

Genetische Differenzierung von Characeen

SUSANNE SCHNEIDER, BEATE MANNSCHRECK, MICHAEL BÖGLE &
ARNULF MELZER

Zusammenfassung

Verschiedene Arten der Gattung *Chara* (Charophyceae) wurden mit Hilfe einer genetischen Fingerprinting-Technik (AFLP, amplified fragment length polymorphism) untersucht. Dabei wurden sowohl Beispiele dafür gefunden, dass morphologisch ähnliche Arten auch genetisch ähnlich sind (*C. intermedia* – *C. baltica*), als auch für eine eindeutige genetische Trennung trotz ähnlicher Morphologie (*C. aspera* – *C. galioides*). Für die Unterscheidung zwischen *C. contraria* und *C. vulgaris* zeigte die vergleichende Analyse morphologischer und genetischer Daten, dass Individuen mit gleichförmigen Rindenzellen (isostich) als *C. vulgaris* bestimmt werden müssen.

Abstract

Different *Chara* species were analyzed using a genetic fingerprinting technique (AFLP, amplified fragment length polymorphism). Results showed that on the one hand, species exist that are both, morphologically as well as genetically similar (*C. intermedia* – *C. baltica*), on the other hand also genetic differentiation in spite of similar morphology occurs (*C. aspera* – *C. galioides*). Comparison of genetic and morphologic data of *C. vulgaris* and *C. contraria* showed, that isostichous specimen belong to *C. vulgaris*.

Keywords: *Chara*, Characeae, stoneworts, AFLP, genetics

1 Einleitung

Characeen (Armlauchalgen) sind makrophytische grüne Algen, die sich in Bau und Fortpflanzungsweise von allen anderen Algen unterscheiden (KRAUSE 1997). Sie sind die nächsten heute noch lebenden Verwandten der modernen Landpflanzen (McCOURT & al. 2004). Der Aufbau der Characeen ist hoch differenziert und besteht aus einer mit Rhizoiden verankerten Achse, die alternierend in Nodien und Internodien unterteilt ist. An den Nodien entspringen Quirläste, die ebenfalls aus Nodien und Internodien aufgebaut sind und

an deren Nodien die Gametangien entstehen. Abgesehen von diesem grundsätzlichen Bauplan sind die morphologischen Merkmale der Characeen jedoch hoch variabel. Dementsprechend wird die Systematik der Characeen von Anwendern, die mit der ganzen Bandbreite von Merkmalsausprägungen im Freiland konfrontiert werden, als unzulänglich empfunden. Viele Individuen sind mit den nationalen Bestimmungsschlüsseln nicht eindeutig zuzuordnen. Diese Probleme potenzieren sich auf internationaler Ebene aufgrund unzureichend aufeinander abgestimmter Bestimmungsliteratur, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Bestimmung von Characeen bei Verwendung von Bestimmungsschlüsseln verschiedener Länder zum selben Ergebnis führt. Mit Hilfe genetischer Methoden lassen sich viele Bestimmungsprobleme lösen. Der Grad der Übereinstimmung des Erbmaterials zweier Individuen gibt Auskunft über ihre Verwandtschaft. Auf diese Weise kann zum Beispiel herausgefunden werden, ob morphologisch ähnliche Individuen tatsächlich verwandt sind oder ob ihre morphologische Ähnlichkeit lediglich auf Umwelteinflüssen beruht. Die Kombination von genetischen Analysen mit morphologischen Beschreibungen ermöglicht auch die Ermittlung derjenigen morphologischen Merkmale, die für die Determination der Arten relevant sind. Weiterhin kann überprüft werden, ob morphologisch ähnliche Populationen aus weit voneinander getrennten Orten aufgrund der geographischen Isolation genetische Unterschiede ausgebildet haben. So können zum Beispiel Artbildungsprozesse verfolgt werden.

