

# Enzymelektrophoretische Untersuchungen

Objekttyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles =  
Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **77 (1988)**

Heft 1-2

PDF erstellt am: **21.07.2024**

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

benetzten Uferzone knapp über dem Boden bzw. Wasserspiegel in eher schattigen Bereichen. Daß es sich bei den hier beobachteten Individuen tatsächlich um *E. dispar* handelte, konnten wir sowohl morphologisch als auch enzymelektrophoretisch eindeutig nachweisen.

### 3. Enzymelektrophoretische Untersuchungen

#### 3.1. Ziele

Im Kap. 2.2.1. «Taxonomische Abgrenzungen der *E. venosus*-Populationen» haben wir bereits erwähnt, daß in beiden Probestellen die drei nahe verwandten Arten *E. venosus* (FABRICIUS, 1775), *E. torrentis*, KIMMINS, 1942, und *E. dispar* (CURTIS, 1834) gefunden wurden. Die taxonomische Trennung dieser Arten ist morphologisch möglich und durch die enzymelektrophoretischen Untersuchungen von ZURWERRA et al. (1987) und HEFTI et al. (1988) bestätigt worden. Anhand von früheren faunistischen Arbeiten (ZURWERRA et al., 1984) ist in der Umgebung von Freiburg noch eine weitere *Ecdyonurus*-Art zu erwarten. Es handelt sich dabei um *E. forcipula* (PICTET, 1843). Im Gegensatz zu den drei obigen Arten sind sich *E. forcipula* und *E. venosus* sowohl morphologisch als auch in ihrem Lebenszyklus sehr ähnlich. Die enzymelektrophoretischen Untersuchungen von ZURWERRA et al. (1987) und HEFTI et al. (1988) haben jedoch gezeigt, daß eine eindeutige Trennung von Populationen dieser beiden Arten möglich ist. Um eine sichere Artenbestimmung vornehmen zu können, mußten wir folglich auf die enzymelektrophoretische Trennungsmethode zurückgreifen. Die Analysen der Elektrophoresen haben wir im Sinne der Arbeiten von ZURWERRA et al. (1986, 1987) ausgewertet. Es stand uns im weiteren Referenzmaterial von verschiedenen Populationen der Schweiz zur Verfügung.

Mit Hilfe der Enzymelektrophoresen ist es ferner möglich, die intraspezifischen genetischen Variabilitäten einer Population zu bestimmen und diese mit jenen anderer Populationen derselben Art zu vergleichen (FERGUSON, 1980). So können unsere Elektrophoresen Hinweise geben, ob die im Frühjahr 1987 und die im Herbst 1987 emergierten Individuen von *E. venosus* derselben Population oder zwei unabhängigen Populationen angehören.

### 3.2. Material und Methoden

#### 3.2.1. Das Untersuchungsmaterial

In Tab. 5 sind die enzymelektrophoretisch untersuchten Arten, Populationen und Tiere nach ihren Fundorten aufgeführt. Alle Populationen stammen aus der Schweiz. Die Populationen von *E. venosus* werden bei dieser Auflistung in zwei Gruppen – Frühjahr (F) und Herbst (H) – aufgeteilt. Zur Gruppe «Frühjahr» gehören jene Individuen, welche im Mai/Juni 1987 emergierten, zur Gruppe «Herbst» jene, welche im September/Okttober 1987 schlüpfen. Diese Aufteilung ist notwendig, damit die genetischen Relationen zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden können.

Art	Pop. Gr.	Fundorte der untersuch. Populationen	Anzahl Tiere je Population
<i>E. venosus</i>	F	Galtera/Probestelle	33
"	H	Galtera/Probestelle	12
"	F	Saane/Probestelle	55
"	H	Saane/Probestelle	25
<i>E. forcipula</i>		Le Trient/Vernayaz	12

Tab. 5: Liste der enzymelektrophoretisch untersuchten Arten, Populationen bzw. Populationsgruppen und Tiere nach Fundorten (Herkunftsland überall Schweiz). F = *E. venosus*-Individuen, welche im Frühjahr 1987 emergierten, H = *E. venosus*-Individuen, welche im Herbst 1987 emergierten.

