

FISCH UND UMWELT

Die Anwendung molekulargenetischer Verfahren in der fischereiwissenschaftlichen Forschung - Trennung von Fischpopulationen

Application of molecular genetic techniques in fishery science – Discrimination of fish populations

Jochen Trautner, Cathrin Schmidt, Institut für Fischereiökologie

Die fischereiwissenschaftliche Forschung hat sich lange Zeit auf die Anwendung klassischer Methoden zur Erforschung der Fischbestände, wie beispielsweise die Beschreibung ihrer Alters- und Längenzusammensetzung sowie Wachstums- und Rekrutierungsdaten, beschränkt. Mit diesen Methoden ist sie jedoch bei der Beschreibung und Trennung von einzelnen Beständen im Sinne von Fortpflanzungsgemeinschaften (Populationen) an Grenzen gestoßen. So ist z. B. die Unterscheidung von Ost- und Nordsee-Kabeljau (*Gadus morhua*), mit klassischen Methoden wie der Analyse morphologischer und morphometrischer Daten selten möglich.

Um Fischbestände aber effektiv bewirtschaften zu können, ist es unumgänglich, dass voneinander getrennte Fortpflanzungsgemeinschaften innerhalb einer Art und deren räumliche und zeitliche Verteilung im Meer erkannt werden. Nur so können Fangquoten, Fanggebiete und auch Schutzgebiete sinnvoll festgelegt werden, ohne dass auf Dauer beispielsweise eine Population überfischt, andere Populationen hingegen vielleicht sogar unterfischt werden.

Die großen Fortschritte, die die molekulargenetische Forschung in den letzten 15 Jahren gemacht hat sowie die Vereinfachung bei der Anwendung molekularbiologischer Methoden, haben dazu geführt, dass diese Methoden auch in der angewandten Forschung der Bundesforschungsanstalt für Fischerei, im Institut für Fischereiökologie, eingesetzt werden. Im Folgenden soll ein Überblick über die eingesetzten Verfahren und ihren Verwendungszweck anhand einiger kurzer Fallbeispiele dargestellt werden.

Die direkte Sequenzierung von Genen

Das Erbinformation höherer Lebewesen, also auch der Fische, die DNA (desoxy-ribonucleic acid), befindet sich im Zellkern und in den Mitochondrien, den "Kraftwerken" der einzelnen Zelle. Auf der DNA ist diese Erbinformation in sog. Genen organisiert, die jeweils die Information für ein bestimmtes Protein speichern. Die

Erbinformation wird durch einen Code, der durch nur vier Bausteine definiert ist, gespeichert: A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin. Die Abfolge dieser vier Bausteine in einem bestimmten Gen variiert zwischen verschiedenen Fischarten, wodurch sich die meisten Arten zweifelsfrei voneinander unterscheiden lassen und letztendlich auch das äußere Erscheinungsbild bestimmen.

Anhand der Größe der Sequenzunterschied lassen sich

Application of molecular genetic techniques in fishery science – Discrimination of fish populations

The discrimination of stocks and separate reproductive units within fish species to facilitate fisheries management based on biological data has always been a challenge to fisheries biologists. We describe the use of three different molecular genetic techniques to detect genetic differences between stocks and closely related species. **Direct sequencing of the mitochondrial ND3 gene describes the relationship between different aquaculture strains and natural populations of rainbow trout and revealed genetic homogeneity within the hatchery strains.** Microsatellite analyses were used to explore the differences between red-fish species from the genus *Sebastes* and to verify populations structure within *S. mentella* and *S. marinus*. This led to an unequivocal discrimination of the species and an indication of populations structure within those species in the North Atlantic. The Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) methodology revealed genetic differences between Baltic and North Sea dab (*Limanda limanda*) and a possible population structure within the North Sea.

Abbildung 1: Ausschnitt aus einem Sequenzgel zur Bestimmung der DNA Sequenz des ND3 Gens bei Regenbogenforellen.

