

Charakterisierung der Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) mittels genetischer Marker-Unterscheidung zwischen einheimischen und eingebürgerten Tieren

von Prof. Dr. Michael Wink,
Institut für Pharmazie & Molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg

Einleitung

Die Erbinformation aller Lebewesen ist in Form der DNA gespeichert und wird genau von Generation zu Generation weitergegeben. Auch Mutationen, d.h. Austausch von einzelnen DNA-Basen, werden vererbt. Durch die Analyse von Mutationen kann man die Evolutions- und Populationsgeschichte aller Lebewesen analysieren und rückverfolgen. Was für den Archäologen eine Keramikscherbe darstellt, ist für den Evolutionsbiologen die DNA, über deren Basenabfolge man die Vergangenheit rekonstruieren kann.

Alle Tiere haben zwei unterschiedliche Genome: 1. Das Kerngenom mit 1-3 Milliarden Basenpaaren und 2. das mitochondriale Genom mit ca. 16000 Basenpaaren. Beide Genome werden für phylogenetische und phylogeographische Analysen eingesetzt.

Das mitochondriale Cytochrom *b* Gen, das maternal vererbt wird, dient heute als Markergen für einen weiten Bereich phylogenetischer Fragestellungen vom intraspezifischen bis zum intragenerischen Niveau. Die hochvariablen Mikrosatelliten dagegen sind wichtige Kernmarker, die biparental vererbt werden.

Die Europäische Sumpfschildkröte ist genetisch besonders differenziert. Man kann 7 Haplotypen-Linien, die über Sequenzen des mitochondrialen Cytochrom-B-Gens ermittelt werden, erkennen, die sich in weitere Unterlinien aufspalten. Diese Haplotypenlinien entsprechen weitgehend den geographisch getrennten und erkennbaren Unterarten.

Tabelle:

Übersicht über die mitochondrialen Haplotypen der Sumpfschildkröte und ihre geographische Verbreitung

Verbreitungsgebiet der Haplotyp-Gruppen	Haplotyp
Osteuropa, nördliches Asien, Ägäis, Anatolien, Schwarzes Meer	I
Mitteleuropa	II
Italien Sizilien (<i>E. trinacris</i>)	III
Adria, Peloponnes	IV
Westliches Italien, Süd-Frankreich	V
Iberische Halbinsel, Nordafrika	VI
Kaspisches Meer, Iran	VII
Türkei (südl. Anatolien)	VIII

Die in Sizilien vorkommende Form, welche der mitochondrialen Linie III entspricht, wurde aufgrund morphologischer und molekularbiologischer Daten, als neue Art – *Emys trinacris* – beschrieben.

In Mitteleuropa ist die Haplotypenlinie IIa autochthon, d.h. ursprünglich heimisch. Viele der ursprünglichen Vorkommen sind bei uns in den letzten 100 Jahren durch Habitatzerstörung oder Verfolgung erloschen. Da die Sumpfschildkröten gerne von Aquarianern gehalten werden, gibt es viele gekäfigte Tiere, die z.T. aus den Ferien im Mittelmeergebiet oder dem Schwarzen Meer mitgebracht wurden. Vielfach wurden diese fremden (d.h. allochthonen) Tiere bei uns freigesetzt. Dadurch kommt es nicht nur zur Faunenverfälschung, sondern auch zur Vermischung mit den wenigen noch vorhandenen autochthonen Tieren. Daher besteht ein hohes Interesse im Artenschutz, dass nur Sumpfschildkröten in unseren heimischen Gewässern geduldet oder freigesetzt werden, die den Haplotyp IIa aufweisen. Anhand der Bestimmung der mitochondrialen Haplotypen lassen sich also eingeführte allochthone Tiere erkennen und von den ursprünglich einheimischen (autochthonen) Tieren abtrennen.

Da mitochondriale Gene nur in der mütterlichen Linie vererbt werden, könnten Tiere auftreten, die zwar nach der mtDNA in Ordnung sind, aber in der väterlichen Linie eine andere Herkunft hatten. Diese Fälle kann man mittels Mikrosatelliten-Analyse erkennen, da Mikrosatelliten biparenteral, d.h. von Vater und Mutter, vererbt wurden.

