

Unterscheidung unklarer Morphotypen von *Elodea* spp. durch chemotaxonomische und molekulartaxonomische Methoden

Gross, Elisabeth M., Daniela Erhard, Armin Glaschke & Volker Haid
Limnologisches Institut, Universität Konstanz, 78457 Konstanz
Elisabeth.Gross@uni-konstanz.de

Keywords

Neophyten, submerse Makrophyten, Taxonomie, *Elodea*, Hydrocharitaceae, Wasserpest.

Einleitung

Die neophytische Nuttall's Wasserpest (*Elodea nuttallii* (Planch.) St. John) hat sich seit ihrer ersten Beschreibung 1939 in Belgien in Europa stark ausgebreitet und verdrängt nicht nur heimische submerse Makrophyten sondern auch die ca. 100 Jahre zuvor eingeschleppte Schwesterart *E. canadensis* Michx. (Barrat-Segretain 2001; Simpson 1990; Thiebaut et al. 1997). Beide Arten sind diözisch; in Deutschland kommen überwiegend Pflanzen mit gynözischen Blüten vor. Häufig werden die Pflanzen jedoch nur im vegetativen Zustand angetroffen. Eine hohe phänotypische Plastizität insbesondere von *E. nuttallii* (Simpson, 1988, Vanderpoorten et al. 2000) erschwert dabei eine korrekte Artunterscheidung anhand bisheriger Bestimmungsschlüssel.

Wir haben daher nach Morphologie-unabhängigen taxonomischen Markern gesucht. Eine chemotaxonomische Bestimmung anhand von pflanzlichen Sekundärstoffen, z.B. Flavonoiden, wurde für *Elodea* bereits beschrieben (Mues 1983). Eine molekulartaxonomische Analyse verschiedener Pflanzenarten erfolgt häufig anhand der ITS-Region der nuklearen DNA (White et al. 1990). Wir konnten beide Methoden für *Elodea* anwenden (Erhard, Haid & Gross, in Vorbereitung), allerdings sind diese relativ kostenintensiv und nicht in jedem Labor durchführbar. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war, basierend auf diesen Methoden eine möglichst einfache, kostengünstige und universell einsetzbare Methode der Unterscheidung von *E. canadensis* und *E. nuttallii* zu entwickeln.

Material & Methoden

Insgesamt 78 Proben von *Elodea* spp. aus verschiedenen Gewässern in Deutschland (64), Europa (9) und den USA (5) wurden frisch oder getrocknet (Luft- oder Gefriertrocknung) erhalten und weiter verarbeitet. Bei frischem Material konnte eine Bestimmung anhand gängiger Schlüssel (Casper & Krausch 1980; Simpson 1986) vorgenommen werden. Die verwendeten Methoden können aus Platzgründen hier nur verkürzt dargestellt werden. Eine detaillierte Beschreibung ist auf Anfrage erhältlich.

Chemotaxonomie: (Gefrier)-getrocknetes Pflanzenmaterial wurde zweifach mit 50% Methanol für 2 Std. unter konstantem Schütteln extrahiert und der konzentrierte Extrakt durch HPLC weiter aufgetrennt (RP-C18 Kromasil 250 x 4 mm; Laufmittel A 1% Essigsäure, B Methanol; Gradient 0-20 min 5-60% B, 20-25 min 60-100% B, 25-40 min isokratisch B; Detektion bei 345 nm). Basierend auf den erhaltenen Signalfächern und -höhen wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt (Programm "R", Version 1.6.2, Ihaka & Gentleman 1996).

