JEFFREYS 1985) berechnet. Aus den Bsf-Daten wurde anschließend die Populations Ähnlichkeit und der genetische Abstand nach Nei und Lynch berechnet (LYNCH 1991).

Als Vergleich zu den etablierten Methoden wurde eine weitere, von uns entwickelte, Auswertemethode angewendet. Diese beruht nicht auf Band-Sharing-Frequenzen, sondern auf der Häufigkeit von einzelnen Banden in Populationen. Dies wird im weiteren als Bandenhäufigkeit (Bh) bezeichnet. Die Methode beruht auf der Analyse von Banden die in der Summe über alle Populationen mit einer Häufigkeit von größer gleich zehn auftraten. Die Verteilung der Häufigkeit dieser Banden in Prozent wurde als quantitatives Populationsmerkmal zur Berechnung von Chi-Quadrat Distanzen (SNEATH & SOKAL 1973) zwischen den Populationen eingesetzt. Die Clusteranalyse der Distanzen erfolgte mit dem Programmpaket NTSYS-pc V 1.60 (ROHLF 1990).

Tab. 1
**Durchschnittliche Bandenzahl mit Standardabweichung und Zahl der untersuchten Individuen (N)**
Tab 1
**Mean number of bands with standard deviation and number of perch per population investigated (N)**

| | N | ø Zahl der Banden ± std |
|---|---|---|
| **Saar** | 19 | 24,0 ± 5,5 |
| **Mosel** | 27 | 17,5 ± 2,6 |
| **Spree** | 27 | 21,4 ± 4,2 |
| **Meerfelder Maar** | 22 | 27,6 ± 2,7 |
| **Weinfelder Maar** | 32 | 25,8 ± 3,4 |

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Mittlere Bandenzahlen

Die durchschnittliche Bandenzahl der Populationen schwankt zwischen 17,5 Banden/Individuum (Mosel) und 27,6 Banden/Individuum Weinfelder Maar (s. Tab.1). Bis auf das Populationspaar Saar-Weinfelder Maar lassen sich alle Populationen signifikant (Student t-Test) bezüglich ihrer mittleren Bandenzahlen unterscheiden.

### 3.2 Band-Sharing Frequenzen (BSF)

Die BSF-Werte geben Aufschluß über den Grad der genetischen Ähnlichkeit von Individuen innerhalb und zwischen Populationen. Alle BSF-Wert zwischen den Populationen sind auf dem fünf Prozent Niveau signifikant voneinander verschieden (Student t-Test) und können deshalb als echt angesehen werden.

Die höchsten BSF-Werte finden sich in den isolierten Eifelmaaren, die geringsten in der Spreepopulation. Alle BSF-Werte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

### 3.3 Populationsähnlichkeit und genetischer Abstand

Die größte genetische Ähnlichkeit findet sich innerhalb der Großgruppen der Flußpopulationen und der Seepopulationen. So beträgt die durchschnittliche Populationsähnlichkeit nach Lynch innerhalb der Flüsse 0,93, innerhalb der Seen 0,96 und zwischen beiden Gruppen 0,85 (Tab. 3).

Genau wie die Populationsähnlichkeiten verhalten sich die genetischen Abstände (Tab. 4). Der durchschnittliche genetische Abstand innerhalb der Flußpopulationen nach Lynch beträgt 0,061 (nach Nei 0,275), innerhalb der Seepopulationen nach Lynch 0,043 (nach Nei 0,081) und zwischen den