Für den Nachweis von Hybridisierungen bzw. Intergradation verschiedener Taxa werden kodominant vererbte nukleäre Marker, wie Mikrosatelliten, benötigt. Mikrosatelliten (auch STR, *short tandem repeats*) bestehen aus kurzen, nicht kodierenden DNA-Abschnitten von 1 - 4 Basen, die sich bis zu 100-mal wiederholen. Sie werden – als genomische DNA-Elemente – von beiden Eltern nach den Gesetzen Mendels vererbt und unterliegen damit einer Rekombination. Da Mikrosatelliten zudem relativ schnell evolvieren und damit sehr variabel sind, sind sie wesentlich höher auflösend als andere Marker; mit ihnen sind sogar Vaterschaftsanalysen möglich. Dies ist gerade bei Schildkröten, welche eine sehr geringe Mutationsrate aufweisen, von großer Bedeutung. Allerdings müssen in Studien anhand von Mikrosatelliten mehrere verschiedene, hochpolymorphe Loci untersucht werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Die Unterscheidung verschiedener Populationen oder Gruppen erfolgt zum Einen über das Vorkommen „populationsspezifischer“ Allele, zum Anderen über die Zusammensetzung und Häufigkeit der vorkommenden Allele. Daher sind für die Zuordnung fraglicher Individuen natürlich entsprechend Referenz-Populationen notwendig, mit denen das in den Individuen vorgefundene Allel-Muster abgeglichen werden kann.

Unsere vieljährigen Untersuchungen zeigen, dass es technisch möglich ist, genetisch reine Sumpfschildkröten zu ermitteln, die für Mitteleuropa autochthon sind. Nur diese Tiere sollten bei uns zur Nachzucht bzw. Freilassung kommen.

Methodisches Vorgehen

Für die genetische Charakterisierung wird DNA benötigt, die man am leichtesten aus Blut isolieren kann. Aber auch Abstriche von der Mundschleimhaut kann man einsetzen, wobei zu beachten ist, dass die Menge an DNA dann relativ begrenzt ist und u.U. nur für wenige Analysen reicht. Tupferproben eignen sich beispielsweise für die Analyse von Schlüpflingen.

Da DNA ein instabiles Molekül ist, das von DNAsen und Mikroorganismen leicht abgebaut wird, müssen die Proben konserviert werden. Dazu werden Blut- oder Tupferproben entweder in 70-80% Alkohol (Ethanol) oder in einem speziellen EDTA-Puffer aufgenommen (kann von uns zur Verfügung gestellt werden). Diese Proben können bei Raumtemperatur trans-

portiert werden und sind im Kühlschrank bei 4°C monatelang haltbar. Wichtig ist eine eindeutige Beschriftung der Proben, die sich nicht ablöst oder abwischen lässt. Am besten eignen sich Klebeetiketten, die mit Bleistift beschriftet und mit Tesafilm an den Röhrchen befestigt werden.

Im Labor wird aus diesen Proben die Gesamt-DNA isoliert und die DNA-Marker mittels PCR (so etwas wie ein molekularer Fotokopierer) millionenfach vermehrt und dann mit speziellen Verfahren analysiert (DNA-Sequenzierung bei mtDNA oder Gelelektrophoresen oder Kapillarelektrophoresen im Falle von Mikrosatelliten). Der Aufwand (finanziell und personell) der Mikrosatellitenanalysen beträgt ein Vielfaches der einfachen DNA-Sequenzierung.