Section of a sequencing gel used to determine the nucleotide sequence of the ND3 gene in Rainbow Trout.



die stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Fischarten beschreiben. So haben nah verwandte Arten sehr ähnliche Sequenzen in dem gleichen Gen. Die Unterschiede zwischen den Genen entstehen durch Mutationen, die sich im Lauf der Zeit innerhalb einer Art weiterverbreitet und manifestiert haben.

In der Fischereiforschung werden sehr häufig Gene des mitochondrialen Genoms dazu verwendet, Verwandtschaftsbeziehungen zwischen- aber auch innerhalb verschiedener Fischarten zu beschreiben, denn auch innerhalb einer Art ist eine Variation in der Sequenz von Genen gegeben.

In einem Forschungsprojekt am Institut für Fischereiökologie wurde mit Hilfe der direkten Sequenzierung des mitochondrialen ND3-Gens (Nikotinamid-Dehydrogenase-Untereinheit 3) die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen einzelnen Herkünften der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* untersucht (Trautner 2000). In Abbildung 1 ist ein Ausschnitt aus der Sequenz des ND3 Gens einer Regenbogenforelle dargestellt, wie es von einem automatischen DNA-Sequenzierapparat geliefert wird. Jede Bande repräsentiert einen DNA-Baustein (Base), die Abfolge der Basen ergibt sich aus den unterschiedlichen Höhen der Banden (von unten nach oben zu lesen).

Bei diesen Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass die aus verschiedenen deutschen Aquakulturbetrieben untersuchten Regenbogenforellen sich sehr ähnlich sind und auf Importe zurückgehen, die sehr wahrscheinlich zum Großteil aus ein- und derselben Gegend in Nord-West-Amerika stammen. Die größte Ähnlichkeit dieser Zuchtpopulationen bestand zu Regenbogenforellen aus dem Fraser-Valley in Britisch Kolumbien, Kanada.

Aus den Ergebnissen konnte weiter abgeleitet werden, dass das genetische Potential bei der Zucht von Regenbogenforellen in der Bundesrepublik noch lange nicht ausgeschöpft ist, da nur sehr begrenztes genetisches Material verwendet wurde, und noch viel Potential für weitere Auslese zucht in natürlichen Populationen vor-

handen ist, was durch die Untersuchung weiterer Wildherkünfte aus Nordamerika bestätigt wurde.

Die Methode der direkten Sequenzierung von Genen ist allerdings zeit- und kostenaufwendig und erlaubt es zudem nicht, sehr nahe verwandte Gruppen von Individuen zu unterscheiden. Es wird nur ein sehr begrenzter Bereich (hier 351 Basenpaare) der immerhin ca. 3 Milliarden Basenpaaren großen DNA untersucht. Mutationen, die auf anderen Bereichen der DNA liegen und Individuen und Gruppen von Tieren vielleicht unterscheiden, können so nicht erfasst werden.

Mikrosatellitenanalysen

Andere DNA-Bereiche, die sich besser für die Unterscheidung von einzelnen Fisch-Populationen, ja sogar von Individuen eignen, sind die sog. Mikrosatelliten, Mikrosatelliten sind kurze DNA-Abschnitte, in denen ein spezifisches Motiv aus 1-6 Basenpaaren tandemartig wiederholt wird. Bezüglich der Anzahl dieser Wiederholungen können diese Mikrosatelliten sich zwischen einzelnen Individuen unterscheiden (es existieren verschiedene Allele). Die Unterschiede in der Anzahl der Wiederholungen sind auf Mutationen zurückzuführen, die im Bereich der Mikrosatelliten weitaus häufiger stattfinden als in den oben erwähnten Genen. Mikrosatelliten kodieren nämlich nicht für Proteine, sondern sind Bereiche in der DNA, deren Veränderung sich nicht drastisch auf den betroffenen Organismus auswirkt, wie dies eine Mutation in einem wichtigen Gen zur Folge haben kann.