Molekulare Taxonomie: Pflanzliche DNA wurde laut Herstellerprotokoll mit dem DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) extrahiert. Als molekularer Marker wurde die ITS-Region

der Kern-DNA im Bereich der ribosomalen gene repeats ausgewählt und die gesamte ITS Region mit den Primern ITS1 und ITS4, sowie die ITS2 Region mit den Primern ITS3 und ITS4 mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert (White et al. 1990). Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und über die Fa. GATC Konstanz sequenziert. Ein Alignment der Sequenzen wurde mit der Software BioEdit (Hall 1999) durchgeführt, phylogenetische Stammbäume mit der Software MEGA 2.1 erstellt. Der Längenunterschied der amplifizierten ITS2-Region von ca. 10 bp wurde auf hochauflösenden Elchrom 1200 Gelen (Fa. Elchrom, CH-Cham) analysiert. Ebenso wurde die ITS2-Region einem Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease Cla I (Fa. Roche, Mannheim) unterzogen; die Produkte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel getrennt.

Ergebnisse & Diskussion

Die *chemotaxonomische* Untersuchung der Proben über eine Auftrennung des wässrig-methanolischen Rohextrakts an einer C18-HPLC-Säule ergab drei charakteristische Signale, wobei das dritte Signal aus zwei nicht völlig auftrennbaren Substanzen besteht (Abb. 1).