Unter den Characeen lassen sich zum Beispiel *Chara baltica* und *Chara intermedia* aufgrund morphologischer Kriterien nur unzureichend unterscheiden (KRAUSE 1997). Als wichtigstes Bestimmungskriterium dient hier der Salzgehalt des Habitates. Während *Chara intermedia* bevorzugt im Süßwasser vorkommt, wächst

Chara baltica ausschließlich im Brackwasser. *Chara aspera* und *Chara galioides* unterscheiden sich ausschließlich im Durchmesser der männlichen Fortpflanzungsorgane (Antheridien). Beide Arten können im Mittelmeerraum nebeneinander vorkommen. Da die Art zweihäusig ist, kann ihre Determination in der Praxis erhebliche Schwierigkeiten bereiten.

Chara contraria unterscheidet sich von *Chara vulgaris* in erster Linie dadurch, dass sich bei ersterer die Stacheln auf den etwas erhabenen erscheinenden Haupttrindenreihen befinden, während letztere die Stacheln auf den eingesenkten Nebenreihen aufweist. Da bei manchen Exemplaren die Hauptreihen nicht von den Nebenreihen unterscheidbar sind, ist die Artdetermination auch hier nicht immer eindeutig möglich. Darüber hinaus existieren sowohl von *C. contraria* als auch von *C. vulgaris* Exemplare mit mehr oder weniger unberindeten Ästen. Exemplare mit gänzlich unberindeten Ästen werden als *C. gymnophylla* bezeichnet, Exemplare bei denen auch die Rinde der Sprossachse ganz oder teilweise fehlt, werden zu *C. denudata* gestellt. Zwischen berindeten und unberindeten Exemplaren existiert also eine Reihe von Übergangsformen. Auch hier können genetische Analysen eingesetzt werden, um umweltbedingte Modifikationen von genetischen Unterschieden zu trennen.

2 Material und Methoden

AFLP (amplified fragment length polymorphism) stellt eine bewährte Methode dar, um Unterschiede im Genom innerhalb und zwischen Arten von Characeen aufdecken zu können (MANNSCHECK & al. 2002). Die AFLP-Technik basiert auf der selektiven Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten mittels PCR. Die Fragmente entstehen durch den vollständigen Verdau genomischer DNA mit zwei verschiedenen Enzymen. Adaptoren werden mit Hilfe des Enzyms Ligase mit den Fragmenten verbunden. Anschließend erfolgt die erste Vervielfältigung (Präamplifikation) mit Primern, deren Sequenz sich aus den Adaptoren, der Restriktionsschnittstelle und einer zusätzlichen selektiven Base zusammensetzt. In einem zweiten Vervielfältigungsschritt (Hauptamplifikation)

findet unter Anwendung von Primern mit zwei weiteren selektiven Basen eine erneute Auswahl von Fragmenten statt. Die Primer werden mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert und die Fragmente ihrer Länge nach auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Unterschiede im Bandenmuster werden ausgewertet, die Ähnlichkeit zwischen den Proben berechnet und daraus ein Baum erstellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Mittlerweile liegen AFLP-Ergebnisse von mehreren hundert *Chara*-Proben aus zahlreichen europäischen Ländern vor. Exemplarisch vorgestellt werden an dieser Stelle einige Ergebnisse zu den oben aufgeführten Determinationsproblemen. Die AFLP-Ergebnisse wurden nach dem sogenannten Neighbor-Joining-Verfahren ausgewertet.