Tab. 2
**Mittlere BSF-Werte mit den korrigierten Varianzen der BSF (x $10^{-3}$) (nach LYNCH 1991) in Klammern**
Tab. 2
**Mean BSF frequencies with biased variances of BSF (x $10^{-3}$) (after LYNCH 1991) in brackets**

| | Saar | Spree | Mosel | Meerfeld | Weinfeld |
|---|---|---|---|---|---|
| **Saar** | 0.33 (2,42) | 0.16 (0,39) | 0.25 (1,04) | 0.30 (1,69) | 0.29 (1,72) |
| **Spree** | | 0.20 (0,31) | 0.17 (0,85) | 0.21 (1,18) | 0.20 (0,85) |
| **Mosel** | | | 0.24 (2,82) | 0.28 (2,39) | 0.26 (2,47) |
| **Meerfeld** | | | | 0.57 (20,16) | 0.51 (7,21) |
| **Weinfeld** | | | | | 0.53 (7,51) |

Gruppen beträgt der durchschnittliche genetische Abstand nach Lynch 0,146 (nach Nei 0,377). Der genetische Abstand zwischen Fluß- und Seepopulationen ist also fast doppelt so groß wie der Abstand innerhalb der Gruppen See und Fluß. Die UPGMA Clusteranalyse der Nei-Distanzen (Abb. 1) zeigt diese Zweiteilung deutlich, gibt aber auch darüberhinaus noch die geographische Beziehung der Populationen zueinander wieder. Die Spreepopulation liegt getrennt von den südwestdeutschen Populationen im Clusterdiagramm auf einem eigenem Ast.

Alle gefundenen Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten beruhen auf realen Unterschieden der BSF-Werte (s. Abschnitt 3.2).

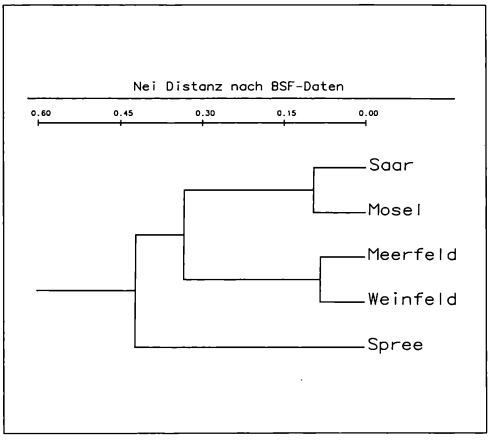


Abb. 1
**UPGMA Clusterdiagramm der genetischen Distanzen nach NEI berechnet aus den BSF-Werten (näheres s. Text)**

Fig. 1
**UPGMA Cluster of NEI´s genetic distances (see text) computed according to LYNCH (1991) from BSF-values**

## 3.4 Bandenhäufigkeit

Die Populationen werden auch durch das Auftreten von diskreten Banden in Individuen charakterisiert. Dabei können regionale Banden aber auch habitatspezifische Unterschiede gefunden werden. So zeigt die Analyse der Verteilung der Häufigkeit der Banden in den Populationen (Bh) ähnliche Muster für jeweils die See- und die Flußpopulationen, aber stärkere Un-

Tab. 3: **Mittlere Populationsähnlichkeiten zwischen allen Populationen nach LYNCH (1991) (rechts oben) und Chi-Quadrat Distanzen der Bandenhäufigkeiten (links unten)**
Tab. 3: **Mean population similarities between all populations according to LYNCH (1991) (above diagonal) and Chi-Square**

| | Saar | Spree | Mosel | Meerfeld | Weinfeld |
|---|---|---|---|---|---|
| **Saar** | | 0.89 | 0.97 | 0.84 | 0.85 |
| **Spree** | 1,03 | | 0.94 | 0.82 | 0.84 |
| **Mosel** | 0,75 | 0,88 | | 0.87 | 0.88 |
| **Meerfeld** | 1.10 | 1,00 | 0,87 | | 0.96 |
| **Weinfeld** | 0,97 | 1,02 | 0,76 | 0,81 | |