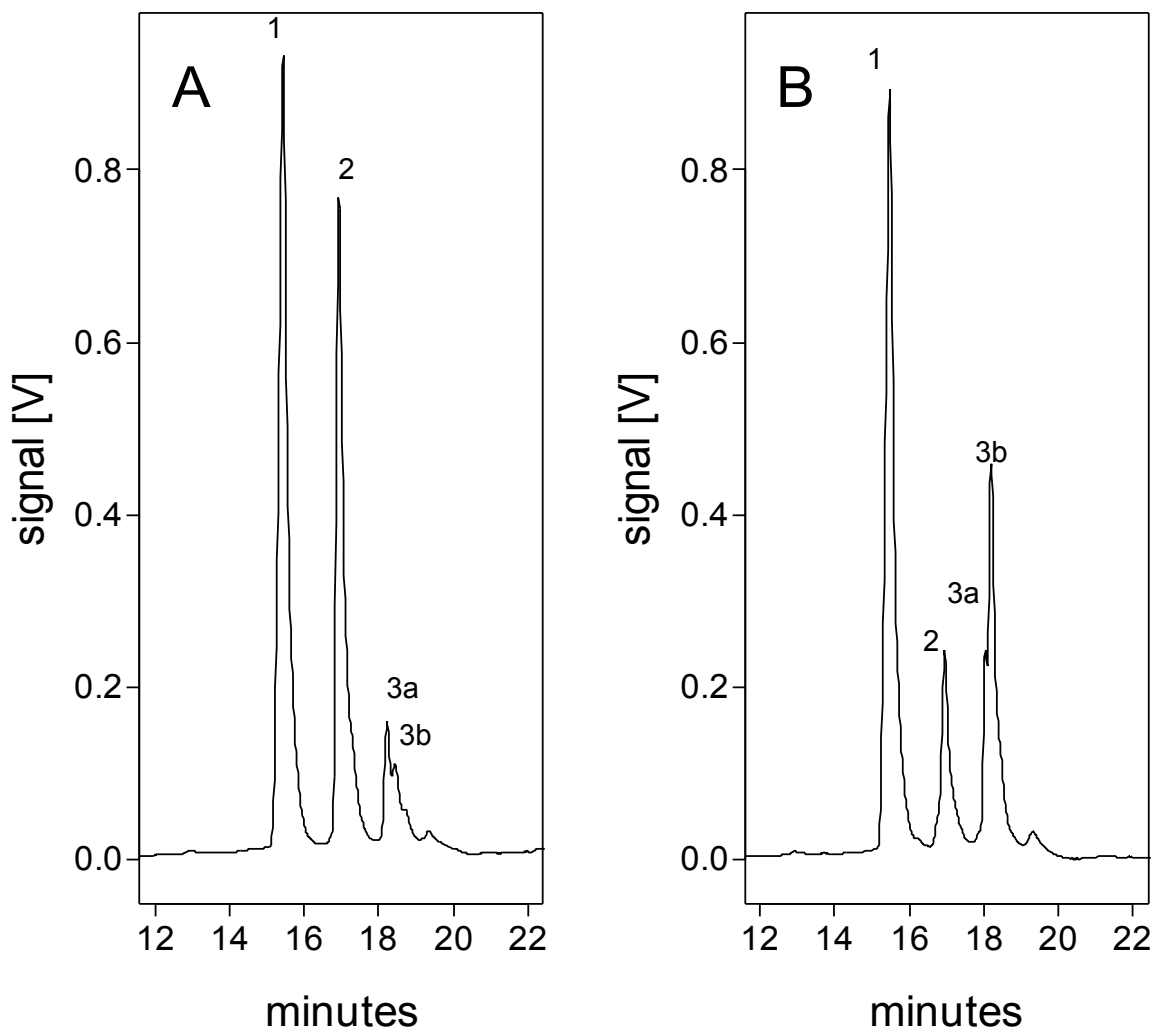


Abb. 1:

HPLC-Chromatogramme von *E. nuttallii* (A) und *E. canadensis* (B). Drei Hauptsignale wurden detektiert (1-3), Signal 3 besteht aus zwei Verbindungen. 1: unbekannter Kaffee- oder Chlorogensäureester; 2-3: 7-O-Diglucuronide Luteolin (2), Apigenin (3a) und Chrysoeriol (3b).

Dabei handelt es sich bei Signal 1 aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften vermutlich um einen bislang nicht identifizierten Kaffee- oder Chlorogensäureester. Signale 2, 3a und 3b sind Flavonoidglykoside. Es zeigte sich, dass es nicht wie von Mues (1983) beschrieben qualitative, sondern nur quantitative Unterschiede im Gehalt der Flavonoid-Diglucuronide gibt. Aufgrund massen- und nuklearresonanzspektroskopischer Untersuchungen durch Dr. Georg Pohnert, MPI für Chemische Ökologie, Jena gehen wir davon aus, dass es sich bei Signal 2 um Luteolin-7-*O*-Diglucuronid und bei dem Doppelsignal 3a/3b um Apigenin- und Chrysoeriol-7-*O*-Diglucuronide handelt. Die Cluster-Analyse ergab eine klare Trennung der Proben (s. Poster unter *Elodea*-Projekt, <http://www.uni-konstanz.de/limnologie/ags/gross/projekte.html>). Weiterhin lässt sich ein einfacher dichotomer Schlüssel basierend auf diesem Merkmal erstellen:

1a	Signalfläche 2 ≤ Signalfläche 3	<i>E. canadensis</i>
1b	Signalfläche 2 > Signalfläche 3	→ 2
2a	Verhältnis Signalthöhe 3a/3b < 0,75	<i>E. canadensis</i>
2b	Verhältnis Signalthöhe 3a/3b ≥ 0,75	<i>E. nuttallii</i>

Molekulare Taxonomie: Die Sequenzen von *E. canadensis* und *E. nuttallii* unterschieden sich in bis zu 36 Nukleotiden der insgesamt ca. 720 bp langen ITS2-Region. Aufgrund dieses Polymorphismus können auch hier beide Arten phylogenetisch deutlich von einander getrennt werden (s. Poster unter *Elodea*-Projekt, <http://www.uni-konstanz.de/limnologie/ags/gross/projekte.html>; Erhard, Haid & Gross, in Vorbereitung). Zudem ist die ITS2-Region von *E. nuttallii* länger als die von *E. canadensis* (281 ± 1 bp vs. 274 ± 1).

Beide Charakteristika konnten zur Entwicklung einfacherer molekularer Methoden zur Artunterscheidung herangezogen werden. Der Längenunterschied der ITS2-Region ließ sich nur auf hochauflösenden Elchrom 1200 Gelen trennen (Abb. 2). Sequenzunterschiede zwischen beiden Arten erlaubten den selektiven Restriktionsverdau der ITS2-Region von *E. nuttallii* mit dem Enzym Cla I in zwei Bruchstücke von ca. 250 und 186 bp, die allerdings auf dem Agarosegel nicht zu trennen waren. Die entstandene Doppelbande (Abb. 3) besteht aus unverdauter ITS2-Region (oben) und den Verdauprodukten (unten). Im Gegensatz dazu wurde die ITS2-Region von *E. canadensis* nicht geschnitten und zeigte eine Bande bei ca. 450 bp im Agarosegel.