C. baltica und *C. intermedia* sind sich nicht nur morphologisch, sondern auch genetisch sehr ähnlich (Abb. 1). Die zusätzliche Analyse von insgesamt 162 Exemplaren der beiden Arten zeigt jedoch, dass sie sich trotz ihrer Ähnlichkeit grundsätzlich voneinander abtrennen lassen (Abb. 2). Die Individuen von *C. baltica* werden auf der Grundlage der AFLP-Ergebnisse jedoch in zwei Untergruppen getrennt (Abb. 2). Eine Untergruppe wird von den Individuen aus der Ostsee gebildet, während die Exemplare aus dem Mittelmeerraum als zweite Untergruppe abgetrennt werden können. Mit einer einzigen Ausnahme spiegelt die Salinität des Habitates die genetische Auftrennung wider. Eine Verkomplizierung tritt jedoch dadurch ein, dass die Individuen von *C. intermedia* aus dem Salzigen See bei Halle, von wo der Typus dieser Art beschrieben wurde, zu *C. baltica* aus dem Mittelmeerraum sortiert werden. Dies würde bedeuten, dass die derzeitige Praxis der Determination von *C. intermedia* nicht mit der ursprünglichen Artbeschreibung übereinstimmt. Weitere Untersuchungen sollen klären, ob dies tatsächlich der Fall ist.

Trotz der Tatsache, dass sich *C. aspera* und *C. galioides* morphologisch ausschließlich im Durchmesser der Antheridien unterscheiden, sind die beiden Arten im Neighbor-Joining-Baum getrennt (Abb. 1). Bislang konnte noch