Tab. 4: **Mittlerer genetischer Abstand zwischen allen Populationen. Links unten nach NEI, rechts oben nach LYNCH**
Tab. 4: **Mean genetic distances between populations. Above diagonal NEI´s genetic distances, below diagonal LYNCH´s genetic distances**

| | Saar | Spree | Mosel | Meerfeld | Weinfeld |
|---|---|---|---|---|---|
| **Saar** | | 0.105 | 0.029 | 0.153 | 0.143 |
| **Spree** | 0.473 | | 0.050 | 0.174 | 0.163 |
| **Mosel** | 0.094 | 0.259 | | 0.125 | 0.120 |
| **Meerfeld** | 0.377 | 0.472 | 0.279 | | 0.043 |
| **Weinfeld** | 0.377 | 0. 478 | 0.297 | 0.081 | |

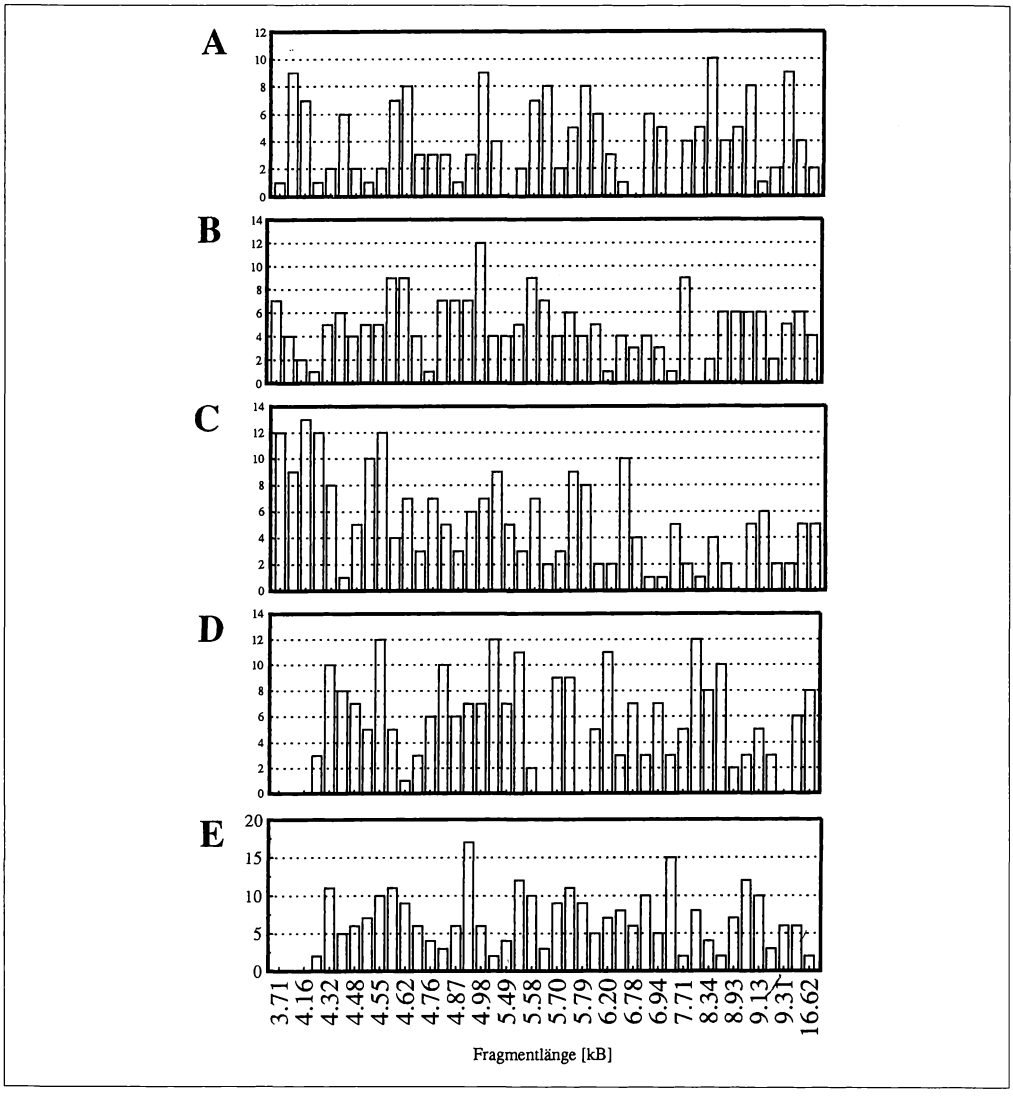


Abb. 2: **Verteilung der häufigen Banden (n > 10) in den einzelnen Populationen. Aufgetragen ist die Häufigkeit der Banden (Bh) gegen die Fragmentgröße in kB. A Mosel, B Saar, C Spree, D Meerfelder Maar, E Weinfelder Maar**

Fig. 2: **Distribution of frequent bands in the populations. The band-frequency is plotted against the fragment length. A Mosel, B Saar, C Spree, D Meerfelder Maar, E Weinfelder Maar**

terschiede zwischen diesen (Abb. 2). Banden, die geographischen Gruppen zugeordnet werden können, finden sich in den Populationen Mosel, Saar, Weinfelder Maar und Meerfelder Maar (8,9 kB Fragmentgröße, Südwestdeutschland). Diese Banden treten nur in jeweils den genannten Populationen auf.

Besonders auffallend ist das Fehlen der Banden im Bereich zwischen 3,7 und 4,2 kB bei den Seepopulationen. Besonders hohe Frequenzen weist im diesem Bandenbereich die Population aus der Spree auf.

Die UPGMA Clusteranalyse der Chi-Quadrat Distanzen (Tab. 4) der Bandenhäufigkeiten sind den Ergebnissen der Analyse der Nei-Distanzen sehr ähnlich (Grafik nicht gezeigt).