#### 3.2.2. Durchführung und Auswertung der Elektrophoresen

Enzymelektrophoretisch untersucht wurden nur Imagines, die bis zur Durchführung der Elektrophoresen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  konserviert wurden. Vor der Durchführung der Elektrophoresen wurden den Imagines die zur morphologischen Bestimmung dienenden Körperteile (Penis, Flügel usw.) abgetrennt. Die einzelnen Individuen wurden größtenteils als reife Nymphen gesammelt und im Labor bis zur Imago gezüchtet. Einige Imagines wurden auch direkt im Feld mit dem Luftnetz aus den Schwärmen eingefangen. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte unter Verwendung adaptierter Standardmethoden (AYALA et al., 1972; SCHOLL et al., 1978, und ZURWERRA et al., 1986, 1987).

Die Auswahl der untersuchten Enzymsysteme geschah nach folgenden Gesichtspunkten:

1. Es soll eine eindeutige enzymatische Trennung der beiden untersuchten Arten – *E. venosus* und *E. forcipula* – möglich sein. Deshalb wurden Enzyme ausgewählt, welche nach ZURWERRA et al. (1987) zwischen diesen Arten eine 100%ige Alledifferenz aufweisen.

2. Um Populationsanalysen durchführen zu können, braucht man polymorphe Enzyme. Innerhalb einer Population treten dabei Enzymloci mit zwei oder mehr Elektromorphen auf. Dadurch besteht die Möglichkeit, daß heterozygote Individuen vorkommen. Auch hier wurde die Wahl der Enzyme aufgrund der Ergebnisse von ZURWERRA et al. (1987) vorgenommen.

Es wurden folgende Enzyme untersucht:

1. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT-1 und GOT-2)  
(E.C. 2.6.1.1),
2. Hexokinase (HK-1 und HK-2)  
(E.C. 2.7.1.1),
3. Malat-Dehydrogenase (MDH-1)  
(E.C. 1.1.1.37),
4. Phosphoglucomutase (PGM)  
(E.C. 2.7.5.1).

Die hier untersuchten Enzymsysteme sowie das Vorgehen bei der Auswertung der Zymogramme, die Berechnung der relativen Mobilitäten der im Zymogramm sichtbaren Enzymvarianten und die Bestimmung der Ähnlichkeitskoeffizienten sind bei ZURWERRA et al. (1985) beschrieben.

### 3.2.3. Berechnung der Heterozygotitäts-Häufigkeit

Die Häufigkeit der Heterozygotität ist ein geeignetes Maß zur Bestimmung der genetischen Variabilität innerhalb einer Population (FERGUSON, 1980). Aufgrund eines Modells, dem das Hardy-Weinberg-Gesetz zugrunde liegt (FERGUSON, 1980), läßt sich eine theoretische Heterozygotitäts-Häufigkeit für einen bestimmten Enzymlocus ( $H_L[t]$ ) voraussagen. Dieser theoretische Wert soll in unseren Populationsanalysen mit der tatsächlich beobachteten Heterozygotitäts-Häufigkeit dieses Locus ( $H_L[b]$ ) verglichen werden. Falls sich die untersuchten Populationen in einem dynamischen Gleichgewicht befinden, sind die theoretischen und die beobachteten Heterozygotitäts-Häufigkeiten sehr ähnlich.

Berechnung der theoretischen Heterozygotitäts-Häufigkeit:

$$H_L(t) = 1 - \sum x_i^2 \quad (\text{FERGUSON, 1980}),$$

wobei  $x_i$  die Frequenz des  $i$ -ten Allels eines bestimmten Enzymlocus darstellt.