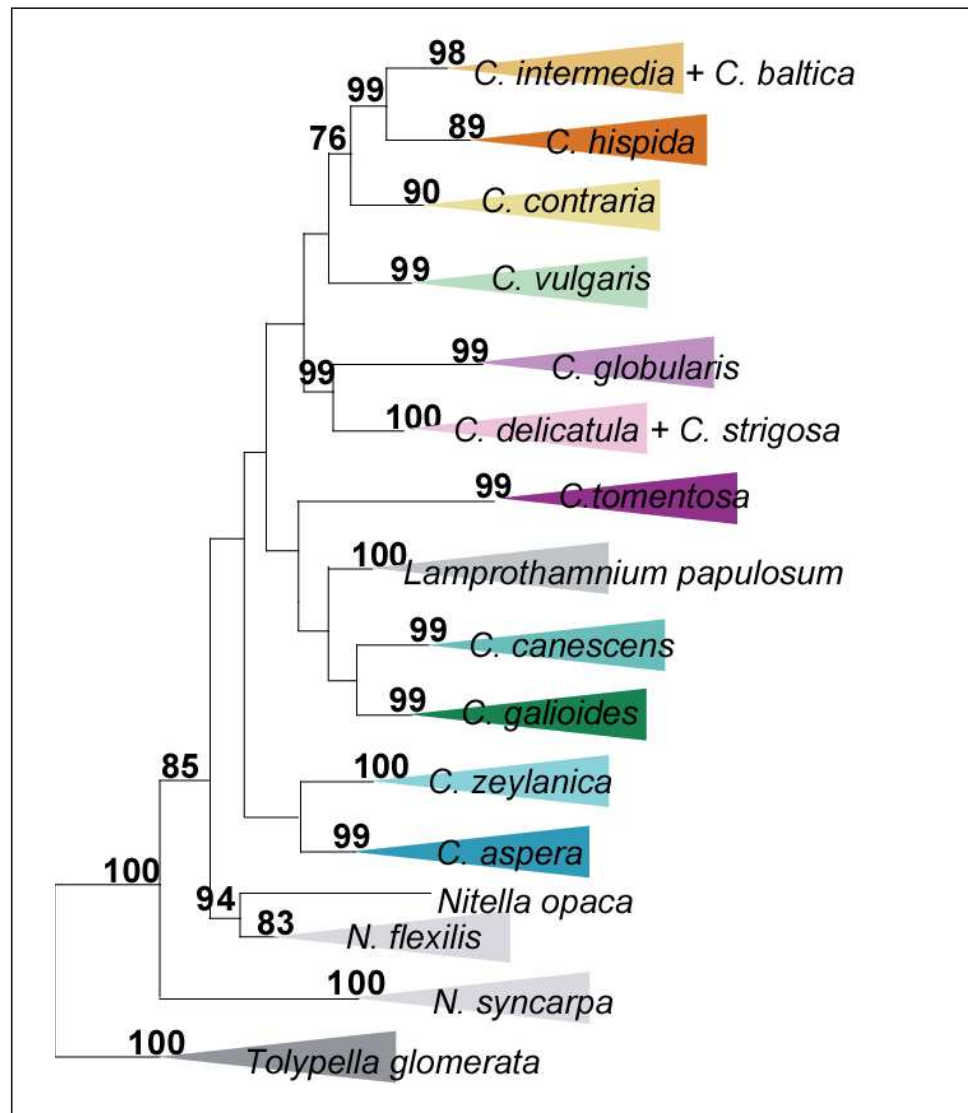


Abb. 1: Neighbour-Joining Baum von 226 Individuen der Familie der Characeae; bootstrap-Werte aus 1000 Wiederholungen; Details zum Neighbour-Joining Verfahren in Saitou & Nei (1987).

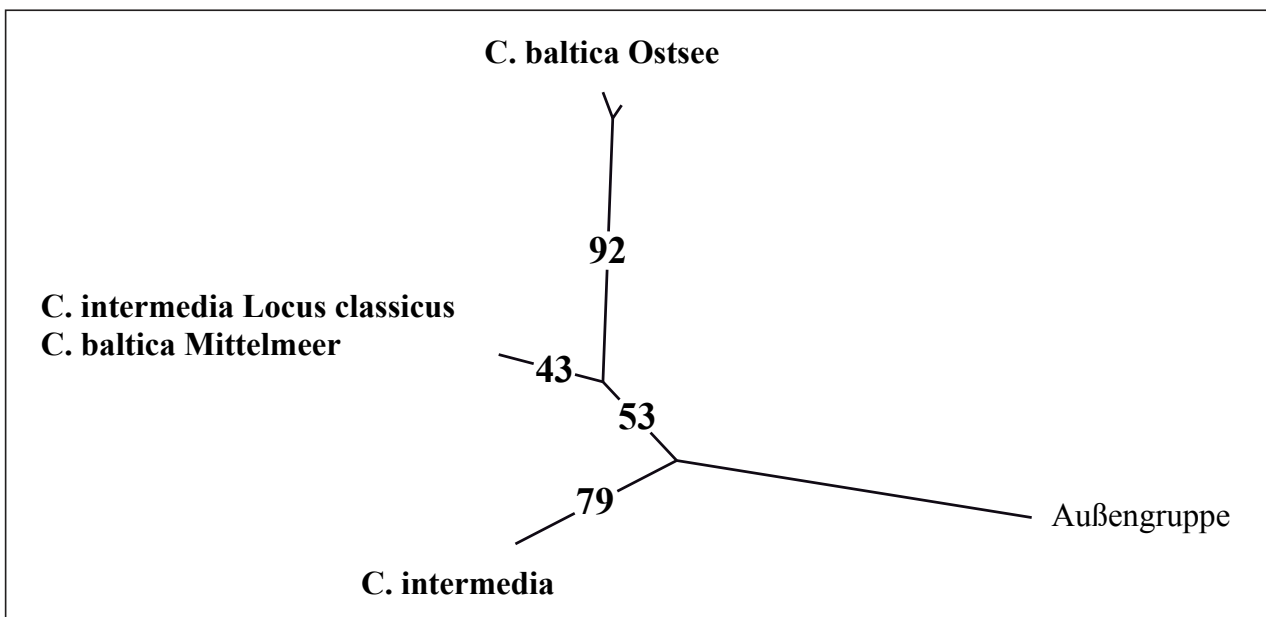


Abb. 2: Ungewurzelter Neighbour-Joining Baum von *Chara intermedia* und *Chara baltica*; bootstrap-Werte aus 2000 Wiederholungen