Man kann nun die Häufigkeiten der einzelnen Längenvarianten (Allele) dieser Mikrosatelliten innerhalb einer Gruppe von Individuen (z. B. Dorsche aus der Ostsee) bestimmen. Unterscheidet sich die Häufigkeit einer bestimmten Längenvariante signifikant von der Häufigkeit dieser Längenvariante in einer anderen Gruppe (z. B. Kabeljau aus der Nordsee), so kann man davon ausgehen, dass diese beiden Individuengruppen reproduktiv voneinander isoliert leben und nur ein geringer oder kein Austausch genetischen Materials stattfindet. Gäbe es keine solche Trennung, dann dürften sich die Häufigkeiten nicht signifikant voneinander unterscheiden.

In Abbildung 2 sind die DNA Fragmente dargestellt, die einen Mikrosatellitenlocus enthalten, wobei jede Spur von links nach rechts jeweils den Mikrosatellitenlocus eines einzelnen Individuums repräsentiert. Die höher gelegenen Banden zeigen ein längeres DNA Fragment an, also einen Mikrosatelliten mit einer größeren Zahl von Wiederholungen.

Das Auftreten von mehreren Fragmenten wie im Bild (siehe Pfeil) zu sehen, ist auf einen methodischen Fehler zurückzuführen, der in der sog. Polymerasekettenreak-

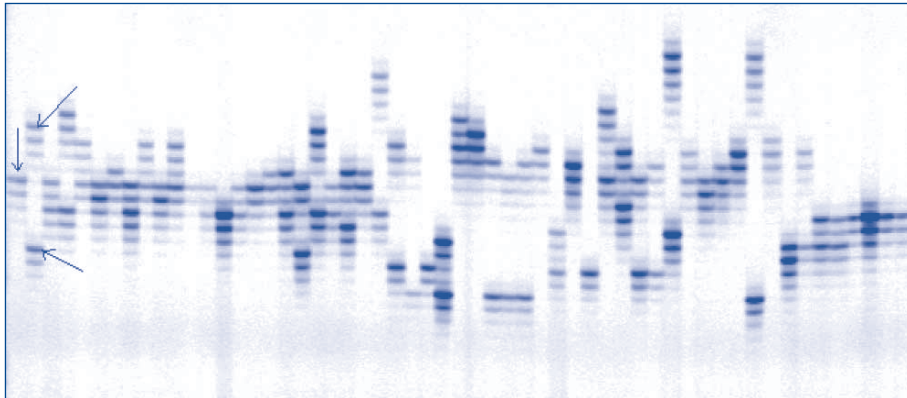


Abbildung 2: Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel mit Mikrosatelliten-DNA von verschiedenen Rotbarschindividuen.
Section of a polyacrylamid gel showing micosatellite DNA of different redfish individuals.

tion entsteht, mit deren Hilfe diese DNA-Abschnitte (hier die Mikrosatelliten) vermehrt werden, um diese sichtbar machen zu können. Treten in einer Spur zwei dieser "Fragmentwolken" auf, so handelt es sich bei dem untersuchten Individuum um ein mischerbiges (heterozygotes) Tier (wie z. B. in Abbildung 2 in der zweiten Spur zu sehen), d.h. es hat von einem Elterntier die eine Längenvariante des Mikrosatelliten, vom anderen die andere Längenvariante geerbt.

Die Mikrosatelliten-Analyse hat sich in der Zwischenzeit zu der am häufigsten verwendeten Methode zur Populationsunterscheidung entwickelt. In Institut für Fischereiökologie wird sie gegenwärtig in einem von der EU finanzierten Rotbarschprojekt eingesetzt, um die verschiedenen Bestände des Nordost-Atlantiks zu beschreiben.

Bei diesen Untersuchungen konnte bis jetzt festgestellt werden, dass es mit dieser Methode sehr gut möglich ist, den Bankbarsch/Großen Rotbarsch (*Sebastes marinus*) und den Tiefenrotbarsch (*Sebastes mentella*) zu unterscheiden.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Unterschiede zwischen den beiden Arten sehr gering sind. So sind nun auch die Schwierigkeiten zu erklären, die häufig bei der Unterscheidung dieser beiden Arten anhand ihres äußeren Erscheinungsbildes entstehen.