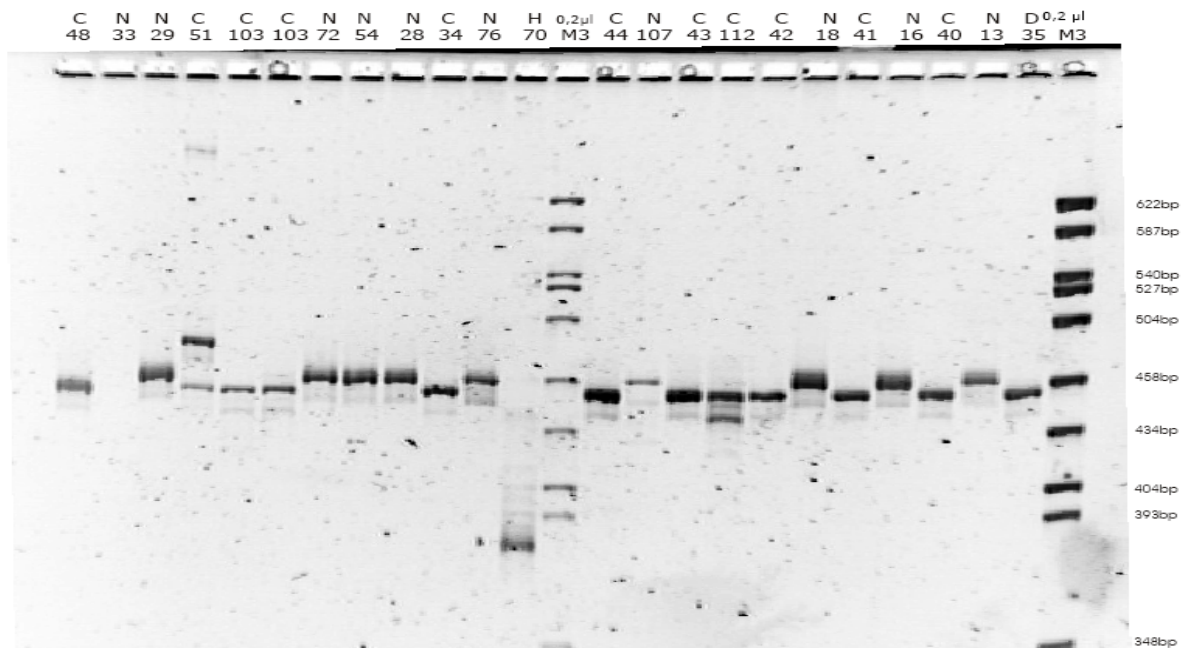


Abb. 2: Elchrom 1200 Gel zur Artbestimmung anhand des ITS2-Längenpolymorphismus. DNA-Leiter M3. Proben: C – *Elodea canadensis*, N – *E. nuttallii*, H – *Hydrilla verticillata*, D – *Egeria densa*. Nummern geben Probennr. an.