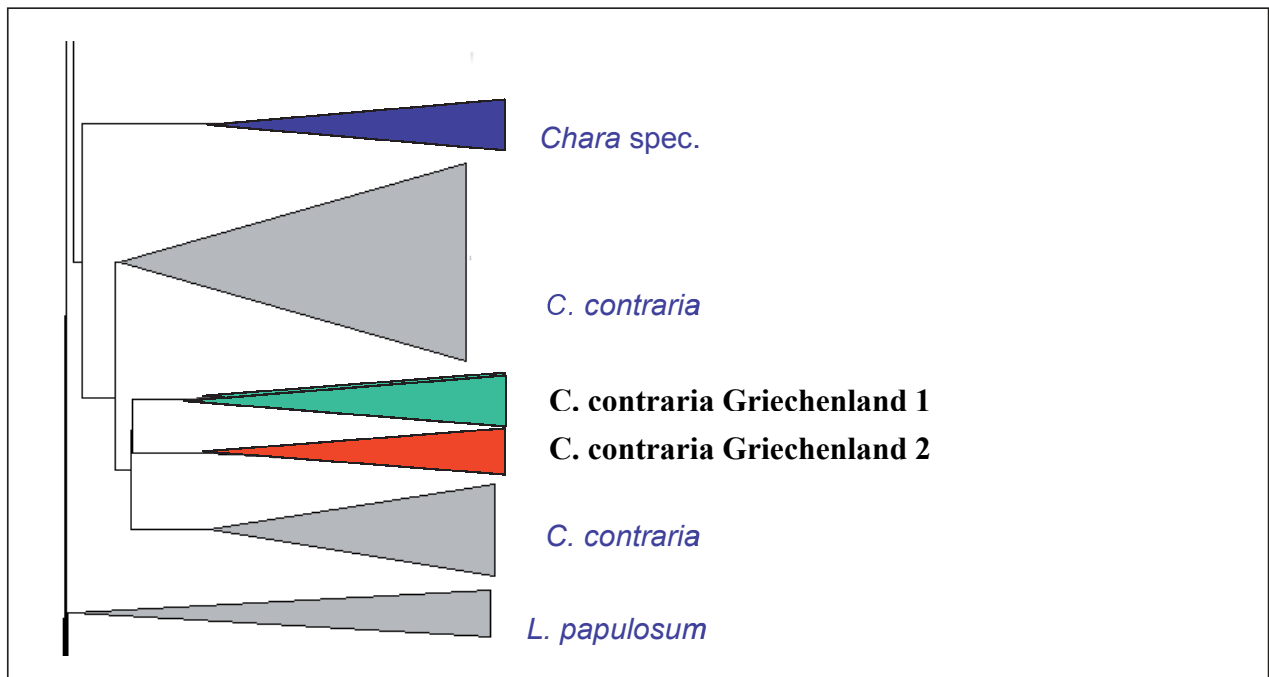


Abb. 3: Ausschnitt aus einem Neighbour-Joining Baum, *Chara spec.* 4 Individuen, *C. contraria* 20 Individuen, *C. contraria* Griechenland 1 und 2 insgesamt 7 Individuen