Die Mikrosatellitenanalysen ergaben außerdem genetische Unterschiede innerhalb dieser beiden *Sebastes*-Arten: Innerhalb des Gebietes um die Färöer Inseln, Islands und Grönlands konnten zwei genetisch differenzierte Populationen der Art *S. marinus* (Bankbarsch) identifiziert werden. Die Untersuchungen am Tiefenrotbarsch *S. mentella* ergaben ebenfalls signifikante genetische Unterschiede zwischen Proben aus unterschiedlichen Gebieten. Diese Unterschiede waren jedoch im Vergleich

zu den Unterschieden zwischen den zwei Populationen des Großen Rotbarsches relativ schwach ausgeprägt.

Zusammen mit Ergebnissen von direkten Gen-Sequenzierungen des mitochondrialen ND3-Gens (siehe oben) bei diesen Rotbarscharten, kann bereits jetzt gesagt werden, dass es sich bei diesen Arten um stammesgeschichtlich sehr junge Arten handelt. Es ist anzunehmen, dass *S. mentella* als die ursprüngliche Art zu betrachten ist, aus der sich dann *S. marinus*, und die beiden anderen nordatlantischen Arten, *S. fasciatus* und *S. viviparus*, entwickelt haben.

AFLP-Analysen

Bei der „Amplified Fragment Length Polymorphism“ (AFLP, Vos et al. 1995) Methode werden willkürliche Bereiche in der DNA von Fischen auf Unterschiede zwischen einzelnen Individuen untersucht - also nicht wie bei Mikrosatelliten-Analysen und direkten Gensequenzierungen ganz konkrete, vorher ausgesuchte Bereiche. Es werden also willkürlich Bereiche auf sog. Punktmutationen untersucht. Punktmutationen sind einfache Unterschiede von einzelnen Basenpaaren zwischen einzelnen Individuen an der gleichen Stelle des Genoms.

In Abbildung 3 ist ein Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel dargestellt. Jede Spur repräsentiert DNA eines Individuums, jede Bande einen bestimmten Locus. Die Unterschiede zwischen den Individuen sind als fehlende oder vorhandene Banden auf der gleichen Höhe zu erkennen (siehe Kasten).

Der Vorteil dieser Methode ist zum einen, dass man keinerlei Information über diese zufällig ausgewählten Bereiche in der DNA benötigt, und zum anderen, dass man einen sehr großen Teil des gesamten Erbmaterials auf solche Mutationen hin untersuchen kann. Die Nachteile

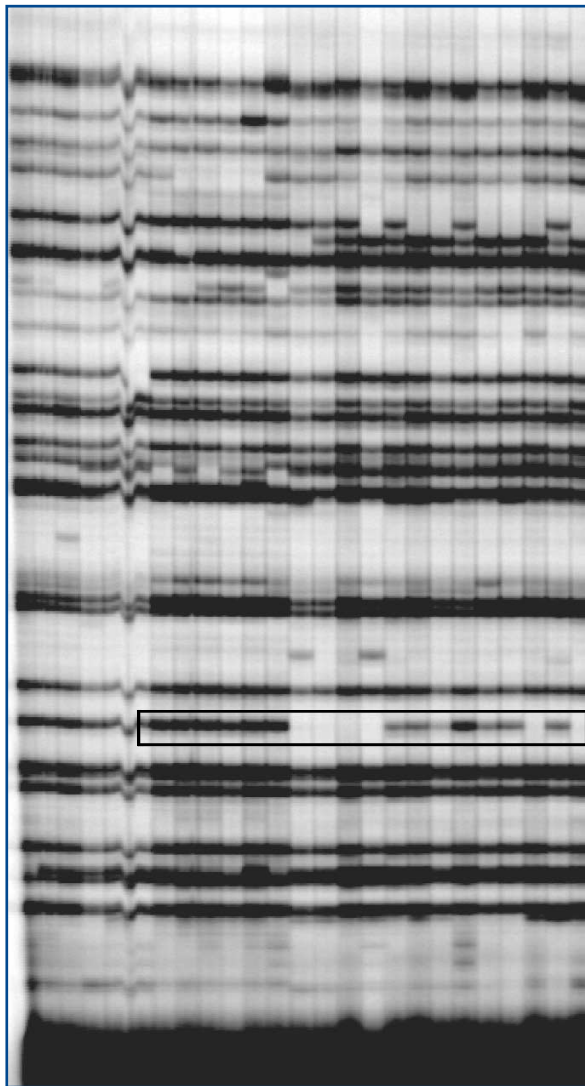


Abbildung 3: Ausschnitt aus einem Polyacrylamidgel mit AFLP-Amplifikationen verschiedener Klieschenindividuen.

