

Berichte aus der Biologie

Ulrich Burkhardt

**Species identification of Collembola by means
of PCR-based marker systems**

D 46 (Diss. Universität Bremen)

Shaker Verlag
Aachen 2005

Bibliographic information published by Die Deutsche Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data is available in the internet at <http://dnb.ddb.de>.

Zugl.: Bremen, Univ., Diss., 2005

Copyright Shaker Verlag 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-4498-0

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Inhaltsangabe zu:

Burkhardt, Ulrich (2005): Species identification of Collembola by means of PCR-based marker systems

Die Identifikation und Klassifikation von Organismen ist auf das Vorhandensein von Merkmalen angewiesen, mit denen taxonomische Einheiten wie z.B. Arten von anderen abgegrenzt werden können. Dies ist vor allem bei kleinen Organismen wie etwa Springschwänzen (Collembola) unter Zuhilfenahme rein morphologischer Merkmale nicht immer möglich. Hier kommen zunehmend, sowohl in der Taxonomie als auch in der Phylogenetik, auf DNA-Sequenzen basierende molekulare Merkmale zum Einsatz. Die vorliegende Abhandlung untersucht zwei problematische Collembolen-Artengruppen, die weitverbreitet und von ökologischer Bedeutung sind, bei denen sich aber die Abgrenzung der Arten aufgrund fehlender morphologischer Merkmale oder aufgrund hoher Variabilität schwierig gestaltet, und etabliert ein Spektrum molekularer Methoden für eine rasche und zuverlässige Identifikation.

Nach einem einleitenden Überblick über die Fragestellung, über die untersuchten Organismen, die bisher in der Collembolen-Taxonomie eingesetzten Methoden sowie über deren Grenzen und Probleme werden Methoden vorgestellt, die in der molekularen Taxonomie zum Einsatz kommen und deren Verwendungsmöglichkeiten diskutiert. Die Zusammensetzung der *Isotoma viridis*-Artengruppe (Isotomidae, Entomobryomorpha) wird anhand mitochondrialer DNA-Sequenzen des COII-Gens analysiert und ein Verfahren zur schnellen Artzuordnung einzelner Individuen mittels PCR-RFLP etabliert. Hierbei werden die zuvor nach morphologischen Merkmalen bestimmten Tiere in der auf den COII-DNA-Sequenzen basierenden phylogenetischen Analyse jeweils eindeutig einer Art zugeordnet. Dies gelingt auch bei Individuen, deren morphologische Bestimmung aufgrund hoher Variabilität schwierig war: die PCR-RFLP-Analyse mit mehreren Restriktionsenzymen ermöglicht die Diskriminierung aller vier Arten.

Im weiteren wird die Zusammensetzung des *Protaphorura armata*-Komplexes (Onychiuridae, Poduromorpha) untersucht. Auch hier kann aus Einzeltieren genügend DNA für die nachfolgenden Reaktionen gewonnen werden, doch erweist sich die Isolierung der DNA teilweise als störanfälliger Schritt, da bei den sehr kleinen Tieren (um 1,1 mm Körpergröße) die Gefahr einer Verunreinigung der resultierenden DNA-Sequenzen mit der DNA fremder Organismen zunimmt. Für die phylogenetische Analyse werden die DNA-Sequenzen zweier mitochondrialer Gene (COI, COII) und ein Abschnitt des Kerngenoms (ITS1) eingesetzt. Auch hier lassen sich die Vertreter der Arten, von denen mehrere Individuen untersucht wurden, eindeutig zuordnen. *Protaphorura finata* und *P. armata* lassen sich als eigene Arten abtrennen, weitere untersuchte Arten können aufgrund geringer Individuenzahl nur tendenziell bewertet werden. Im morphologischen Muster intermediäre Individuen scheinen keine eigenen Arten darzustellen. Die ITS1-Kernsequenz bestätigt die Ergebnisse der mitochondrialen Genabschnitte, ergibt aber keine genauere Auflösung. Die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse der *Protaphorura armata*-Gruppe werden im Zusammenhang mit bekannten morphologischen Merkmalen gestellt und aufgrund dieser Analyse diskutiert, welche dieser Merkmale zur Artbestimmung eingesetzt werden können.

Schließlich werden verschiedene Methoden des DNA-Fingerprinting auf Tauglichkeit für eine schnelle und preiswerte Zuordnung von Arten untersucht. Zur Anwendung kommen RAPD, AP-PCR, TE-AFLP und AFLP, wobei nur das letzte Verfahren gute Ergebnisse zeigt. Besonders bei der RAPD- und der AP-PCR-Methode ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, wiewohl ausführlich getestet, schlecht. Das auf dem AFLP-Bandenmuster basierende Phenogramm des *Isotoma viridis*-Komplexes bestätigt im wesentlichen die Gruppenbildungen der auf den COII-DNA-Sequenzen basierenden phylogenetischen Analyse der vorigen Kapitel.

In der zusammenfassenden Diskussion werden die eingesetzten Verfahren, ihre Ergebnisse und die auftretenden Probleme diskutiert, ebenso die Probleme, die bereits bei der Isolierung der DNA aus sehr kleinen Organismen bestehen können und die, wenn sie nicht erkannt werden, zu einer völligen Fehlinterpretation führen können. Die Einsatzfähigkeit und die Vor- und Nachteile dieser Methoden hinsichtlich Zeit- und Materialaufwand werden kritisch hinterfragt und ein Ausblick auf die zukünftige Anwendbarkeit der hier genutzten Methoden wird gegeben.