Berechnung der beobachteten Heterozygotitäts-Häufigkeit:

$$H_L(b) = \frac{I_m}{I_{\text{tot}}},$$

wobei  $I_m$  der Anzahl heterozygoter Individuen eines bestimmten Enzymlocus entspricht und  $I_{\text{tot}}$  die totale Anzahl (homozygoter wie heterozygoter) Individuen dieses bestimmten Locus angibt.

Gewöhnlich wird die Häufigkeit der Heterozygotität als mittlere (theoretische oder beobachtete) Heterozygotitäts-Häufigkeit aller Loci ( $\bar{H}_L[t]$  oder  $\bar{H}_L[b]$ ) ausgedrückt:

$$\bar{H}_L = \frac{\sum H_L}{n} \quad (\text{FERGUSON, 1980}),$$

wobei  $n$  die Anzahl der untersuchten Enzymloci darstellt.

### 3.3. Resultate

In Tab. 6 sind die untersuchten Populationen mit ihren für die einzelnen Enzyme festgestellten Allelfrequenzen angegeben. Die Populationsgruppierungen wurden nach Tab. 5 vorgenommen.

Die durch paarweisen Vergleich der relativen Mobilitäten und ihrer Frequenzen für alle Elektromorphen bestimmten Identitätskoeffizienten sind in der Korrelationsmatrix dargestellt (Tab. 7).

Um die verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen *E. venosus* und *E. forcipula* sowie zwischen den vier Populationsgruppen von *E. venosus* anschaulich wiedergeben zu können, wurde als Darstellungsform das Dendrogramm gewählt (Abb. 26). Die Konstruktion dieses Dendrogramms beruht auf der «unweighted pairgroup arithmetic average clustering method (UPGMA)» (FERGUSON, 1980).

Art	E. VENOSUS				E. FORCIPULA
	Galtera		Saane		Trient/Vernayaz
	Frühjahr	Herbst	Frühjahr	Herbst	
GOT-1	-----				
101	31	58	7	14	36
105	69	42	93	86	64
GOT-2	-----				
97	86	92	74	77	40
99	14	8	26	23	0
101	0	0	0	0	60
HK-1	-----				
101	0	0	0	0	8
102	100	100	100	100	92
HK-2	-----				
108	100	100	100	100	100
MDH-1	-----				
96	16	42	4	2	42
98	84	58	96	98	58
PGM	-----				
101	0	0	0	0	100
102	89	100	96	94	0
103	11	0	4	6	0

Tab. 6: Allelfrequenzen. Frühjahr = *E. venosus*-Individuen, die im Mai/Juni 1987 emergierten; Herbst = *E. venosus*-Individuen, die im September/Okttober 1987 emergierten.

	E. venosus				E. forcipula
	Saane		Galtera		
	F	H	F	H	
E. venosus/Saane F		100	98	92	75
E. venosus/Saane H			98	93	75
E. venosus/Galtera F				96	74
E. venosus/Galtera H					77
E. forcipula					

Tab. 7: Korrelationsmatrix mit Angabe der Identitätskoeffizienten. Populationsgruppierung siehe Tab. 5.