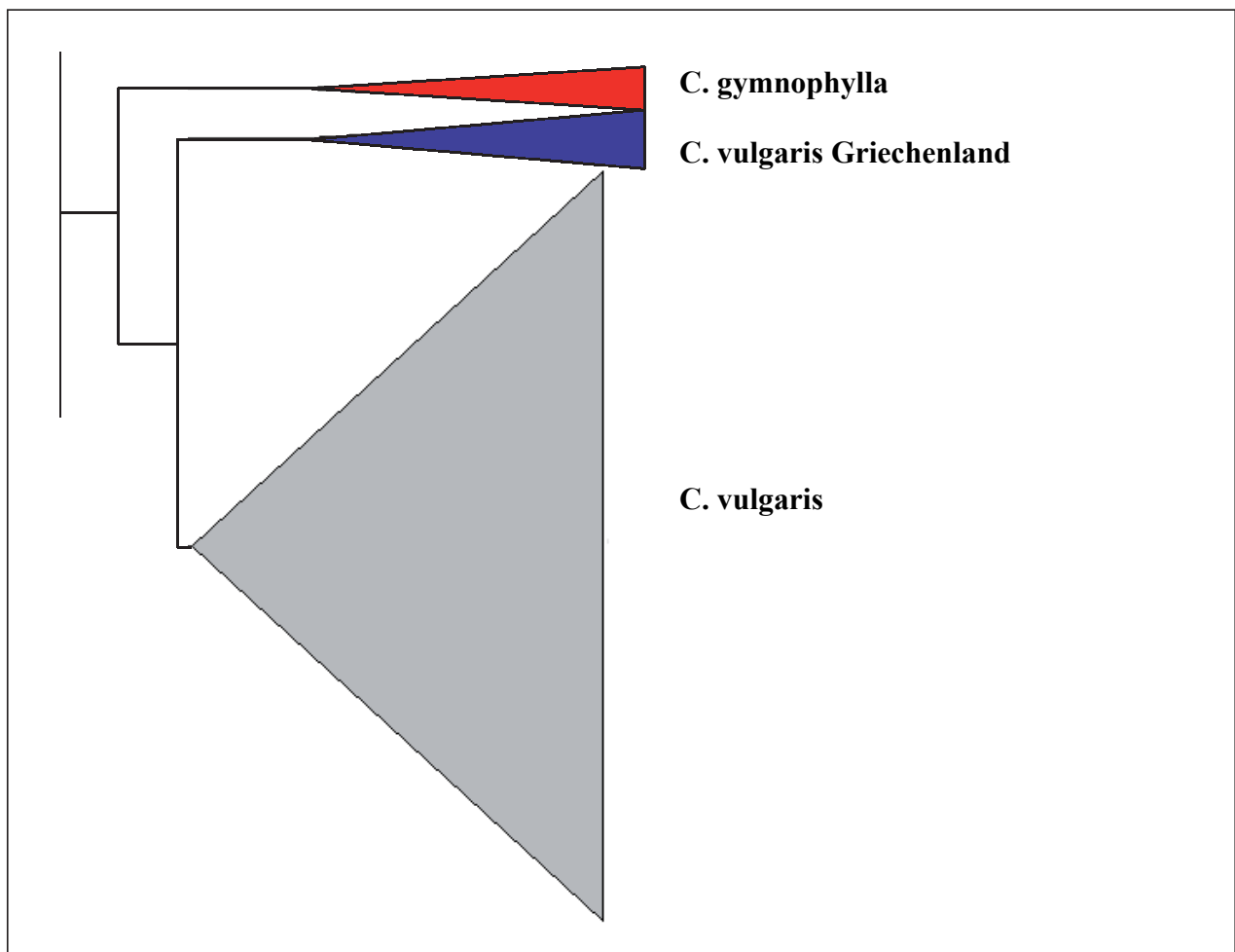


Abb. 4: Ausschnitt aus einem Neighbour-Joining Baum, *C. vulgaris* 45 Individuen, *C. vulgaris* Griechenland 3 Individuen, *C. gymnophylla* 3 Individuen

kein zusätzliches morphologisches Unterscheidungsmerkmal gefunden werden. Die beiden Arten müssen jedoch trotz der Bestimmungsschwierigkeiten weiterhin getrennt behandelt werden, da sie genetisch eindeutig voneinander unterscheidbar sind.

Auch *C. contraria* und *C. vulgaris* lassen sich mit Hilfe der AFLP eindeutig voneinander trennen (Abb. 1). Die Kombination der morphologischen Merkmale mit den AFLP-Ergebnissen zeigte, dass Individuen mit gleichförmigen Rindenzellen (isostich) als *C. vulgaris* bestimmt werden müssen.

Bei zwei Populationen aus Griechenland war unklar, ob es sich um *C. contraria* oder *C. intermedia* handelt. Die Auswertung der AFLP-Ergebnisse ergab eine eindeutige Zuordnung zu *C. contraria* (Abb. 3). Ein weiteres Ergebnis dieser Zuordnung ist, dass die untersuchten Populationen trotz ihrer geographischen Distanz (die übrigen *C. contraria*-Exemplare stammen aus Deutschland und Frankreich) keine abgrenzbare Gruppe bilden, also noch kein Artbildungsprozess eingesetzt hat.