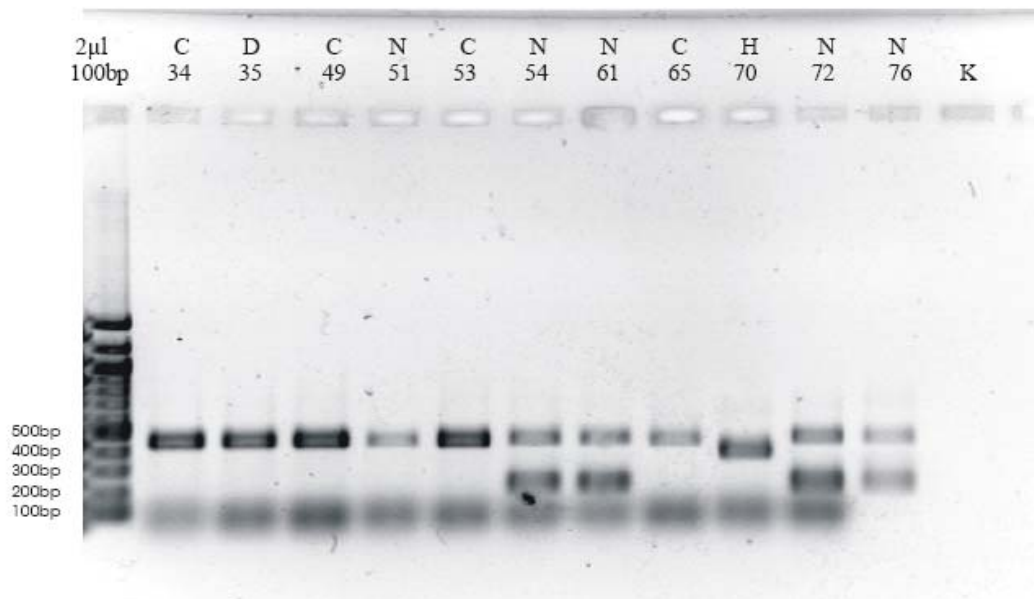


Abb. 3:

Restriktionsverdau der ITS2-Region mit Cla I auf 1,5%igem Agarosegel. Nur Proben von *Elodea nuttallii* (N) zeigen zwei Banden. Legende s. Abb. 1. DNA-Leiter: 100bp PEQ-Gold.

Tab. 1:

Vergleichende Taxonomie einiger *Elodea*-Proben. Die laufende Nr. der untersuchten Proben sowie die Artbestimmung durch den Sammler sind vorangestellt. Elchrom: Taxonomie basierend auf Längenunterschied der ITS2-Region. Cla I: Restriktionsverdau der ITS2-Region. Chemotaxonomie: HPLC Analyse der Flavonoide. ITS-Sequenz: Sequenzierung der gesamten ITS-Region. Details s. Text. *EC* – *Elodea canadensis*, *EN* – *Elodea nuttallii*. dito – gleiches Ergebnis wie für Elchrom. Grau unterlegte Proben markieren korrigierte Identifikationen.

Nr.	Sammler	Elchrom	Cla I	Chemotaxonomie	ITS-Sequenz
5	<i>EC</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
6	<i>Elodea</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
8	<i>EN</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
12	<i>EC</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
13	<i>EN</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
18	<i>EC</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
28	<i>EN</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
34	<i>EC</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
44	<i>EC</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
51	<i>EN</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
53	<i>EC</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
54	<i>EN</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
58	<i>EC</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
61	<i>Elodea</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
69	<i>EC</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
72	<i>EC</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
73	<i>EN</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
74	<i>Elodea</i>	<i>EC</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>
76	<i>EN</i>	<i>EN</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>	<i>dito</i>

Fazit

Elodea-Arten können anhand der beschriebenen chemotaxonomischen und molekular-taxonomischen Methoden eindeutig und reproduzierbar unterschieden werden. Die unterschiedlichen Methoden führen bei den untersuchten Proben zu denselben Ergebnissen (Tab. 1). Während die Chemotaxonomie eine geeignete HPLC-Anlage, möglichst mit Photodiodenarray, voraussetzt, und die molekulare Taxonomie basierend auf den ITS-Sequenzen Zugang zu einem DNA-Sequenzierer oder die Inanspruchnahme einer kommerziellen Sequenzierfirma voraussetzt, kann insbesondere der Restriktionsverdau der ITS2-Region schnell und kostengünstig in einem einfach eingerichteten molekularbiologischen Labor durchgeführt werden. Das Elchrom-Verfahren macht eine mehrere Tausend Euro teure Spezialapparatur erforderlich.