Section of a polyacrylamid gel showing displaying AFLP amplifications for several *dap* specimen.

liegen in der kosten- und arbeitsintensiven Durchführung und in der Tatsache, dass für die einzelnen Mutationen nicht zwischen reinerbigen (homozygoten) und gemischterbigen (heterozygoten) Individuen unterschieden werden kann.

Diese Methode wurde an Institut für Fischereiökologie eingesetzt, um Populationsstrukturen bei der Kliesche (*Limanda limanda*) in Nord- und Ostsee zu untersuchen. Diese Untersuchungen gaben einen Hinweis darauf, dass innerhalb der Nordsee zwei verschiedene Populationen vorhanden sein könnten, die sich genetisch voneinander unterscheiden. In Abbildung 4 ist die Verteilung dieser Gruppen dargestellt. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich ebenfalls von Klieschen aus der Ostsee und von Klieschen, die vor der Westküste Norwegens gefunden wurden.

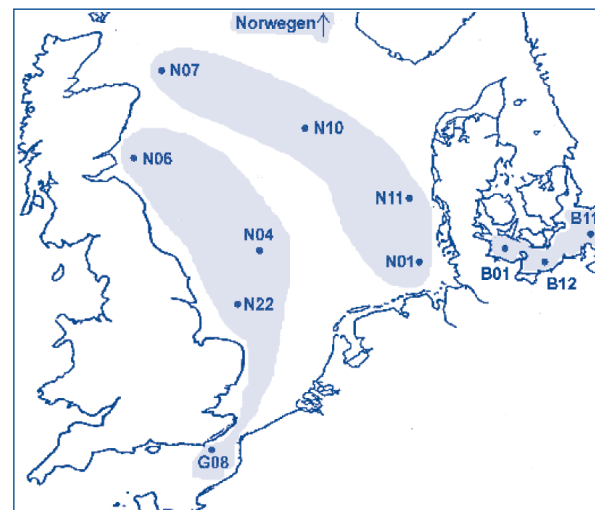


Abbildung 4: Räumliche Verteilung der vier Klieschengruppen, die mit Hilfe der AFLP-Analyse identifiziert werden konnten.

Spatial distribution of the four *dap* groups identified by AFLP-technology.

Die Bedeutung dieser genetischen Strukturen ist noch unklar. In zukünftigen Forschungsansätzen soll versucht werden, diese Verteilungen mit hydrographischen Bedingungen in Verbindung zu bringen, und es soll getestet werden, ob es sich bei der gefundenen Struktur vielleicht nur um einen Jahrgangseffekt handelt - dann sollte diese Struktur ein oder zwei Jahre später so nicht mehr zu beobachten sein.

In Zukunft werden diese und andere molekularbiologische Methoden im IFÖ weiter eine wichtige Rolle spielen. Bei der Erforschung und Überwachung von innerartlicher biologischer Vielfalt in Form von genetischer Variabilität bei Fischarten gibt es keine methodischen Alternativen. Mit diesen Techniken können die Auswirkungen von anthropogenen Einflüssen auf die genetische Vielfalt einer Art untersucht werden, angefangen bei den Auswirkungen der Überfischung einzelner Bestände, dem Einfluss von Schadstoffen, bis hin zur Auswirkung von Schutzmaßnahmen wie Fangverbote und der Einrichtung von Schutzzonen.

Zitierte Literatur

Trautner, J., 2000: Genetische Untersuchungen an Wild- und Zuchtpopulationen der Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss* (Pisces). Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg, 95 S.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; M. Reijans, M.; Lee, T. van de; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M., 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407-4414. □