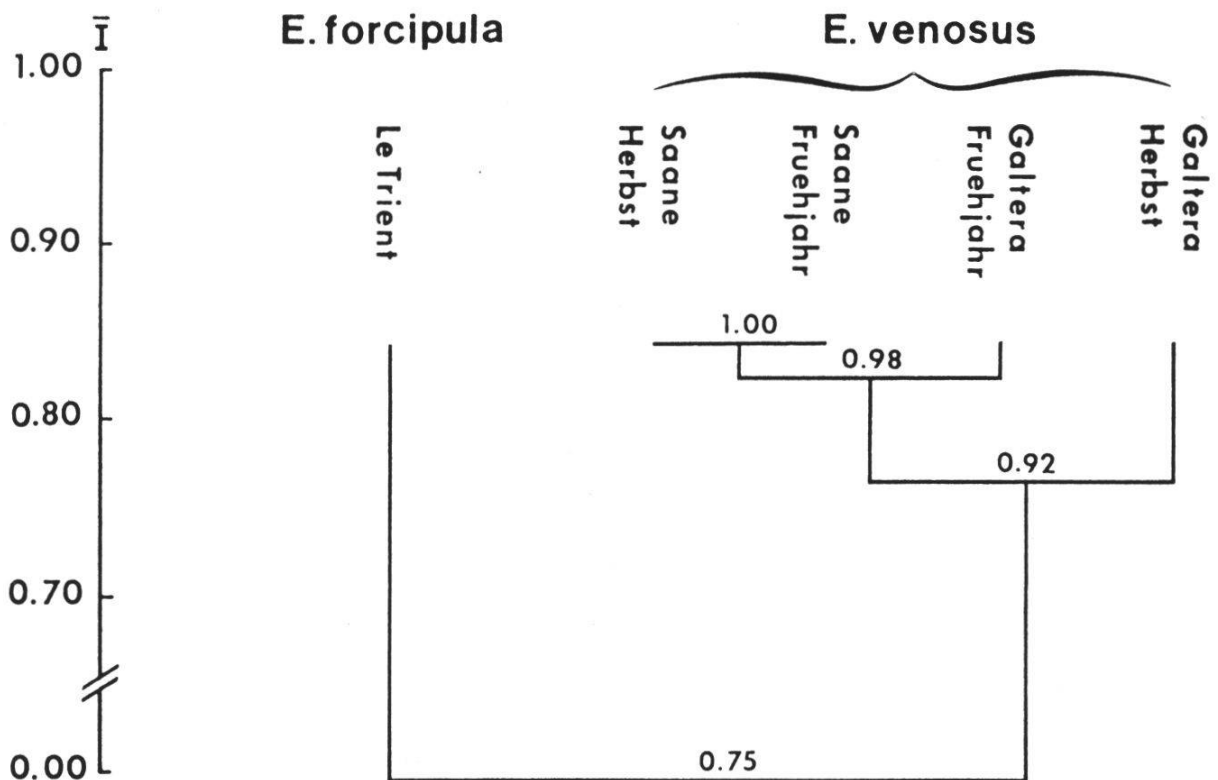


Abb. 26: Dendrogramm der enzymelektrophoretisch untersuchten Populationen von *E. venosus* und *E. forcipula*.

In Tab. 8 sind die theoretischen und beobachteten Heterozygotitäts-Häufigkeiten sowie die Differenz zwischen den beiden ( $|H_L(b) - H_L(t)|$ ) dargestellt. Weiter werden die mittleren theoretischen und beobachteten Heterozygotitäts-Häufigkeiten für die vier Enzymloci und die Standardfehler von  $H_L(b)$  angegeben.

### 3.4. Diskussion

#### 3.4.1. Bestimmung der Arten

Im Dendrogramm (Abb. 26) heben sich die beiden Arten *E. venosus* und *E. dispar* deutlich voneinander ab, wenn sie auch durch einen relativ hohen  $\bar{I}$ -Wert ( $\bar{I} = 0,75$ ) verbunden sind. Wie bereits ZURWERRA et al. (1987) zeigen konnten, besitzt *E. venosus* für die PGM die Elektromorphen 102 (Hauptallelfrequenz) und 103, *E. forcipula* hingegen die Elektromorphe 101 (Tab. 6). Durch diese 100%ige Alleldifferenzierung beim PGM-Locus lassen sich die beiden Arten, im Gegensatz zu morphologischen Methoden, enzymelektrophoretisch eindeutig trennen. Damit ist auch gesagt, daß während der Untersuchungszeit an beiden Probestellen – Galtera und Saane – *E. forcipula* nicht gefunden wurde. An den zwei Probestellen konnten nur *E. venosus*, *E. torrentis* und *E. dispar* nachgewiesen werden.

#### 3.4.2. Populationsanalyse

Bei *E. venosus* wurden vier polymorphe Enzyme erfaßt: GOT-1, GOT-2, MDH-1 und PGM (Tab. 6). Für diese Enzyme wurden erwartungsgemäß heterozygote Individuen gefunden.