## 4. Diskussion

Die genetische Variabilität der Flußbarschpopulationen auf der DNA-Ebene erwies sich als höher als bisher auf Grund von Isoenzymuntersuchungen (GYLLENSTEIN & al. 1985, BODALY & al. 1989) angenommen wurde. Ein Teil eigener enzymelektrophoretischer Untersuchungen (WAGNER 1992) wird jedoch dahingehend bestätigt, daß Seepopulationen des Flußbarsches genetisch sehr einheitlich sind. Dies zeigte sich durch die Analyse der Ergebnisse des DNA-multi-locus-Fingerprintings.

Die betreffenden Populationen sind gekennzeichnet durch hohe Band-sharing-Frequenzen, sowohl innerhalb als auch zwischen Populationen.

Über die Zahl der Banden läßt sich in etwa die effektive Populationsgröße, d.h. die Zahl der reproduktiv erfolgreichen Individuen pro Population, abschätzen (LYNCH 1991). Je größer die durchschnittliche Zahl der Banden pro Population ist, umso größer ist die effektive Populationsgröße. Die geringste Zahl an Banden weisen die Tiere aus der Mosel, die höchste Bandenzahl die Tiere aus dem Meerfelder Maar auf. Unterstellt man die Richtigkeit der oben gemachten Annahme, dann folgt, daß die effektive Populationsgröße in den Eifelmaaren am größten und in der Mosel am kleinsten ist. Dann gilt auch, daß die effektiven Populationsgrößen der Flußpopulationen kleiner sind als die der Seepopulationen. Dies könnte auf eine stärkere Unterteilung der Populationen in Flüssen oder auf hier im Vergleich zu Seen generell niedrigere Populationsdichten hinweisen.

Auch bei der Analyse der Bandenhäufigkeiten (Bh) und der genetischen Ähnlichkeit (LYNCH 1991) der untersuchten Populationen ist die starke Differenzierung der Fluß- und Seepopulationen und die relative Ähnlichkeit derselben innerhalb der Gruppen Fluß und See auffallend.