Abhängig von den Gegebenheiten der vorhandenen Labore erscheint uns entweder eine HPLC-Analyse (Chemotaxonomie) oder der Restriktionsverdau als einfachste und kostengünstigste Methode der eindeutigen Artbestimmung unklarer *Elodea*-Proben. Um die Kosten abzuschätzen, müssen Investitions-, Arbeitszeit- und Materialkosten veranschlagt werden. Da erstere beiden stark variabel sein können, abhängig von der Ausstattung des Labors, wird im folgenden nur der reine Materialverbrauch angegeben. Chemotaxonomie: für Lösungsmittel, Gefäße etc. ca. 1 € pro Probe. Molekulare Taxonomie: DNA-Extraktion und PCR der ITS-Region: Extraktions- und Aufreinigungskit der Fa. Qiagen, (4,- €/Probe), Taq-Polymerase etc. ca. 1,50 €/Probe. Diese Kosten entstehen für alle molekularen Methoden. Sequenzierung: ca. 20,- €/Probe. Elchrom: Gele etc. ca. 1,- €/Probe. Restriktionsverdau: Enzym, Gele etc. ca. 1,- €/Probe.

Aufgrund des hohen Ausbreitungspotentials von *E. nuttallii* und der häufig falschen Identifikationen ist die Nutzung dieser Methoden dringend angeraten, um korrekte Aussagen über die Verbreitung dieser Neophyte zu ermöglichen. Vergleichbare Methoden könnten für andere morphologisch schwierig zu bestimmende submerse Makrophyten entwickelt werden, wie z.B. *Potamogeton* spp. und *Ranunculus* spp.

Danksagung: Wir bedanken uns bei Dr. Thorsten Reusch, MPI für Limnologie, Plön, der uns auf die Verwendung der ITS-Region aufmerksam machte. Danke auch an Claudia Feldbaum & Kathrin Nühse für Mitarbeit bei der Probenbearbeitung.

Literatur

- Barrat-Segretain, M.-H., 2001. Invasive species in the Rhone River floodplain (France): replacement of *Elodea canadensis* Michaux by *E. nuttallii* St. John in two former river channels. Arch. Hydrobiol. **152**: 237-251.
- Casper, S.J. and H.-D. Krausch, 1980. Pteridophyta und Anthophyta. 1. Teil. Bd. 23 in: Süßwasserflora von Mitteleuropa, Fischer Verlag, Stuttgart.
- Cook, C.D.K. & K. Urmi-König, 1985. A revision of the genus *Elodea* (Hydrocharitaceae). Aquat. Bot. **21**: 111-156.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- Ihaka, R. & R. Gentleman, 1996. R: A language for data analysis and graphics. J. Comput. Graph. Statist. **5**: 299-314.
- Simpson, D. A., 1986. Taxonomy of *Elodea* Michx. in the British Isles. Watsonia **16**: 1-14.
- Simpson, D.A., 1988. Phenotypic plasticity of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St John and *Elodea canadensis* Michx. in the British Isles. Watsonia **17**: 121-132.
- Simpson, D.A., 1990. Displacement of *Elodea canadensis* Michx by *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St John in the British Isles. Watsonia **18**: 173-177.
- Thiebaut, G., T. Rolland, F. Robach, M. Tremolieres & S. Muller, 1997. Some consequences of the introduction of two macrophyte species, *Elodea canadensis* Michaux and *Elodea nuttallii* St. John, in continental aquatic ecosystems: Example of two areas in the North-East of France: Alsace Plain and Northern Vosges. Bull. Franç. Peche Piscic. **344-345**: 441-452.
- Vanderpoorten, A., J. Lambinon, & M. Tignon, 2000. Morphological and molecular evidence of the confusion between *Elodea callitrichoides* and *E. nuttallii* in Belgium and northern France. Belg. J. Bot. **133**: 41-52.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A. et al. (eds.) PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego pp. 315-322.