Von den insgesamt 16 beobachteten Heterozygotitäts-Häufigkeiten ( $H_L[b]$ ) zeigen 13 eine große Ähnlichkeit mit den aus dem Hardy-Weinberg-Gesetz abgeleiteten theoretischen Häufigkeiten ( $H_L[t]$ ). Große Differenzen zwischen der beobachteten und der theoretischen Heterozygotitäts-Häufigkeit treten nur bei der GOT-1 in den Populationsgruppen Saane/Herbst, Galtera/Frühjahr und Galtera/Herbst auf. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß in diesen drei Gruppen eine Artbildung stattfindet. Jedoch muß nicht jede Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gesetz zur Bildung einer neuen Art führen. Zeitliche Schwankungen im Heterozygotitäts-Gleichgewicht einer Population sind durchaus möglich. Die für die drei Populationsgruppen festgestellten Abweichungen bei der GOT-1 sind zudem statistisch nicht eindeutig abgesichert, da pro Gruppe zu wenig Individuen enzymelektrophoretisch analysiert wurden (Tab. 8).

Hinsichtlich aller anderen Enzymsysteme, einschließlich der GOT-1 der Saane/Frühjahrs-Gruppe, befinden sich jedoch alle vier Populationsgruppen





in einem dynamischen Gleichgewicht. Dies spiegelt sich auch in den geringen Unterschieden zwischen der mittleren beobachteten Heterozyositäts-Häufigkeit ( $\bar{H}_L[b]$ ) und der mittleren theoretischen Heterozyositäts-Häufigkeit ( $\bar{H}_L[t]$ ) wider (Tab. 8).

Innerhalb einer Population tritt immer dann ein dynamisches Gleichgewicht auf, wenn:

- a) die Paarung zufällig erfolgt, d. h. jedes Individuum des einen Geschlechts dieselbe Chance besitzt, sich mit jedem Individuum des anderen Geschlechts zu paaren und umgekehrt (Panmixie),
- b) die Mutationsrate vernachlässigbar gering ist,
- c) keine Migration von Individuen zwischen Populationen stattfindet, d. h. die Population für sich abgeschlossen ist,
- d) keine Gendrift existiert, d. h. keine Allele zufällig und unabhängig von ihrem Selektionswert erhalten bleiben oder verloren gehen,
- e) keine natürliche Selektion herrscht, d. h. kein Allel gegenüber einem anderen Allel desselben Locus überlegen ist und dadurch mit zunehmender Frequenz in der Population vorkommt (FERGUSON, 1980).

Der für jede Populationsgruppe berechnete Standardfehler der beobachteten Heterozyositäts-Häufigkeiten liegt zwischen  $\pm 0,03$  und  $\pm 0,08$  (Tab. 8). Damit unterscheiden sich die mittleren beobachteten Heterozyositäts-Häufigkeiten ( $\bar{H}_L[b]$ ) der einzelnen Populationsgruppen nicht signifikant. Zudem ist der Standardfehler der beobachteten Heterozyositäts-Häufigkeiten innerhalb einer Populationsgruppe jeweils größer als der Standardfehler der mittleren Heterozyositäts-Häufigkeiten der 4 Populationsgruppen; letzterer weist nämlich nur einen Wert von  $\pm 0,0094$  auf! Mit den hier untersuchten vier Enzymen und den relativ wenigen Individuen, die elektrophoretisch getrennt wurden, läßt sich also kein Unterschied in der Heterozyosität zwischen den vier Populationsgruppen feststellen. Dies weist darauf hin, daß an der jeweiligen Probestelle eine Vermischung der beiden Populationsgruppen stattfindet. Eine Trennung in zwei rein univoltine, unabhängige Populationen – eine im Frühjahr emergierende Population (Gruppe A/C, Kap. 2.2.3.) und eine im Herbst emergierende Population (Gruppe B, Kap. 2.2.3.) – ist folglich nicht möglich. Dennoch ist es bemerkenswert, daß die mittleren beobachteten Heterozyositäts-Häufigkeiten ( $\bar{H}_L[b]$ ) der Galtera/Herbst- und Saane/Herbst-Populationsgruppe (= Gruppe B) tiefer liegen als jene der Galtera/Frühjahres- bzw. Saane/Frühjahres-Populationsgruppe (= Gruppe A/C). Diese Feststellung ist insofern interessant, da Organismen, deren Umgebungsfaktoren stabil sind, eine geringere Heterozyosität aufweisen sollten als Organismen derselben Art, deren Umgebungsfaktoren instabil sind (FERGUSON, 1980). Es ist anzunehmen, daß in unserem Fall die im Herbst emergierenden Individuen (Gruppe B), deren Larvalentwicklung in einer kürzeren Zeitperiode (Sommer)