Eine genetische Differenzierung von drei sympatrischen Forellenformen der Art *Salmo trutta* in Lough Melvin, Irland, die mit multilocus DNA-Fingerprinting detektiert wurde, beschreiben PRODÖHL & al. (1992). Auch hier konnten innerhalb der untersuchten Gruppen höhere genetische Ähnlichkeiten und geringere Variabilität gefunden werden, als zwischen den Gruppen. Die BSF-Werte lagen in vergleichbaren Größenordnungen wie bei der vorliegenden Untersuchung. Es konnten auch gruppenspezifische Fragmente gefunden werden. Bei diesem Beispiel handelt es sich um morphologisch unterscheidbare, sympatrische Forellenpopulationen die in einem See leben. Dies ist bei den Flußbarschpopulationen nicht der Fall, da es sich ja um geographisch isolierte Populationen handelt. Die Unterschiedlichkeit der beiden Gruppen in Bezug auf ihre Fingerprintmuster läßt aber auch den Schluß zu, daß es sich bei diesen um zwei Flußbarschformen handeln könnte, eine See- und eine Flußform. Eine genetische Differenzierung zweier Flußbarschformen (Uferform (Krautbarsch) und Freiwasserform (Jagebarsch)) in einem See wurde bisher zweifach in der Literatur beschrieben (KIRSIPUU 1967, STARMACH 1983), aber kontrovers diskutiert (CRAIG 1987).

Die Unterschiede zwischen den Fluß- und Seepopulationen lassen sich auch durch die unterschiedlichen Eigenschaften von Fließ- und Stillgewässern und eine dadurch bedingte Differenzierung der Populationsstrukturen erklären. Diese kann dann zu der beobachtbaren genetischen Differenzierung geführt haben. Als mögliche Gründe wären hier ein reduzierter Genpool aufgrund eines Gründereffektes, zufällige Drift oder auch eingeschränkter Genfluß aufgrund der isolierten Lage der Seen zu nennen. So konnten auch bei der Süßwassergarnele *Macrobrachium nipponense* (de Haan) signifikante genetische Unterschiede zwischen Fluß- und Seepopulationen beschrieben werden (WONG & MC ANDREW 1994). Ähnlich wie in bei den Flußbarschen wiesen die Flußpopulationen eine größere genetische Variabiliät auf, als Seepopulationen der gleichen Art. Die minimale genetische Distanz zwischen den Flußpopulationen war doppelt so groß, wie die Distanz zwischen Seepopulationen. Auch diese Ergebnisse sind mit den Flußbarschergebnissen vergleichbar.

DNA-Fingerprinting läßt sich also in der Populationsgenetik auch dann erfolgreich einsetzen, wenn auf der Ebene des Enzympolymorphismus keine oder nur sehr geringe Variabilität gefunden wurde.

## 5. Zusammenfassung

Die mit Multilocus-DNA-Fingerprinting erhaltenen Bandenmuster von 127 Individuen aus fünf Populationen, zwei Seepopulationen (Weinfelder Maar, Meerfelder Maar) und drei Flußpopulationen (Saar, Mosel, Spree), wurden auf genetische Differenzierung innerhalb und zwischen den Populationen analysiert. Alle Populationen ließen sich bezüglich der Zahl der gemeinsamen Banden (Band-sharing Frequenzen) zwischen Individuen signifikant voneinander unterscheiden. Fluß- und Seepopulationen waren hinsichtlich verschiedener populationsgenetischer Parameter stärker unterschiedlich als die Populationen der beiden Gruppen untereinander. Das kann bedeuten, daß die Habitateigenschaften (See oder Fluß) entscheidender die Populationsstrukturen beeinflußen und somit eine größere genetische Differenzierung bewirken als die geographische Trennung der Populationen.

## 6. Dank

Die Untersuchung wurde im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs „Austauschprozesse, Kreisläufe und Wirkungen von Stoffen in der Umwelt" an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz durchgeführt. Herrn Prof. Dr. A. Seitz danke ich für die Durchsicht des Manuskripts und zwei anonymen Gutachtern für hilfreiche Hinweise.