Über diese DNA-Analysen kann man klar überprüfen:

- Artzugehörigkeit
- Unterart- bzw. Haplotypen-Zugehörigkeit
- Reinerbigkeit

Publikationen:

1. Velo-Antón, G., **M. Wink**, N. Schneeweiss & U. Fritz: Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*). Conservation Genetics (in press)
2. Pedall, I., Fritz, U., Stukas, H., Valdeón, A., **Wink, M.**: Gene flow across secondary contact zones of the *Emys orbicularis* complex in the Western Mediterranean and evidence for extinction and re-introduction of pond turtles on Corsica and Sardinia. (Testudines: Emydidae). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. DOI:10.1111/j.1439-0469.2010.00572.x
3. Fritz, U., Ayaz, D., Hundsdörfer, A.K., Kotenko, T., Guicking, D., **Wink, M.**, Cemal V. Tok^f, Kerim Çiçek, M., Buschbom, J.: Mitochondrial diversity of European pond turtles (*Emys orbicularis*) in Anatolia and the Ponto-Caspian Region: Multiple old refuges, hotspot of extant diversification and critically endangered endemics Organisms, Diversity & Evolution 9, 100-114, 2009
4. Pedall, I., Schäfer, H., Fritz, U., **Wink, M.**: Isolation of Microsatellite Markers in the *Emys orbicularis* complex and development of a Multiplex PCR Amplification System. Conservation Genetics 10, 725-727, 2009
5. Joger, U., Fritz, U., Guicking, D., Kalyabina-Hauf, S., Nagy, Z.T., **Wink, M.**: Phylogeography of Western palaeartic reptiles - Spatial and temporal speciation patterns. Zoologischer Anzeiger 246, 293-313, 2007
6. Fritz, U., D. Guicking, H. Kami, M. Auer, D. Ayaz, A. G. Bakiev, A. Celani, A. Cordero Rivera, G. Džukić, S. Fahd, P. Havaš, U. Joger, V. F. Khabibullin, L. F. Mazanaeva, P. Široký, S. Tripepi, **M. Wink**: Mitochondrial phylogeography of European pond turtles (*Emys orbicularis*, *Emys trinacris*) – an update. Amphibia-Reptilia 28, 418-426, 2007

7. Joger, U., D. Guicking, S. Kalyabina-Hauf, P. Lenk, Z. T. Nagy & **M. Wink**: Phylogeographie, Artbildung und postpleistozäne Einwanderung mitteleuropäischer Reptilien. *Zeitschrift für Feldherpetologie*, Suppl. 10, 29-59, 2006
8. Fritz, U., A. Cadi, M. Cheylan, C. Coic, M. Detaint, A. Olivier, E. Rosecchi, D. Guicking, P. Lenk, U. Joger, **M. Wink**: Distribution of mtDNA haplotypes (cyt b) of *Emys orbicularis* in France and implications for postglacial recolonizations. *Amphibia-Reptilia* 26, 231-238, 2005
9. Fritz, U., Fattizzo, T., Guicking, D., Tripepi, S., Pennisi, M.G., Lenk, P., Joger, U., **Wink, M.**: A new cryptic species of pond turtle from South Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Zoologica Scripta* 34, 351-371, 2005
10. Kotenko, T., Zinenko, O., Guicking, D., Sauer-Gürth, H., **Wink, M.**, Fritz, U.: First data on the geographic variation of *Emys orbicularis* in Ukraine: mtDNA haplotypes, colouration and size. *Herpetologia Petropolitana*, N. Ananjeva und O. Tsinenko (Eds). *Russian Journal of Herpetology*, 12, 43-46, 2005
11. Fritz, U., Guicking, D., Lenk, P., Joger, U., **Wink, M.**: When turtle distribution tells European history: mtDNA haplotypes of *Emys orbicularis* reflect in Germany former division by the Iron Curtain. *Biologia* 59, 19-25, Suppl. 14, 2004
12. Lenk, P., U. Fritz, U. Joger, **M. Wink**: Mitochondrial phylogeography of the European Pond Turtle, *Emys orbicularis* (LINNAEUS, 1758). *Molecular Ecology* 8, 1911-1922, 1999
13. Lenk, P., Joger, U., Fritz, U., Heidrich, P. and **Wink, M.**: Phylogeographic patterns in mitochondrial cytochrome b gene of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). First results. *Mertensiella* 10, 159-175, 1998
14. Lenk, P., Joger, U., Fritz, U., Heidrich, P. and **Wink, M.**: Phylogeographic patterns in mitochondrial cytochrome b gene of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). First results. *Mertensiella* 10, 159-175, 1998