erfolgt als jene der im Frühjahr emergierenden (Gruppe A/C), stabilere Umweltbedingungen vorfinden. Als Beispiel könnte man die Wassertemperatur, einen sehr wichtigen ökologischen Faktor, welcher viele weitere Faktoren beeinflußt, nennen. Die Wassertemperatur bleibt in den Sommermonaten relativ stabil. Zwischen Herbst und Frühjahr, d.h. während der larvalen Entwicklungszeit der im Frühjahr emergierenden Individuen, weist die Wassertemperatur der Fließgewässer jedoch große saisonale Schwankungen auf.

#### 4. Dank

An dieser Stelle möchten wir Herrn Dipl.-Biol. D. Hefti für die fachliche Beratung bei den ökologischen Untersuchungen danken. Frau D. Janke und Frau L. Sygnarski danken wir für die Mithilfe bei der Durchführung der Elektrophoresen, dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für seine finanzielle Unterstützung (Forschungsprojekt Nr. 3.506-0.86).

#### 5. Zusammenfassung – Résumé – Summary

##### Zusammenfassung

Während einer achtmonatigen Untersuchungszeit wurden die *Ecdyonurus venosus*-Populationen (Ephemeroptera, Heptageniidae) von zwei Fließgewässern des Kantons Freiburg (Schweiz), die sich geomorphologisch, topographisch und ökologisch stark unterscheiden, mit autökologischen und enzymelektrophoretischen Methoden untersucht. Die Galtera, die in einem engen V-Tal fließt, wenig flache, strömungsarme Zonen besitzt und stark beschattet ist, wies eine bedeutend niedrigere Populationsdichte auf als die Saane, welche durch weite lenitische Zonen gekennzeichnet ist.

In beiden Fließgewässern konnte eine Emergenzperiode im Frühjahr und eine im Herbst festgestellt werden. Erstaunlicherweise traten aber bereits vor der Herbst-Emergenzzeit junge Larven auf, welche das Nymphenstadium bis Ende des Untersuchungsjahres nicht mehr erreichten und somit erst im folgenden Frühjahr emergieren konnten. Dies bedeutet, daß an beiden Probestellen (Galtera und Saane) je zwei in ihrer Entwicklung zeitlich verschobene *E. venosus*-Populationen vorkommen. Da jedoch die enzymelektrophoretischen Untersuchungen für alle diese Populationen sehr ähnliche genetische Strukturen ergaben, ist es wahrscheinlich, daß sich die beiden Populationen der gleichen Probestelle zum Teil vermischen und somit partiell bivoltin sind. Das Vorkommen jeweils nur einer rein bivoltinen Population, wie sie RAWLINSON (1939) und RIEDERER (1981) beschrieben, muß aufgrund unserer Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Hinsichtlich des Verteilungsmusters der Larven konnte wenigstens für die im Frühjahr schlüpfenden Individuen stets eine gruppierte Verteilung im Benthos nachgewiesen werden. Unter Anwendung des Verteilungsindex  $1/k$  (ELLIOTT, 1977) konnte