## Literatur

ARCTANDER, P. (1988): Comparative studies of avian DNA fragment length polymorphisms analysis: convenient procedures on blood samples from live birds. – J. Orn. 129: 205–216.

BODALY, R.A., WARD, R.D. & MILLS, C.A. (1989): A genetic stock study of Perch, *Perca fluviatilis* L., in Windermere. – J. Fish Biology 34: 965–967

CRAIG, J.F. (1987): The biology of Perch and related fish. – Croom Helm, London. 333 Seiten.

GYLLENSTEIN, U., RYMAN, N. & STAHL, G. (1985): Monomorphism of allozymes in Perch (*Perca fluviatilis* L.). – Hereditas 102: 57–61.

JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. (1985): Individual specific fingerprints of human DNA. – Nature 314: 67–73.

KIRSIPUU, A. (1967): Differences in the protein composition of the blood serum in two forms of perch in the lake Vortsjarv. Eest. NSV Tead. Akad. Toim. Biol. 16(1), 37–40.

KOHLER, U. A. & SEITZ, A. (1993): Populationsgenetische Untersuchungen am Flußbarsch (*Perca fluviatilis* L.) mit Hilfe von DNA-Fingerprinting. Verh. Dt. Ges. Zool. 86.1 (Short com.): 59.

KOTSINAS, A., BARELE, A., KARAKOUSIS, Y. & TRIANTAPHYLLIDIS, C. (1988): Biometrical, cytogenetical and electrophoretical study of Perch (*Perca fluviatilis* L.) from Lake Volvi (Macedonia, Greece). – Proceedings of the 10th Congress of the Biological Society of Greece: 150–153.

LYNCH, M. (1991): Analysis of Population Genetic Structure by DNA Fingerprinting. – In: BURKE, T., DOLF, G., JEFFREYS, A. J. & WOLFF, R. (eds.): DNA Fingerprinting: Approaches and Applications. – Birkhäuser Verlag, Basel: 113–126.

MILLER, S.A., DYKES, D.O. & POLESKY, H.T. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. – Nucleic Acids Res. 16: 1215.

NEVO, E., BEILES, A. & BEN-SHLOMO, R. (1984): The evolutionary significance of genetic diversity and life history correlates. – In: MANI, G.S. (ed.): Evolutionary dynamics of genetic diversity. – Lect. Notes Biomath. 53: 13–213.

PRODÖHL, P.A., TAGGART, J.B., FERGUSON, A. (1992): Genetic variability within and among sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations: multi-locus DNA fingerprint analysis. – Hereditas 117: 45–50.

ROHLF, F.J. (1990).: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 1.60. – Exeter Software, New York.

SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. (1973): Numerical Taxonomy. – Freeman, San Francisco. 573 Seiten.

STARMACH, J. (1983): Electrophoretic separation of blood plasma of perch, Perca fluviatilis, living in the Rybnik and Gozalkowice reservoirs, Poland. Acta Hydrobiologica 24 (3), 283–288

WAGNER, A.R. (1992): Untersuchungen zur Verteilungsdynamik pelagischer Fische in fünf Seen unterschiedlicher trophischer Struktur, unter besonderer Berücksichtigung der Populationsbiologie von Flußbarsch (*Perca fluviatilis* L., Pisces, Percidae) und Rotauge (*Rutilus rutilus* L., Pisces, Cyprinidae). – Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz, 134 Seiten.

WONG, J.T.Y. & MC ANDREW, B.J. (1994): Allozyme variation in riverine and lacustrine populations of Macrobrachium nipponense (de Haan). Aqacult. Fish. Manag. 25: 393–400.

## Adresse

Dr. Andreas R. Wagner
Institut für Zoologie
Abt. Populationsbiologie
Johannes-Gutenberg Universität
Saarstr. 21
55099 Mainz

# 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): Wagner Andreas R.

Artikel/Article: Populationsgenetische Analyse von Flußbarschpopulationen mittels DNA-Fingerprinting 169-174