Exemplare einer ebenfalls aus Griechenland stammenden Population weisen eine ungewöhnliche Merkmalskombination auf, die mit den aktuellen Bestimmungsschlüsseln keine befriedigende Artdetermination zulässt (diplostich und zweihäusig, Färbung, Größe und Ökologie der Pflanzen sprechen jedoch eindeutig gegen ihre Bestimmung als *C. tomentosa*). Die vorab vom Sammler der Characeen (U. Raabe) aufgrund der morphologischen Merkmale geäußerte Vermutung, dass es sich hierbei um eine neu zu beschreibende Art handelt, wird durch die Ergebnisse der AFLP gestützt (Abb. 3), da diese Probe (*Chara spec.*) zu keiner von uns bisher untersuchten Art sortiert wurde, sondern einen neuen Ast bildet.

Eine aus Griechenland stammende Probe von *C. vulgaris* wurde von außen zu den aus Deutschland, Schweden, Polen und Frankreich stammenden Proben dieser Art sortiert (Abb. 4). Dies weist auf geringe Unterschiede im Genom und eine eventuell stattfindende Artbildung hin. Die Untersuchung weiterer Populationen aus Griechenland soll klären, ob dies tatsächlich der Fall ist.

Eine ebenfalls aus Griechenland stammende Population wies eine isostiche bis schwach

thylacanthen Berindung der Sprossachse bei gleichzeitig unberindeten Ästen auf. Diese als *C. gymnophylla* bestimmten Proben werden von außen an den von *C. vulgaris* gebildeten Ast sortiert. Dies bedeutet, dass diese Individuen zwar genetisch sehr ähnlich zu *C. vulgaris* sind, jedoch dennoch von dieser Art abgetrennt werden können. Dementsprechend könnten unberindete Exemplare als eigene Art behandelt werden. Weitere Untersuchungen von unberindeter Individuen sollen klären, ob dieses vorläufige Ergebnis generalisierbar ist. Mit Hilfe der AFLP ist es möglich, auch Individuen mit unvollständig ausgeprägten Merkmalen zuzuordnen. Dies soll jedoch nicht dazu führen, dass eine Bestimmung von Characeen in Zukunft nur mit Hilfe genetischer Analysen möglich sein wird. Genetische Analysen dienen uns als ein Werkzeug, mit dem umweltbedingte Modifikationen von genetisch fixierten Merkmalen getrennt werden können. Auf der Grundlage der genetischen Analysen werden dann die Bestimmungsmerkmale der Characeen gegebenenfalls angepasst.

4 Danksagung

Die Projekte werden von der DFG und der Margarete Ammon Stiftung finanziert. Ein besonders herzlicher Dank geht an zahlreiche Kollegen für die Übersendung von Chara-Material.

5 Literatur

- KRAUSE, W. 1997: Charales (Charophyceae). – In: Ettl, H., Gerloff, J., Hennig, H. Z. & Mollenhauer, D.: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Vol. 18., 202 S.; G. Fischer, Jena & Stuttgart.
- MANNSCHRECK, B., FINK, T. & MELZER, A. 2002: Biosystematics of selected *Chara* species (Charophyta) using amplified fragment length polymorphism. – *Phycologia* 41 (6): 657-666.
- MCCOURT, R., M., DELWICHE, C. F. & KAROL, K. G. 2004: Charophyte algae and land plant origins. – *Trends in Ecology and Evolution* 19 (12): 661-666.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987: The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. – *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Anschrift der Verfasser:

Susanne Schneider, Beate Mannschreck,
Michael Bögle & Arnulf Melzer
Limnologische Station der TU München
Hofmark 1-3
82393 Iffeldorf
susi.schneider@niva.no